

# STAFİLOKOK SUŞLARINDA VANKOMİSİN VE TEİKOPLANİN DUYARLILIĞINI BELİRLEMEDE BUYYONDA MİKRODİLÜSYON VE E-TEST YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI\*

Mustafa SÜMBÜL<sup>1</sup>, Cafer EROĞLU<sup>1</sup>, Teoman ÇINAR<sup>1</sup>,  
Murat HÖKELEK<sup>2</sup>, Hakan LEBLEBİCİOĞLU<sup>1</sup>

## ÖZET

Vankomisin ve teikoplanin metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan seçkin antibiyotiklerdir. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlemede buyyonda mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test gibi yöntemler kullanılır. Çalışmamızda vankomisin ve teikoplaninin stafilokoklara etkinliğini saptamada buyyonda mikrodilüsyon ile E-test uyumluluğunu değerlendirme amaçlanmıştır. 39'u koagülaz pozitif, 60'ı koagülaz negatif 99 stafilokok izolatının antimikrobiyal duyarlılığı buyyonda mikrodilüsyon ve E-test ile belirlenerek, MİK'ları karşılaştırılmıştır. MİK sonuçlarında  $\pm 1$  dilüsyon uyumlu olarak kabul edilmiştir. Her iki yöntemle de vankomisin ve teikoplanine dirençli suş saptanmamıştır. Gerçek mikrodilüsyon ve E-test uyumu vankomisinde % 71, teikoplaninde ise % 53 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak glikopeptid antibiyotiklerde MİK düzeyinin belirlenmesinde E-test ile elde edilen değerler buyyonda mikrodilüsyon sonuçlarını yeterince yansıtmamaktadır.

## SUMMARY

*Comparison of E-test and broth microdilution for susceptibility testing of staphylococci to vancomycin and teicoplanin.*

Vancomycin and teicoplanin are both widely used antibiotics in the treatment of infections caused by Gram positive microorganisms. The broth microdilution, agar dilution and E-test are the methods to assay minimum inhibitory concentration (MIC). The Epsilon-test (E-test) is a novel technique for measuring MIC's of individual antimicrobial agents against bacteria.

The aim of this study was to evaluate the suitability of broth microdilution and E-test for vancomycin and teicoplanin susceptibility testing of staphylococci. The antimicrobial susceptibilities of 99 clinical isolates of staphylococci (39 coagulase positive and 60 coagulase negative) to vancomycin and teicoplanin were determined by broth microdilution and E-test. MIC values were compared. None of 99 isolates were resistant to vancomycin or teicoplanin. MICs within the accuracy limits of  $\pm 1$  dilution were regarded as essential agreements. Essential agreements between two methods were found to be 71% for vancomycin and 53% for teicoplanin. In conclusion, results obtained from E-test were not comparable to MIC values obtained by broth microdilution method.

\* 13. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresinde sunulmuştur (1-5 Haziran 1998, Antalya).

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi. 1- Klinik Bakteriyojoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı. 2- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

## GİRİŞ

Glikopeptid antibiyotiklerden olan vankomisin ve teikoplanin tüm stafilocoklara, streptokoklara, enterokoklara ve *Clostridium* türlerine etkilidir (12). Metisiline dirençli stafilocok infeksiyonlarında ve beta-laktam antibiyotiklere allerjik hastaların tedavisinde seçkin antibiyotiklerdir (8). Vankomisin 1956'dan bu yana stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Vankomisinin ototoksik ve nefrotoksik yan etkileri nedeniyle tedavi sırasında serum konsantrasyonları takip edilmelidir (4). Teikoplanin ise hem yapı, hem de antimikrobiyal aktivite yönünden vankomisine benzerse de nefrotoksik ve ototoksik yan etkileri vankomisine göre daha azdır. Yarılanma ömrü vankomisinden daha uzundur; bu nedenle intravenöz bolus veya intramüsküler olarak verilebilir (5). Teikoplanin 1984'de Avrupa'da klinik kullanıma sunulmuştur (4).

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlemede buyyonda mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test gibi yöntemler kullanılır. Çalışmamızda vankomisin ve teikoplaninin stafilocoklara etkinliğini saptamada buyyonda mikrodilüsyon ile E-test uyumluluğunu değerlendirme amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen, 39'u koagülaz pozitif, 60'ı koagülaz negatif toplam 99 stafilocok suşu çalışma kapsamına alınmıştır. İdentifikasyondan sonra çalışma yapıncaya kadar izolatlar % 10 gliserollü buyyonda -70°C'de saklanmıştır.

Buyyonda mikrodilüsyon: Vankomisin ve teikoplaninin stafilocoklara duyarlılığı buyyonda mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. İn-vitro antimikrobiyal duyarlılık testlerinin tümünün uygulanması ve sonuçlarının yorumlanması National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerilerine göre yapılmıştır. Vankomisin (Lilly) ve teikoplanin (Hoechst) etken maddelerinden potenslerine göre ikişer kat artan dilüsyonlarda 0.0625 µg/ml ile 256 µg/ml arasında çözeltiler hazırlanmıştır. Vankomisine dirençlilik sınırı  $\geq 32$  µg/ml, duyarlılık sınırı  $\leq 4$  µg/ml; teikoplanin için dirençlilik sınırı  $\geq 32$  µg/ml, duyarlılık sınırı  $\leq 8$  µg/ml olarak kabul edilmiştir (10).

E-test: Besiyeri olarak Mueller Hinton (Difco) 150 mm'lik plaklara  $4 \pm 0.5$  mm kalınlığında dökülmüştür. Kullanılana kadar +4°C'de bekletilen plakların kullanılmadan önce yüzeylerinin kuru olmasına dikkat edilmiştir. Steril tuzlu suda (% 0.85 NaCl) 0.5 McFarland standardına getirilen inokulum test ortamına steril eküvyonla inokule edilmiştir. Daha sonra E-test stripleri (AB Biodisk, Solna, Sweden) MİK okuma skalası üst tarafta olacak şekilde aplikatör ile yaklaşık 90 derecelik açıyla hazırlanan test ortamına konmuş, 35°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Koagülaz negatif suşlarda inkübasyon 48 saate kadar uzatılmıştır. Elips şeklindeki inhibisyon zonunda, üremenin tespit edilmediği en düşük değer skaladan okunmuş ve MİK değeri olarak verilmiştir. MİK sonuçlarında  $\pm 1$  dilüsyon uyumlu olarak kabul edilmiştir (11).

Her iki yöntem için kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. Bu suş için kabul edilebilir minimal inhibitör konsantrasyon sınırları vankomisin için 0.5-2 µg/ml, teikoplanin için 0.25-1 µg/ml idi.

## BULGULAR

Buyyonda mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile saptanan MİK farklılıklarının dağılımı ve gerçek uyum ( $\pm 1$  dilüsyon) tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. 99 stafilocok suşunda E-test ve referans olarak mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerlerindeki farklılıklar.

Antibiyotik	Dilüsyon farklılığı							Uyum* (%)
	<-2	-2	-1	0	1	2	>2	
Vankomisin		2	5	33	32	25	2	71
Teikoplanin	1	5	9	22	21	20	21	53

\*Referans test ve E-test arasında  $\pm 1$  dilüsyon MİK farkı.

Her iki testin gerçek uyumu ( $\pm 1$  dilüsyon) değerlendirildiğinde buyyonda mikrodilüsyona karşılık E-test uyumu vankomisinde % 71, teikoplaninde ise % 53 olarak saptanmıştır.

Glikopeptid antibiyotiklerin stafilocok suşlarında MİK<sub>90</sub> dağılımı tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Glikopeptid antibiyotiklerin stafilocok suşlarında MİK<sub>90</sub> değerleri ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Mikroorganizma (n)	Vankomisin		Teikoplanin	
	Mikrodilüsyon	E-test	Mikrodilüsyon	E-test
S. aureus (39)	1	2	2	2
KNS (60)	2	2	2	4
Toplam (99)	1	2	1	2

Çalışılan izolatlarda buyyonda mikrodilüsyon ile vankomisin MİK değerleri 0.25  $\mu\text{g/ml}$  ile 2  $\mu\text{g/ml}$ , teikoplanininki 0.06  $\mu\text{g/ml}$  ile 4  $\mu\text{g/ml}$  arasında; E-test ile her iki antibiyotiğin MİK değerleri 0.125  $\mu\text{g/ml}$  ile 4  $\mu\text{g/ml}$  arasında yer almıştır.

## TARTIŞMA

Hayati tehdit edici stafilocok infeksiyonlarında vankomisin ve teikoplanine dirençli mikroorganizmalar için MİK düzeyinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Antibiyotiklerin bakterilere karşı MİK değerini buyyonda mikrodilüsyonla saptamak zaman alıcı bir metoddur. Buna karşın E-test daha basit ve hızlı bir tekniktir ve mikrodilüsyon MİK sonuçları birbiri ile uyumlu olan antibiyotiklerde E-test ile bu düzeyi pratik olarak saptamak mümkündür (9). E-test bazı antibiyotiklerle yapılan çalışmalarda agar dilüsyon ve buyyonda mikrodilüsyonla uyumlu bulunmuştur (2,3,7). Çalışmamızda buyyonda mikrodilüsyon ve E-test ile belirlenen MİK değerleri karşılaştırılmıştır. Buyyonda mikrodilüsyon testi referans olarak kabul edilip E-test ile saptanan MİK değerleri ile karşılaştırıldığında vankomisin için gerçek uyum (mikrodilüsyona karşı E-test) % 71 iken, aynı oran teikoplaninde

% 53 olarak bulunmuştur. Her iki yöntemle saptanan MİK düzeyleri *S.aureus* ve KNS suşları için ayrı ayrı değerlendirildiğinde *S.aureus* suşlarında vankomisin MİK<sub>90</sub> düzeyi mikrodilüsyon yöntemi ile 1 µg/ml, E-test ile 2 µg/ml; teikoplanin için ise her iki yöntemle de 2 µg/ml olarak saptanmıştır. KNS suşlarında teikoplaninde E-test ile saptanan MİK<sub>90</sub>, mikrodilüsyona göre bir dilüsyon daha yüksek bulunmuştur. Çalışılan 99 stafilkok suşunda ise her iki antibiyotik için bulunan MİK<sub>90</sub> değerleri mikrodilüsyon ile 1 µg/ml, E-test ile ise 2 µg/ml olmuştur. Glikopeptid antibiyotiklerde iki yöntemin yeterince uyumlu olmamasının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak büyük molekül ağırlıklı olan bu antibiyotiklerin striplerden besiyerine yavaş difüzyonu nedenlerden biri olabilir (1).

*Streptococcus pneumoniae* suşlarında vankomisin MİK düzeyini belirlemek için E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile bulunan sonuçlar karşılaştırılmış, ancak mikrodilüsyon yöntemine göre E-test uyumsuz bulunmuştur. Enterokok suşlarında da vankomisin için benzer E-test sonuçları bildirilmiştir (6).

Glikopeptid antibiyotiklerin MİK düzeyini saptamada E-test yönteminin buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ile uyumunu belirlemek için daha fazla örnekle yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak glikopeptid antibiyotiklerde MİK düzeyinin belirlenmesinde E-test ile elde edilen değerler buyyonda mikrodilüsyon sonuçlarını yeterince yansıtmamaktadır. E-test ile yüksek bulunan MİK değerleri buyyonda mikrodilüsyonla kontrol edilmelidir.

#### KAYNAKLAR

- 1- Acar JF, Goldstein FW: Disk susceptibility, "Lorian V (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4. ed" kitabında s. 1, Williams & Wilkins, Baltimore (1996).
- 2- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C: Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria, *J Clin Microbiol* 29: 533 (1991).
- 3- Brown DF, Brown L: Evaluation of the E-test, a novel method of quantifying antimicrobial activity, *J Antimicrob Chemother* 27: 185 (1991).
- 4- Fekety R: Vancomycin and teicoplanin, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th ed." kitabında s. 346, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 5- Greenberg RN: Treatment of bone, joint, and vascular-access-associated Gram-positive bacterial infections with teicoplanin, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2392 (1990).
- 6- Hashemi FB, Schutze GE, Mason EO: Discrepancies between results by E test and standard microbroth dilution testing of *Streptococcus pneumoniae* for susceptibility to vancomycin, *J Clin Microbiol* 34: 1546 (1996).
- 7- Knapp CC, Washington JA: Comparison of the E test and microdilution for detection of beta-lactam-resistant mutants of streptococci that are stably derepressed for type 1 beta-lactamase, *J Clin Microbiol* 30: 214 (1992).
- 8- Mainardi JL, Shlaes DM, Goering RV, Shlaes JH, Acar JF, Goldstein FW: Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *J Infect Dis* 171: 1646 (1995).
- 9- Martinez LM, Ortega MC, Suarez AI: Comparison of E test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of Coryneform bacteria, *J Clin Microbiol* 33: 1318 (1995).

- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 4th ed. Approved Standard M7-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova Pa (1997).
- 11- Renneberg J, Niemann LL, Gutschik E: Antimicrobial susceptibility of 278 streptococcal blood isolates to seven antimicrobial agents, *J Antimicrob Chemother* 39: 135 (1997).
- 12- Wood MJ: The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin, *J Antimicrob Chemother* 37: 209 (1996).