

## HOMOJEN MRSA SUŞLARINDA VANKOMİSİN TOLERANSI\*

Hikmet GEDİK<sup>1</sup>, Nur BENZONANA<sup>1</sup>, Banu TAŞER<sup>2</sup>, Yusuf KUL<sup>1</sup>,  
Serdar ÖZER<sup>1</sup>

### ÖZET

Antibiyotik toleransı, hücre duvarına etkili antibiyotiklere karşı Gram pozitif bakterilerin geliştirdiği bir tür direnç mekanizmasıdır. Toleran bakteriler bu antibiyotiklerin bakterisit etkisine karşı direnirler. Bu yüzden bakterisit etkinin istendiği ciddi infeksiyonların tedavisinde tolerans sorun yaratabilir.

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen ve oksasilinin MIC değerleri 128 µg/ml veya üzerinde olan 46 homojen MRSA kökeninde vankomisin toleransı araştırılmıştır. Bunun için mikrodilüsyon yöntemiyle kökenlerin MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşları, pozitif kontrol olarak da vankomisine toleran olduğu düşünülen bir *E.faecalis* kökeni kullanılmıştır. Ayrıca kontrol suşları ile çalışma kapsamındaki 4 MRSA kökenine "time kill curve" testleri uygulanmıştır.

*E.faecalis* kökeni için MBC/MIC oranı 128 veya daha yüksek iken, çalışma kapsamındaki diğer kökenlerin hiçbirinde MBC/MIC oranı 32 veya üzerinde bulunmamış ve vankomisin toleransı saptanmamıştır. "Time-kill" grafiklerinde, *E.faecalis* kökeninin paterni toleransla uyumlu bulunurken, kontrol suşları ve çalışılan 4 MRSA kökeninde vankomisin toleransı olmadığı doğrulanmıştır.

### SUMMARY

#### *Vancomycin tolerance of homogenous MRSA strains.*

Antibiotic tolerance may be accepted as a resistance mechanism developed by Gram positive bacteria against cell wall active antibiotics. Tolerant bacteria resist to bactericidal effects of these antibiotics, therefore tolerance may be a problem in the therapy of serious infections which bactericidal effect is required.

In this study, vancomycin tolerance was investigated in 46 homogenous MRSA strains isolated from clinical specimens. Oxacillin MIC values of the strains were 128 µg/ml or higher. Vancomycin MIC and MBC values were determined by microdilution method for tolerance. *S.aureus* ATCC 29213 and ATCC 25923 were used as negative controls and an *E.faecalis* strain presumed as vancomycin tolerant was used as positive control. Time-kill curve tests were performed for control strains and 4 test strains.

While the MBC/MIC ratio of *E.faecalis* strain was 128 or higher, the MBC/MIC ratios of the test strains were between 1 and 8. Time-kill curves were consistent with the results and none of the strains was tolerant to vancomycin.

\* 12. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1997, Antalya).

1. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

2. Taksim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

## GİRİŞ

Günümüzde metisiline duyarlı ve dirençli tüm *S.aureus* kökenleri in-vitro testlerle vankomisine duyarlı bulunmaktadır. Klinik kullanımdaki duyarlılık testleri, mikroorganizmaların sadece üremelerinin inhibisyonunu gösterir. Antibiyotiklerin mikroorganizmaları öldürücü etkisi ise ancak bakterisidal testlerle değerlendirilebilir. Bu yüzden bazı mikroorganizmalar duyarlılık testlerinde “duyarlı” görünseler bile antibiyotiğin “sidal” etkisine karşı direnebilirler. “Antibiyotik toleransı” olarak bilinen bu özellik stafilokoklarda diğer mikroorganizmalara göre daha sık görülür. Etken mikroorganizmada tolerans söz konusu ise, özellikle bakterisit etkinin gerektiği ciddi infeksiyonlarda tedaviye yanıtızlık ortaya çıkabilir (3).

Bu çalışmada; çoğu yoğun bakım hastalarından izole edilmiş 46 MRSA kökeninde vankomisine tolerans olup olmadığı araştırılmıştır.

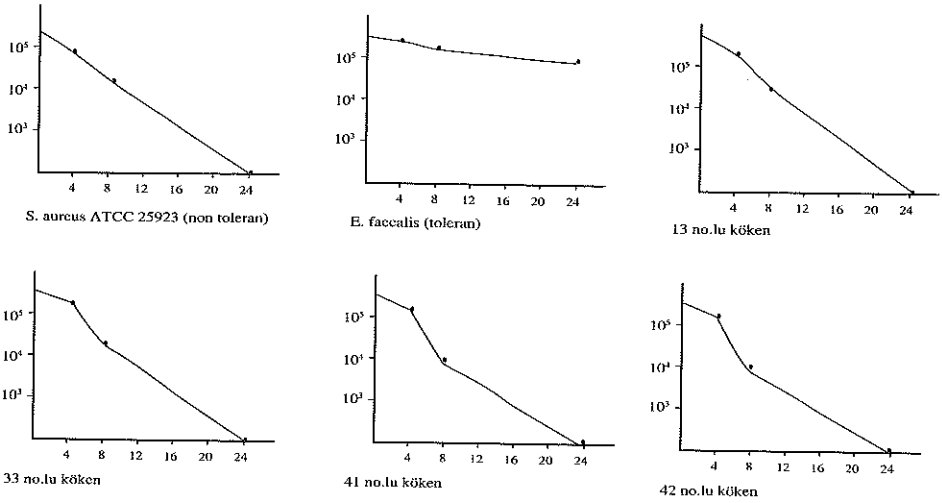
## GEREÇ VE YÖNTEM

Haziran 1995-Mayıs 1996 tarihleri arasında Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen ve oksasilin MIC değerleri 128 µg/ml veya daha yüksek olan 46 MRSA kökeni çalışma kapsamına alınmıştır. Kanlı agarda üretilen bakteri kolonilerinden 10-15 tanesine öze ile dokunularak Mueller-Hinton buyyonu içeren tüplere aktarılmış ve McFarland 0.5 bulanıklığına gelene dek 4-5 saat 35°C’de bekletilerek “üreme fazındaki” süspansiyonlar elde edilmiştir. Bu süspansiyonlardan NCCLS önerilerine göre mikrodilüsyon testi ile vankomisinın MIC değerleri saptanmıştır. MBC değerlerini belirlemek için de üreme gözlenmeyen çukurlardan kanlı agar plaklarına subkültürler ile 35°C’de 48 saat inkübasyon sonunda koloni sayımları yapılmıştır (6,9). Testte vankomisine toleran olduğu düşünülen bir *E.faecalis* kökeni pozitif kontrol, toleran olmayan *S.aureus* ATCC 25923 ve *S.aureus* ATCC 29213 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca kontrol kökenleri ile 4 test kökenine time-kill testi yapılmış, vankomisinın tekrarlayan dozlarda ortalama serum düzeyi 8 µg/ml olduğundan MIC x4 değerindeki antibiyotik konsantrasyonu test için seçilmiştir (1). Üreme fazındaki bakterilerden son konsantrasyon  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde antibiyotikli tüplere aktarılmış ve 35°C’de inkübe edilirken 0,4,8 ve 24. saatlerde koloni sayımları için pasajlar yapılmıştır. Koloni sayımlarına göre time-kill eğrileri grafiğe çizilmiştir (9).

## BULGULAR

*S.aureus* ATCC 25923 ve *S.aureus* ATCC 29213 için MIC ve MBC değerleri 2 µg/ml, MBC/MIC oranı 1; pozitif kontrol olan *E.faecalis* için MIC değeri 1 µg/ml, MBC > 128 µg/ml, MBC/MIC oranı ise > 128 olarak bulunmuştur. Test kökenlerinin MIC değerleri 0.5-2 µg/ml, MBC değerleri ise 0.5-4 µg/ml arasında bulunmuştur. Test kökenlerinin hiçbirinin MBC/MIC oranları 32 veya üzerinde olmadığından tolerans saptanmamıştır.

*S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ve rastgele seçilen 4 kökenin time-kill eğrileri ise şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. S.aureus ATCC 25923, E.faecalis ve 4 kökenin time-kill eğrileri.

## TARTIŞMA

Tolerans, Gram pozitif bir bakterinin  $\beta$ -laktam grubu veya hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer antibiyotiklerin öldürücü ve çoğu zaman da eritici etkisine karşı ölüm oranlarının azalması olarak tanımlanabilir (10). Pratik olarak toleransın MBC/MIC oranının 32 veya daha fazla olmasıyla gösterilebileceği bildirilmektedir. Ancak araya girebilecek birtakım faktörler nedeniyle bu kriter her zaman yeterli olmayabilir. Eagle fenomeni, paradoksal etki, persistans ve fenotipik tolerans genetik toleransla karşılanabilecek durumlardır (8,9).

Toleran bakterilerin ölüm hızı çok yavaş olduğundan 24 saat sonra hâlâ inokulumun binde birinden fazlası canlı kalmaktadır. Toleransın oluşum mekanizmasında bakterilerin hücre duvarında yer alan ve otolitik aktivite gösteren birtakım enzimlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Hücre duvarına etkili antibiyotikler bir yandan hücre duvarının oluşumunu engellerken diğer yandan bu otolitik enzimleri aktive ederler. Böylece bakteri hücrelerinin lizisi sağlanır. Ancak toleran bakteriler otolizin sistemindeki bir defekten dolayı lizise uğramazlar ve antibiyotiklerin öldürücü etkisine karşı direnirler. Bu özellik laboratuvarında MBC/MIC oranının 32 veya daha fazla olmasına yol açar (3,5,10,11,13) Genetik toleransın intrinsek bir olay olmadığını, antibiyotikle temas sonrası kazanıldığını gösteren bir takım bulgular vardır. Dolayısıyla antibiyotiklerin sık kullanıldığı toplumlarda toleran suşlarla karşılaşılma olasılığı da daha fazladır (10).

Tolerans testlerinin yapılmasında birtakım teknik sorunlarla karşılaşmaktadır. İnokulumun üreme fazı, miktarı, antibiyotikle yetersiz temas, pasajlarla taşınan antibiyotik miktarı, aktarılan hacim, besiyeri içeriği ve pH'ı, subkültürlerin inkübasyon süresi ve ısısı testlere etki edebilecek faktörlerdir (2,4,5,8,9,12).

Toleransı saptamak için birbirinden farklı ve standardize edilmemiş yöntemler kullanıldığından klinik örneklerden izole edilen suşlar arasında çok farklı tolerans oranları bildirilmiştir. Stafilokok izolatları  $\beta$ -laktam antibiyotikler arasında genellikle çapraz tolerans gösterir; yani bir  $\beta$ -laktama toleran olan suşlar sıklıkla diğer  $\beta$ -laktamlara da tolerandır. İnsidansı düşük olmakla birlikte, stafilokoklarda vankomisin toleransı da bildirilmiştir. Vankomisine tolerans,  $\beta$ -laktamlara olan toleransa eşlik edebilir veya onlardan bağımsız olabilir. Bu fenomenin mekanizması bilinmemektedir. Ayrıca, hastanede uzun süre yatan hastalarda, nozokomiyal infeksiyonlardan ve fazla antibiyotik kullanımından toleran suşlarla karşılaşılma olasılığı artmaktadır (3,10,14,15).

Ülkemizde vankomisin toleransı ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada 50 MRSA kökeninin 4'ünde yüksek, 4'ünde düşük düzeyde vankomisin toleransı saptanmıştır (7).

Çalışmamızda MBC/MIC oranlarına göre 46 MRSA kökeninin hiçbirinde vankomisine tolerans saptanmamıştır. Pozitif ve negatif kontroller ile 4 test kökenine yapılan time-kill testleri çalışma sonuçlarını desteklemiştir.

Sonuç olarak; hastanemizde izole edilen ve çeşitli antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç taşıyan 46 MRSA kökeninde vankomisine direnç ve tolerans olmadığı, bu nedenle vankomisinin ciddi MRSA infeksiyonlarında güvenle kullanılabilceği belirlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

- 1- Fekety R: Vancomycin and teicoplanin, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s.346, Churchill Livingstone Inc, New York (1995).
- 2- Goessens WHF, Fontijene P, Micheal MF: Factors influencing detection of tolerance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 22:364 (1982).
- 3- Handwerger S, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria, *Rev Infect Dis* 7: 368 (1985).
- 4- Ishido K, Guze PA, Kalmanson GM, Albrandt K, Guze LB: Variables in demonstrating methicillin tolerance in *Staphylococcus aureus* strains, *Antimicrob Agents Chemother* 21: 688 (1982).
- 5- Michel MF, Goessens WHF: Tolerance to antimicrobial agents in *Staphylococcus aureus*, Michel MF, van der Meer JWM (eds): *Resistance and Development of Resistance*", kitabında s.19 Betchworth: Beachamfarma BV (1985).
- 6- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 3. baskı, Approved Standard, NCCLS Document M7-A3, Villanova (1993).
- 7- Salman Z, Töreci K: Antibiotic tolerance for ceftriaxone, cefotaxime, cefoperazone, cefazolin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *ANKEM Derg* 6: 1 (1992).
- 8- Sheerris JC: Problems in vitro determination antibiotic tolerance in clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 30: 633 (1986).
- 9- Stratton CW, Cooksey RC: Susceptibility test: Specials tests, "Balows A, Hausler Jr WJ, Hermann KL, Isenbach HD, Shadomy HJ (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5.baskı" kitabında s.1153, ASM, Washington (1991).
- 10- Töreci K: Bakterilerde antibiyotik toleransı, "Çalangu S, Eraksoy H, Özüt H (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları '92*" kitabında s.39 Yüce Yayınları, İstanbul (1992).

- 11- Töreci K: Postanbiyotik etki ve bakterilerde antibiyotiklere karşı tolerans, *ANKEM Derg* 7: 196 (1993).
- 12- Tuomanen E: Phenotypic tolerance: The search for  $\beta$ -lactam antibiotics that kill non-growing bacteria, *Rev Infect Dis* 8: S279 (1986).
- 13- Tuomanen E, Durack DT, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 30: 521 (1986).
- 14- Van der Meer JTM, Van Vianen W, Hu E, van Leeuwen WB, Valkenburg HA, Thompson J, Michel MF: Distribution, antibiotic susceptibility and tolerance of bacterial isolates in culture positive cases of endocarditis in the Netherlands, *Eur J Clin Microbiol Infects Dis* 10: 728 (1991).
- 15- Woolfrey BF, Lally RT, Ederer MN: Evaluation of oxacillin tolerance in *Staphylococcus aureus* by a novel method, *Antimicrob Agents Chemother* 28: 381 (1985).