

HASTANE KÖKENLİ STAFİLOKOK SUŞLARINDA MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİN BELİRLENMESİ

Fatma SIRMATEL*, Fadile YILDIZ ZEYREK**, Osman ERKMEN***

* Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ŞANLIURFA

** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ŞANLIURFA

*** Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, GAZİANTEP

ÖZET

Hastanede yatan hastaların balgam, burun sürüntüsü, idrar, pü ve yara materyali gibi çeşitli örneklerinden izole edilen 42'si *Staphylococcus aureus* ve 33'ü koagülaz negatif stafülokok (KNS) olmak üzere toplam 75 stafülokok suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Antibiyotik direnci disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile incelenmiştir. *S.aureus* suşlarında metisilin direnci % 14 iken KNS'larda % 30 olarak saptanmıştır. MİK değerlerine göre metisiline duyarlı *S.aureus* ve KNS suşlarının antibiyotik direnci sırası ile penisilin G için % 83 ve % 61; ampicilin-sulbaktam için % 14 ve % 9; sefalotin için % 8 ve % 13 olarak bulunmuştur. Metisiline duyarlı ve dirençli suşlarda sırası ile trimetoprim-sulfametoksazol için % 10 ve % 56; eritromisin için % 8 ve % 63; klindamisin için % 12 ve % 50; gentamisin için % 14 ve % 81; ofloksasin için % 7 ve % 38; siprofloksasin için % 7 ve % 25 direnç saptanmıştır. Sonuç olarak nosokomial infeksiyonlarda metisiline dirençli stafülokoklar antibiyotiklere metisiline duyarlı stafülokoklardan daha dirençli bulunmuştur ($p<0.05$).

Anahtar sözcükler: antibiyotik direnci, nosokomial infeksiyonlar, stafülokok

SUMMARY

Antibiotic Resistance in Nosocomial *Staphylococcus* Strains with Broth Microdilution Method

In this study, a total of 75 *Staphylococcus* strains [42 *S.aureus* and 33 coagulase negative *Staphylococcus* (CNS)] were isolated from different clinical specimens (sputum, nasal swabs, urine, pus and wound materials) obtained from hospitalized patients. Antibiotic resistance was determined by microdilution and disk diffusion methods. Methicillin resistance was found in 14 % and 30 % of *S.aureus* and CNS strains, respectively. According to the MIC values, resistance rates of methicillin sensitive *S.aureus* and CNS strains for penicillin, ampicillin-sulbactam and cephalotin were 83 % and 61 %, 14 % and 9 %, 8 % and 13 %, respectively. Resistance rates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains were found to be 10 % and 56 % for trimethoprim-sulfamethoxazole, 8 % ve 63 % for erythromycin, 12 % and 50 % for clindamycin, 14 % and 81 % for gentamicin, 7 % and 38 % for ofloxacin, 7 % and 25 % for ciprofloxacin, respectively. In conclusion, resistance rates to all antibiotics were higher in methicillin-resistant isolates than methicillin-sensitive isolates ($p<0.05$).

Key words: antibiotic resistance, nosocomial infections, *Staphylococcus*

GİRİŞ

Son yıllarda hastanede yatan hastalarda stafilocok infeksiyonları çok sık görülmektedir^(5,8,22,23). Normalde insanların cilt ve mukozasına kolonize olan stafilocok suşları bağışıklık sistemi zayıf olan veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda patojen hale gelebilmektedir^(8,22). Özellikle metisiline dirençli stafilocok (MRS) suşlarının neden olduğu nozokomial infeksiyonlar daha ölümcül olmaktadır. Hastanede kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler stafilocok suşlarının direncini de etkiler^(5,16). Son yıllarda metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) hastane infeksiyonlarında sorun olmaktadır. Amerika ve Avrupa'dan yapılan çalışmalarda hastane infeksiyonlarında zamanla artış gösteren stafilocok infeksiyonlarının önemli bir tehdit olduğu belirtilmektedir^(5,23). Özellikle metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarının artması tedavide sorun olmakta, uygun olmayan antibiyotik kullanımının buna neden olduğu belirtilmektedir. Metisiline duyarlı stafilocoklar (MSS) son zamanlarda nozokomial infeksiyonlarda üst sıralara çıkmakta, cerrahi yara ve kateter infeksiyonlarında önemli etken patojen olarak, birinci jenerasyon safalosporin, makrolid, aminoglikozid ve kinolonlar ile tedavi edilebilmektedir^(6,8,12,14,15,16). Stafilocok suşlarının antibiyotiklere duyarlılığının saptanmasında halen disk difüzyon tekniği tercih edilmektedir⁽¹⁶⁾. Ancak azalan vankomisin duyarlılığı ve bazı yanlıgular nozokomial infeksiyon etkenlerinin dirençliliğinin tanımlanmasında, MİK değerini daha güncel hale getirmiştir.

Bu araştırmada hastanede yatan ve hastane infeksiyonu tanısı alan olgulardan izole edilen stafilocok suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumları disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleriyle incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar

Çalışma kapsamına bir yıllık süreç içerisinde hastanede yatan ve hastane infeksiyonu tanısı alan hastaların değişik materyallerinden (kan, balgam, burun sürüntüsü, idrar, pü ve yara materyali) izole edilen 42'si (% 56) *S.aureus*, 33'ü (% 44) KNS olan 75 stafilocok suşu alınmıştır. Suşlar standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmış ve duyarlılık testleri yapılabana kadar -80°C'de % 10 gliserol içeren beyin-kalp infüzyon buyyonunda saklanmıştır^(8,12,14,22).

Antibiyotik duyarlılık testleri

Metisilin direnci NCCLS önerileri doğrultusunda 1 µg oksasilin diski ile % 2 NaCl eklenmiş Mueller-Hinton agar da disk difüzyon yöntemiyle ve 1-256 µg/ml olacak şekilde hazırlanan oksasilin çözeltisi ile katyon ekli Mueller-Hinton

sıvı besiyerinde steril U tabanlı plaklarda mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Yapılan bu testler sonucunda zon çapı 10 mm ve altında olanlar ile MİK değeri ≥4 µg/ml olanlar MRSA olarak değerlendirilmiştir.

Disk difüzyon testi

NCCLS önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde doğrudan koloni süspansiyonu hazırlanmış ve Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra penisilin, sefalotin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ), eritromisin, klindamisin, linkomisin, metisilin, ampisilin-sulbaktam (SAM), vankomisin, gentamisin, ofloksasin, siprofloksasin (Oxoid) diskleri yerleştirilmiştir. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirilmiştir.

Mikrodilüsyon testi

NCCLS önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründeki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp son inokülüm konsantrasyonu 5x10⁵ cfu/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırılmıştır. Steril U tabanlı plaklara % 2 oranında NaCl içeren katyon ekli 50 µl Mueller-Hinton sıvı besiyeri konmuştur. İlk kuyucuğa 64 µg/ml antibiyotik içeren çözültiden 50 µl konulup, antibiyotiklerin konsantrasyonları 32-0.008 µg/ml olacak şekilde seri sulandırmaları yapılmıştır. Daha sonra antibiyotik içeren kuyucuklara 50 µl bakteri süspansiyonu eklenip 35°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve gözle üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonları MİK olarak saptanmıştır^(11,16,17,18). Tüm testlerde *S.aureus* ATCC 25923 kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

İzole edilen toplam 75 suşun 42'si (% 56) *S.aureus*, 33'ü (% 44) KNS olarak saptanmıştır. Tüm suşların 16'sı (% 21) metisiline dirençli, 59'u (% 79) metisiline duyarlı bulunmuştur. *S.aureus* suşlarında metisilin direnci % 14, KPS suşlarında % 30 olarak belirlenmiştir. NCCLS'in önerdiği MİK sınır değerlerine göre, suşların çeşitli antibiyotiklere dirençleri tablo 1'de verilmiştir. Çalışmamızda metisiline dirençli stafilocoklar tüm antibiyotiklere metisilin duyarlı stafilocoklardan daha dirençli bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 2).

Tablo 1: Hastane kökenli stafilocok suşlarında MİK değerlerine göre çeşitli antibiyotiklere direnç oranları.

Antibiyotik	MİK aralığı (µg/ml)	MSSA n=36	MRSA* n=6	MSKNS n=23	MRKNS* n=10
TMP/SMZ	2-4	4(%11)	3(%50)	2(%9)	6(%60)
Eritromisin	0.5-4	2 (%6)	5(%83)	3(%13)	5(%50)
Klindamisin	0.5-4	2 (%6)	4(%67)	5(%22)	4(%40)
Gentamisin	4-16	3 (%8)	6(%100)	5(%22)	7(%70)
Ofloksasin	2-8	2(%6)	3(%50)	2(%9)	3(%30)
Siprofloksasin	1-4	3(%8)	2(%33)	1(%4)	2(%20)
SAM	8-16	5(%14)		2(%9)	
Penisilin	0.125-0.25	30(%83)		14(%61)	
Sefalotin	8-32	3(%8)		3(%13)	
Vankomisin	4-32	0	0	0	0

*Metisiline dirençli suşlar in-vitro deneylerde diğer beta-laktam antibiyotiklere duyarlı zon verseler de dirençli kabul edilirler.

MSSA: Metisiline duyarlı KPS, MRSA: Metisiline dirençli KPS, MSKNS: Metisiline duyarlı KNS, MRKNS: Metisiline dirençli KNS

Tablo 2: MSS ve MRS'larda saptanan direnç yüzdeleri.

Antibiyotik	MSS (n= 59)	MRS (n= 16)
TMP/SMZ	6 (% 10)	9 (% 56)
Eritromisin	5 (% 8)	10 (% 63)
Klindamisin	7 (% 12)	8 (% 50)
Gentamisin	8 (% 14)	13 (% 81)
Ofloksasin	4 (% 7)	6 (% 38)
Siprofloksasin	4 (% 7)	4 (% 25)
SAM	7 (% 12)	
Penisilin	44 (% 75)	
Sefalotin	6 (% 10)	
Vankomisin	0	0

MSS: Metisilin duyarlı stafilocok, MRS: Metisilin dirençli stafilocok

TARTIŞMA

Stafilokokların antibiyotik direnci ve metisilin duyarlılık oranı her hastanede ve her bölümde ampirik antibiyotik seçiminde yol göstericidir^(2-4,7,9,17-19,21). Kullanılan antibiyotikler özellikle yatan hastalarda kolonize olan stafilokoklarda metisilin direnç gelişimini artırır^(5,9,10,12). İzole edilen stafilokok suşlarımızda metisilin direnci ortalama % 21 iken *S.aureus* suşlarında % 14 ve KNS'larda % 30'dur.

Yapılan çalışmalarda metisilin direnci *S.aureus* suşlarında % 16-53.4, KNS'larda % 21.8-54 arası bulunmuştur^(2-4,7,19,20,21). Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda KNS'larda metisilin direncini Baysal ve ark.⁽²⁾, Koç ve ark.⁽¹³⁾ ve Öztürk ve ark.⁽²⁰⁾ % 33, Birengel ve ark.⁽³⁾ % 27.8 olarak bulmuşlardır. Mattos ve ark.⁽¹⁵⁾ nozokomial infeksiyonlarda KNS'larda metisilin direncini % 80-90, Erkmen ve ark.⁽⁵⁾ % 52.9 gibi oldukça yüksek oranlarda tesbit etmişlerdir. Son araştırmada metisilin direncinin yüksek olması hastanemizdeki stafilokok infeksiyonlarının önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. KNS'larda metisilin direnci *S.aureus* suşlarındakinden daha yüksektir^(5,9,10,14). Her ne kadar in-

vitro olarak MRS suşları glikopeptid dışı bazı antibiyotiklere duyarlı olsalar da tedavi seçiminde vankomisin, teikoplanin veya fusidik asit tercih edilmelidir^(10,19,21,23).

Stafilokoklarda glikopeptid duyarlılığının devam etmesine rağmen zaman süreci içerisinde azalan vankomisin duyarlılığı yeni antibiyotik arayışlarını ortaya çıkarmıştır. Halen MRSA için rifampisin ve vankomisin etkili antimikrobial ajanlardır^(5,20,22). Ancak son zamanlarda duyarlılığın düzeyinin MİK olarak azaldığı gösterilmiştir^(9,23).

Bu çalışmada izole edilen tüm stafilokok suşları in-vitro olarak vankomisine duyarlı bulunmuştur. Ülkemizde stafilokokların SAM direnci Birengel ve ark.⁽³⁾ tarafından sıfır, Erol ve ark.⁽⁷⁾ ve Bakır ve ark.⁽¹⁾ tarafından ise sırası ile *S.aureus* suşlarında % 42.3 ve % 41.3; KNS'larda % 46.6 ve % 33.3 olarak bildirilmiştir. Avrupa'dan yapılan bildirimde kinolon direnci stafilokoklarda % 59.2-96 arası değişmekte iken ülkemizde bu oran *S.aureus* suşlarında % 3.7-33.6 ve KNS'larda % 12.6-35.5 olarak bildirilmiştir^(2-4,7,8,13,16,19-23).

Çalışmamızın sonuçları da ülkemizde daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

Penisilin direnci stafilokoklarda yüksektir^(6,22). Bu çalışmada penisilin direnci *S.aureus*'da % 83 ve KNS'larda % 61 bulunmuştur. Erol ve ark.⁽⁷⁾ hastane kökenli stafilokoklarda penisilin direncini *S.aureus*'da % 96.1 ve KNS larda % 88.8, Tolun ve ark.⁽²¹⁾ MRS'larda % 87.8 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda hastane kökenli KNS'ların penisilin direnci % 61 gibi daha düşük olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, hastanemizdeki uzun zamandan beri ampirik olarak penisilin kullanımının olmamasından kaynaklanabilir.

TMP-SMZ direnci MRSA suşlarında ülkemiz için % 12-44.5 olarak bildirilirken^(13,20), Avrupa'dan % 47.1-75.9 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir^(14,16). Bu çalışmada TMP-SMZ direnci MRS'lerde % 56 iken MSS'lerde % 10 olarak bulunmuştur.

Birinci jenerasyon sefalosporinler MSS'larda ilk tercih edilecek ilaçlardır. Metisiline duyarlı ve dirençli olan

stafilokokların diğer antibiyotiklere duyarlılığı da farklı bulunmuştur^(1-4,6,7,9,12,13,19,20). Metisiline duyarlı stafilocoklarda, birinci jenerasyon sefalosporin direncini sırası ile Baysal ve ark.⁽²⁾ % 25.3, Birengel ve ark.⁽³⁾ % 9.5, Öztürk ve ark.⁽²⁰⁾ % 12 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu oran MSSA da % 8 ve MSKNS da % 13 olarak bulunmuştur. Makrolid grubu antibiyotikler stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek değildir. Metisilin direnci olan stafilocoklarda makrolid direnci de yüksektir^(9,16). Ülkemizde eritromisin direnci MSS ve MRS'larda sırası ile Baysal ve ark.⁽²⁾ tarafından % 5.6 ve % 59.2; Birengel ve ark.⁽³⁾ tarafından % 21 ve % 63.5 olarak saptanmıştır. Tolun ve ark.⁽²¹⁾ çalışmasında MRS'larda makrolid direnci eritromisinde % 34.1, klindamisinde % 36.5 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda saptanan makrolid direnci MSS'larda eritromisine % 8, klindamisine % 12, bulunurken, MRS'larda bu oranlar % 63 ve % 50 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada toplum kökenli infeksiyonlarda çok sık kullanılan eritromisin ve klindamisin grubu antibiyotiklerin direnç oranı hastane kökenli stafilocoklarda yüksektir. Bu durum hastane kökenli stafilocok direncinin daha moleküler düzeyde incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Stafilokoklarda aminoglikozid direnci sonradan veya tedavi sırasında kazanılabilir. Jarlov ve Hoiby⁽¹⁰⁾ nozokomial infeksiyon etkeni olan KNS'larda aminoglikozid direncini, bölümler arasında (en yüksek direnç hematoloji hastalarında % 50.8 olarak) anlamlı farklılıklarla beraber, % 2.1-50.8 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada gentamisin direnci MSS'de % 14 ve MRS'larda % 81 bulunmuştur. MRS'larda Tolun ve ark.⁽²¹⁾ tarafından gentamisin direnci % 78 olarak bildirilmiştir.

Sonuç olarak hastane kökenli MRS ve MSS suşlarında duyarlılık açısından fark saptanmıştır ve MRS suşları denen en bütün antibiyotiklere daha dirençli bulunmuştur (p<0.05). Her hastanede hastane infeksiyonlarının ve antibiyotik direnç paternlerinin izlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bakır M, Yalçın AN, Dökmetaş İ: Gram positive microorganisms in hospital infections and their antibiotic resistance patterns, *J Infect* 1996; 10:153.
2. Baysal B, Tuncer İ, Erayman B, Arslan U: Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları, *İnfeksiyon Derg* 2003;17(1):27.
3. Birengel S, Kurt H, Boşca A, Balık İ, Tekeli E: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocokların metisillin direncine göre çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, *J Infect* 1994;8:121.
4. Eraksoy H: Stafilocoklarda antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 1989; 3(3):457.
5. Erkmen O, Balcı İ, Güngör S: Staphylococcal infections in a hospital, *Turkish Med Sci* 1996;25:367.
6. Erkmen O, Balcı I, Güngör S: In vitro activities of quinolones and vancomycin against methicillin- and gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Turkish J Med Sci* 1996;26:81.
7. Erol S, Ertek M, Görgün S, Taşyaran MA: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocokların antibiyotik direnç oranları, *Mikrobiyol Bült* 1999;33:111.
8. Geisel R, Schimitz FJ, Fluid AC, Labischinski H: Emergence mechanism and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:685.
9. Home RA, Wootton M, Bennett PM, Mac Goawan AP, Walsh TR: Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility, *J Clin Microbiol* 1999;37:3068.
10. Jarlov JO, Hoiby N: Coagulase-negative staphylococci in a major Danish university hospital diversity in antibiotic susceptibility between wards, *APMIS* 1998;106:411.
11. Jones RN, Barry AL, Gavan TL, Washington JA: Susceptibility tests: Microdilution and microdilution broth procedures, "Lennette EH, Balones A, Hausler WJ, Shadomy HJ (eds): Manual of Clinical Microbiology, 4.baskı" kitabında s.972, ASM Press, Washington (1985).
12. Kloos WE, Bannerman TL: *Staphylococcus* and *Micrococcus*, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, 6. baskı" kitabında s. 264, ASM Press, Washington (1999).
13. Koç NA, Evrensel N, Kaymakçı G, Sümerkan B: *Staphylococcus aureus* suşlarının metisillin direnci, meropenem ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 1994;8:62.
14. Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington CW: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5.baskı, Lippincott, New York (1997).
15. Mattos EM, Teixeira LA, Morgado Alves VA, Rezenda CAF, Silva Coimbra MB, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Sá Figueiredo AM: Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of *Staphylococcus epidermidis*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45(1):13.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eight informational supplement, NCCLS Document M 100-S8, NCCLS, Villanova PA (1998).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Ninth edition: Approved Standard M7-A4, NCCLS, Wayne PA (1999).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Ninth Edition: Approved Standart M2-A6, NCCLS, Wayne PA (1999).
19. Özkan F: Hastane infeksiyonları ve metisillin dirençli *Staphylococcus*

- aureus, Antibiyotik Bült 2000;1(4):106.
20. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün G: Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yatan hastalardan izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılığı, ANKEM Derg 1996;10:48.
 21. Tolun V, Torumkürey D, Susever S, Katracı H, Derbentli Ş, Anđ M, Anđ Ö: Metisiline dirençli (MRSA) stafilocok suşlarının faj tipleri, siderofor sentez yetenekleri, antibiyotiklere ve ağır metallere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001;31(3-4):143.
 22. Waldvogel FA: Staphylococcus aureus (including staphylococcal toxic shock), "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s.2069, Churchill-Livingstone, Philadelphia (2000).
 23. Wenzel PR: Prevention and Control of Nosocomial Infections, 3. baskı, Williams & Wilkins, Baltimore (1997).