

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ'NDE ÇEŞİTLİ ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARINDA GLİKOPEPTİT DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI\*

Yaşar NAKİPOĞLU\*, Handan KATRANCI\*, Atahan ÇAĞATAY\*\*, Şengül DERBENTLİ\*

\* İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

\*\* İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyojoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İSTANBUL

### ÖZET

*Stafilokoklarda vankomisine direnç sınırı MİK  $\geq 32$  mg/L'dir. Vankomisinin MİK'u 8-16 mg/L olan suşlar, vankomisine azalmış duyarlı veya vankomisine orta duyarlı Staphylococcus aureus (VISA) olarak tanımlanır. Bu özelliği gösteren suşların sayısı bugün için oldukça azdır. Ancak klinik önem taşıdıkları, örneğin vankomisin tedavisinden sonra nöksler geliştiği ve bakteremi olgularının ölümlerle sonlandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 135 stafilokok (81 Staphylococcus aureus ve 54 koagülaz negatif stafilokok) suşunda glikopeptit direnci araştırılmıştır. Bu amaçla agar tarama yöntemi uygulanmıştır. Bazı hücreleri vankomisinli besiyerlerinde üreyen orijinal suşlar popülasyon analizi yöntemi ile incelenerek, glikopeptitlere heterodirenç sıklığı hesaplanmıştır.*

*Sonuç olarak; çalışmamızda VISA ve hVISA suşlarına rastlanmamış, bir (% 1.2) S.aureus suşunda teikoplanin direnci (MİK 32 mg/L) ve yedi (% 13) koagülaz negatif stafilokok suşunda vankomisin (MİK 5-8 mg/L) ve teikoplanine (MİK 32-64 mg/L) heterojen direnç belirlenmiş ve bu suşlardaki heterodirenç sıklığının  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  olduğu saptanmıştır.*

**Anahtar sözcükler:** glikopeptit direnci, stafilokoklar, teikoplanin, vankomisin

### SUMMARY

#### An Investigation of Glycopeptide Resistance in the Staphylococcus Strains Isolated From Various Specimens in Istanbul Faculty of Medicine

*The vancomycin resistance criteria for staphylococci is MIC  $\geq 32$  mg/L. Strains with 8-16 mg/L vancomycin MIC are defined as strains with reduced susceptibility to vancomycin or vancomycin intermediate Staphylococcus aureus (VISA). Today, the number of strains that display this feature are very few. However, some cases have been reported to show their clinical significance such as relapses that followed vancomycin treatment and bacteremia which ended with death. In this study, glycopeptide resistance were investigated in 135 strains (81 Staphylococcus aureus and 54 coagulase negative staphylococci) which were isolated from various clinical specimens. For this aim agar screen method has been applied. The results showed no VISA or hVISA presence, but one (1.2 %) S.aureus was found to be resistant to teicoplanin (MIC 32 mg/L) and seven (13 %) coagulase negative staphylococci were determined to be heteroresistant to vancomycin (MIC 5-8 mg/L) and teicoplanin (MIC 32-64 mg/L) with the frequency of  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ .*

**Key words:** glycopeptide resistance, staphylococci, teicoplanin, vancomycin

---

**Yazışma adresi:** Yaşar Nakipoğlu. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, 34390 İSTANBUL  
Tel.: (0212) 414 20 00-31975

e-posta: kirkukkirkuk@yahoo.com

Alındığı tarih: 07.09.2004, revizyon kabulü: 09.10.2004

\* 19. ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi'nde sunulmuştur (30 Mayıs-03 Haziran 2004, Antalya)

## GİRİŞ

1997 yılında Japonya’da Hiramatsu<sup>(10)</sup> tarafından iki farklı vankomisine azalmış duyarlılık gösteren (MİK 8 mg/L) *Staphylococcus aureus* (VISA) suşu bildirilmiştir. Vankomisinin MİK’u birinci suş için 8 mg/L (orta duyarlı), ikinci suş için ise 2 mg/L (duyarlı) bulunmuştur. Ancak ikinci suşun milyonda bir hücresi için vankomisinin MİK’unun yüksek olduğu saptanmıştır. Birinci suşta görülen dirence homojen, diğerine ise heterojen direnç adları verilmektedir. 2002 yılında A.B.D.’den enterokokların *vanA* genini plazmid üzerinde taşıyan vankomisine dirençli (MİK 32 mg/L) ilk *S.aureus* suşu (VRSA) bildirilmiştir<sup>(4)</sup>. Bakterioloji laboratuvarlarında VRSA suşlarının rutin olarak kullanılan disk difüzyon yöntemi ile saptanması mümkündür. Ancak VISA ve heteroVISA-(hVISA) suşlarının bu yöntemle saptanması olası değildir. VISA suşları buyyonda dilüsyon yöntemi ile ve hVISA suşları ise 4-6 mg/L vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar besiyerine yoğun bakteri ekimi ile saptanabilir<sup>(14)</sup>. hVISA suşlarının klinik önemi henüz kesin olarak açıklanamamakla birlikte; böyle suşlarla gelişen endokardit, bakteremi gibi olgularda vankomisin tedavisinin başarısızlıkla sonuçlandığını bildiren yayınlar vardır<sup>(14)</sup>. Çalışmamızda klinik örneklerden ve sağlık personelinin el derisinden izole edilen *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşlarında vankomisin ve teikoplanine homojen ve heterojen direnç ve bu direncin sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi’nin çeşitli kliniklerinden gönderilen örnekler ve sağlık personelinin el derisi örneklerinden Eylül 2001- Nisan 2002 tarihlerinde izole edilen 81 *S.aureus* ve 54 KNS olmak üzere toplam 135 stafilokok suşunda agar tarama yöntemi ile vankomisin ve teikoplanin direnci araştırılmıştır. Glikopeptitlere heterojen direncin belirlenmesinde kontrol suş olarak Mu3 suşu (Juntendo University, Department of Bacteriology, Tokyo, Japonya) ve sonuçların yorumlanmasında NCCLS kriterleri kullanılmıştır<sup>(16)</sup>. Buna göre vankomisin için MİK  $\leq$  4 mg/L duyarlı, 8-16 mg/L azalmış/orta duyarlı ve  $\geq$  32 mg/L dirençli; teikoplanin için ise MİK  $\leq$  8 mg/L duyarlı, 16 mg/L azalmış/orta duyarlı ve  $\geq$  32 mg/L dirençli olarak kabul edilmiştir.

### Vankomisine dirençli stafilokokların belirlenmesi

Bu amaçla Hiramatsu ve ark.<sup>(11)</sup>’nin agar tarama yöntemi kullanılmıştır. Buna göre bakterinin bir gecelik kültüründen 0.5 McFarland ( $10^8$  cfu/ml) standardında süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 0.01 ml alınarak 4 mg/L vankomisin (Sigma) içeren beyin kalp infüzyon (BKİ) agar

(BBL; Becton Dickinson) besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. 24 saatte besiyerinde görülen üreme homojen direnci (vankomisine azalmış duyarlı veya dirençli), 48 saatte birkaç koloninin (1-30 koloni) üremesi ise heterojen direnci, herhangi bir üremenin olmaması ise vankomisine duyarlılığı göstermiştir.

### Populasyon analizi

Hiramatsu ve ark.<sup>(11)</sup>’nin önerdiği yöntem kullanılarak, stafilokok suşlarında vankomisin ve teikoplanine heterojen direnç sıklığı araştırılmıştır. Buna göre denenecek suşların ve kontrol suşun BKİ buyyonundaki bir gecelik kültürlerinin bulanıklığı 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Bu kültürlerin 10’ar kat sulandırılmış süspansiyonlarından 50’şer ml alınarak çeşitli konsantrasyonlarda vankomisin (1, 2, 3,...10 mg/L) ve teikoplanin (1, 2, 4, 8,..128 mg/L) içeren BKİ agar besiyerlerine ekim yapılarak 37°C’de 48 saat bekletilmiştir. Her konsantrasyonda üreyen canlı bakteri sayısı hesaplanmıştır. Koloni sayımı yapılarak, her konsantrasyondaki üreyen canlı bakteri sayıları y eksenine ve antibiyotik konsantrasyonları ise x eksenine yerleştirilerek grafik çizilmiştir. Böylece  $10^6$ - $10^7$  cfu/ml’de vankomisine ve teikoplanine dirençli (sırasıyla MİK  $>$ 4 mg/L ve MİK  $\geq$ 16 mg/L) bakteri hücrelerinin sıklığı belirlenmiştir.

### İstatistiksel analiz

*S.aureus* ve KNS suşlarındaki glikopeptit direncinin karşılaştırılması için Fisher testi kullanılmıştır.

## BULGULAR

### Heterojen dirençli stafilokoklar

İncelenen 135 stafilokok suşundan dokuzu vankomisinli BKİ agar besiyerinde üremiştir. Bunlardan ikisi (no. 2 ve 3) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), yedisi (no.4-10) ise metisiline dirençli *S.haemolyticus* suşlarıdır.

### Populasyon analizi

Bu yöntemde bir MSSA suşu (no.2) vankomisinli BKİ agar besiyerinde üremesine rağmen, bu suş için vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri sırasıyla 4 ve 8 mg/L bulunduğundan, duyarlı olarak kabul edilmiştir. Diğer suş (no.3) ise vankomisine duyarlı (MİK 3 mg/L) ve teikoplanine dirençli (MİK 32 mg/L) olarak saptanmıştır. Yedi *S.haemolyticus* suşu ise; biri dışında (no.6) vankomisine azalmış duyarlı (MİK 5-8 mg/L) ve teikoplanine dirençli (MİK 32-64 mg/L) bulunmuştur (Tablo). Stafilokoklarda heterojen glikopeptit direnci sıklığı  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  olarak saptanmıştır (Şekil 1-4). Heterojen glikopeptid direnci saptanan suşlarda yapılan doğrulama deneylerinde de benzer sonuçlar alınmıştır. Böylece

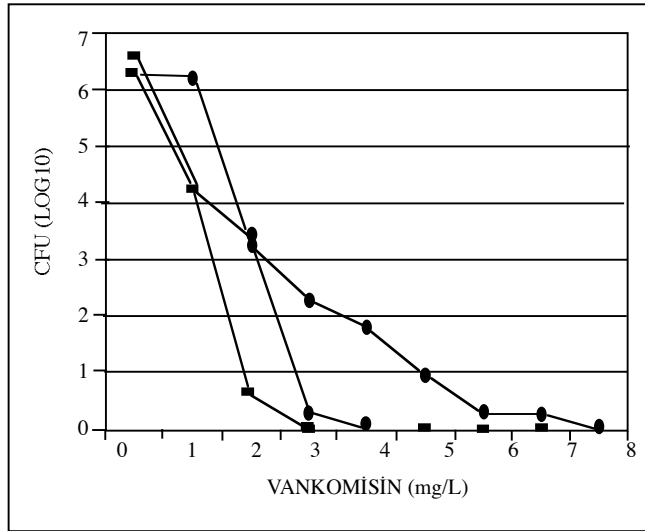
81 *S.aureus* suşundan birinde (% 1.2) ve 54 KNS suşundan yedisinde (% 13) heterojen glikopeptit direnci saptanmıştır.

**Tablo:** İncelenen stafilocok suşlarında heterojen glikopeptit direnci.

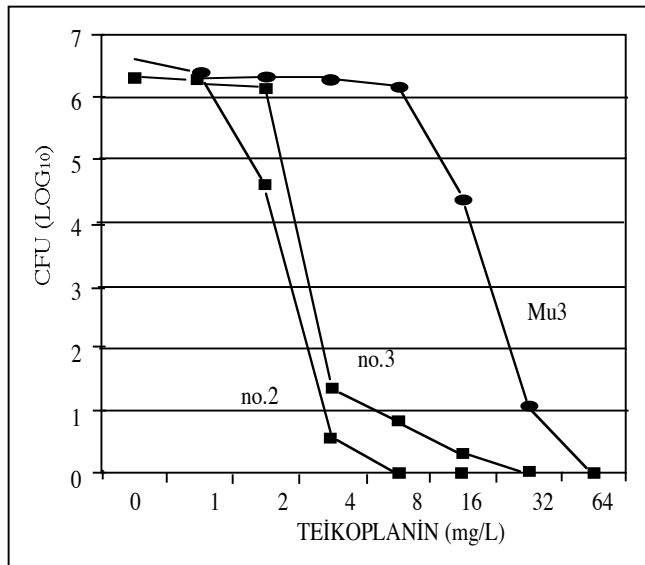
Suşlar (n:135)	Vankomisin* n (%)	Teikoplanin* n (%)
<i>S.aureus</i> (n:81)	0 (0)	1 (1.2)
Koagülaz negatif stafilocoklar (n:54)	6 (11)	7 (13)

\* Koagülaz negatif stafilocok suşlarında görülen heterojen vankomisin ve teikoplanin direnci *S.aureus* suşlarına göre anlamlı derecede daha yüksek (vankomisin için  $p=0.001$ , teikoplanin için  $p=0.007$ ) bulunmuştur.

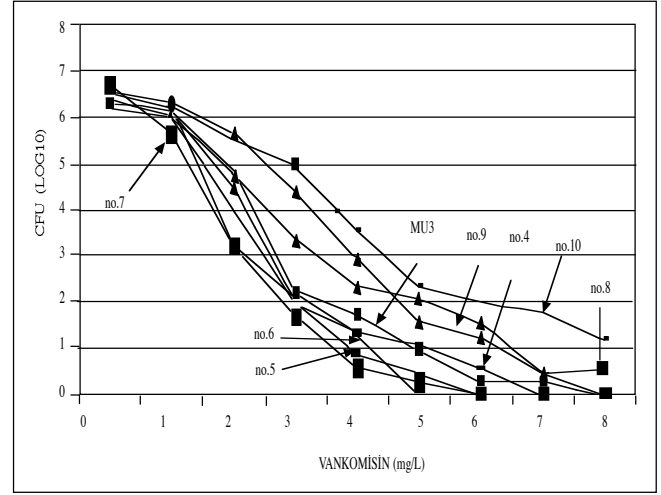
**Şekil 1:** İki *S.aureus* suşunun (no. 2 ve 3) vankomisin heterodirenci yönünden populasyon analizi sonucu [her iki suş vankomisine duyarlı (MİK 3-4 mg/L)].



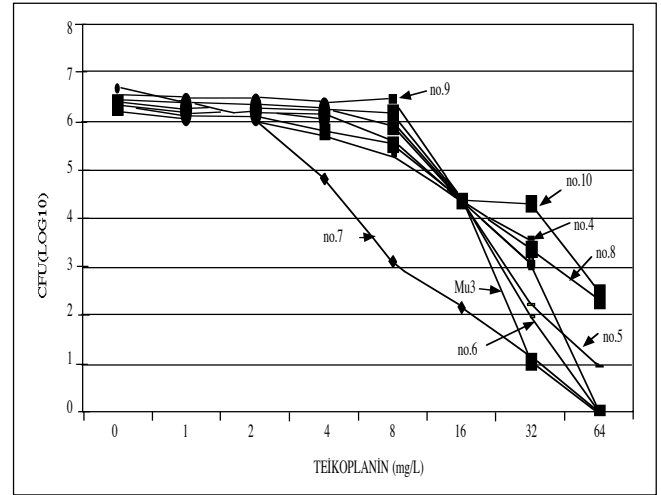
**Şekil 2:** İki *S.aureus* suşunun (no. 2 ve 3) teikoplanin heterodirenci yönünden populasyon analizi sonucu [no.2 duyarlı (MİK 8 mg/L) ve no.3 heterojen dirençli (MİK 32 mg/L)].



**Şekil 3:** KNS suşlarının (no.4-10) vankomisin heterodirenci yönünden populasyon analizi sonucu [4,5,7-10 no'lu suşlar vankomisine azalmış duyarlı (5-8 mg/L), 6 no'lu suş duyarlı (4 mg/L)].



**Şekil 4:** KNS suşlarının (no.4-10) teikoplanin heterodirenci yönünden populasyon analizi sonucu [tüm suşlar dirençli (MİK 32-64 mg/L)].



## TARTIŞMA

Türkiye'de glikopeptit antibiyotiklere (vankomisin ve teikoplanin) kullanım izinleri sırasıyla 1994 ve 1996'da verilmiştir. Bu tarihten sonra metisiline dirençli stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmışlardır. Bu kadar yoğun kullanılmalarına rağmen, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre 81 *S.aureus* suşunun sadece bir sağlık personelinin el derisinden izole edilen birinde (% 1.2) (no.3) teikoplanine heterodirenç (MİK 32 mg/L) bulunmuştur. VISA suşu saptanmamıştır. Hiramatsu ve ark.<sup>(11)</sup>'nin yaptıkları bir çalışmada 1149 *S.aureus* suşundan 34 (% 3)'ü hVISA olarak

belirlenmiştir. Ancak yine Japonya'dan bir başka araştırmacı grubu 6,625 *S.aureus* suşunda vankomisin direncine rastlamamıştır<sup>(12)</sup>. Daha sonra dünyanın çeşitli yerlerinden VISA ve hVISA suşları bildirilmiştir<sup>(1-3,7,8,13,15,17,18)</sup>. Gruneberg ve Hryniewicz<sup>(8)</sup> Avrupa grubu adına yayınladıkları bir çalışmada toplam 1594 KNS suşunun tamamını vankomisine duyarlı, % 0.7'sini ise teikoplanine dirençli bulmuşlardır. Çeşitli Avrupa ülkelerinden hVISA prevalansı ise % 0.2-% 6 arasında [İtalya % 1.1<sup>(15)</sup>, Almanya % 0.2<sup>(2)</sup>, Fransa % 0.6<sup>(17)</sup> ve Hollanda % 6<sup>(7)</sup>] bildirilmiştir. Bu oranlar Uzak Asya ülkelerinden Tayland ve Kore'de sırasıyla % 1.93<sup>(18)</sup> ve % 0.54<sup>(13)</sup> olarak saptanmıştır. Türkiye'de ilk hVISA suşu Gülay ve ark.<sup>(9)</sup> tarafından 1998 yılında bildirilmiştir. Çalışmamızda heteroglikopeptit (vankomisin ve teikoplanin) direnci KNS suşlarında, *S.aureus* suşlarına göre daha yüksek oranda (% 11 ve % 13) saptanmıştır. Bu iki antibiyotiğe direnç gelişimlerinin tarihsel olarak gözden geçirildiği araştırmalarda, önce teikoplanin direncinin geliştiği ve bunu düşük düzeyde vankomisin direncinin izlediği belirlenmiştir<sup>(10,11)</sup>.

MRSA infeksiyonlarının tedavisinde tek seçenek olması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen stafilokok suşlarında vankomisin direncinin sürekli olarak izlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Üstelik stafilokoklarda vankomisin direncinin plazmit aracılığı ile yayılabileceğinin belirlenmesi ve A.B.D.'nde bu özelliğe sahip üç ayrı suşun (VRSA) tanımlanması, ayrıca bugüne kadar çeşitli ülkelere 14 VISA suşunun bildirilmiş olması; konuyu tüm dünyada ilgi odağı haline getirmiştir<sup>(5,6)</sup>.

Heterojen glikopeptit dirençli stafilokokların klinik öneminin ve infeksiyonlarının vankomisinle tedavisindeki başarının; infeksiyon bölgesine, hastanın bağışıklık durumuna, altta yatan hastalık ve/veya cerrahi girişim varlığına, yoğun bakım ve karaciğer nakli gibi faktörlere bağlı olduğu bildirilmiştir<sup>(1,14)</sup>. Ancak heterojen vankomisin direncinin, vankomisine homojen dirençli suşların (VISA suşlarının) ortaya çıkmasında ilk adım olması nedeniyle, rutin olarak kullanılan disk difüzyon yöntemine ek olarak agar tarama yönteminin de uygulanması gereklidir<sup>(10,11,17)</sup>. Özellikle MRSA ve MRKNS prevalansı yüksek olan hastanelerde, stafilokoklardaki glikopeptit direncinin yanında, heteroglikopeptit direncinin de izlenmesi yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Ariza J, Pujol M, Cabo J: Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin, *Lancet* 1999;353:1587-8.
2. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W et al: Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:691-6.
3. Centers for Disease Control and Prevention: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-Illinois, 1999, *MMWR* 2000;48:1165-7.
4. Centers for Disease Control and Prevention: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002, *MMWR* 2002;51:565-7.
5. Centers for Disease Control and Prevention: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2004, *MMWR* 2004;53:322-3.
6. Derbentli Ş: Cerrahi infeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu, *ANKEM Derg* 2004;18 (Ek 2):215-21.
7. Griethysen AV, Veen AV, Buiting A, Walsh T, Kluytmans J: High percentage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides in the Netherlands, *J Clin Microbiol* 2003;41:2487-91.
8. Gruneberg RN, Hryniewicz W: Clinical relevance of a European collaborative study on comparative susceptibility of Gram-positive clinical isolates to teicoplanin and vancomycin, *Int J Antimicrob Agents* 1998;10:271-7.
9. Gülay Z, Atay T, Küçükgüven M, Yuluğ N: *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously resistant to vancomycin at a hospital in Turkey, Program and Abstracts of the Thirty-eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, USA. Abstract C-136. *Am Soc Microbiol*, Washington DC (1998).
10. Hiramatsu K: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance, *Lancet* 2001;1:147.
11. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H et al: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin, *Lancet* 1997;350:1670-3.
12. Ike Y, Arakawa Y, Ma X et al: Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals, *J Clin Microbiol* 2001;39:4445-51.
13. Kim MN, Hwang SH, Pyo YJ et al: Clonal spread of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea, *J Clin Microbiol* 2002;40:1376-80.
14. Liu C, Chambers HF: *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: Epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods, *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3040-45.
15. Marchese A, Balistreri G, Tonoli E: Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a large Italian hospital, *J Clin Microbiol* 2001;39:866-9.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 6th ed., Approved standard M7-A6, Wayne, Pa (2003).
17. Reverdy ME, Jarraud S, Bobin-Dubreux S et al: Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals, *Clin Microbiol Infect* 2001;7:267-72.
18. Trakulsomboon S, Danchaiwittit S, Rongrungruang Y: First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand, *J Clin Microbiol* 2001;39:591-5.