

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİ VE ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE İN-VİTRO DUYARLILIKLARI

Özgür DOĞAN, Meltem YALINAY ÇIRAK, Doruk ENGİN, Sevgi TÜRET

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus ve koagülaz negatif stafilocok (KNS) suşlarında metisilin (oksasilin) direncinin ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 403 hastadan izole edilen stafilocok suşlarının 336'sı KNS, 67'si S.aureus olarak saptanmıştır. Bu suşlara, NCCLS önerileri doğrultusunda oksasilin tuz agar tarama testi yapılmış, toplam 403 suşun 227'si (% 56.3) [67 S.aureus suşunun 45'i (% 67.2) ve 336 KNS suşunun 182'si (% 54.2)] metisiline dirençli bulunmuştur. S.aureus ve KNS suşlarındaki metisiline direnç oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Suşların tamamı vankomisine duyarlı bulunmuştur. Duyarlı suşlara göre metisiline dirençli stafilocok suşlarında eritromisin (p<0.001), siprofloksasin (p<0.001), gentamisin (p<0.01), tetrasiklin (p<0.05) dirençleri anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş, trimetoprim-sulfametoksazole dirençte anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar sözcükler: antibiyotik direnci, metisilin, stafilocok

SUMMARY

Methicillin Resistance and in-vitro Susceptibility to Various Antibiotics of Staphylococci Isolated from Clinical Samples

The aim of this study is to evaluate the methicillin (oxacillin) resistance and in-vitro susceptibility to various antibiotics in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci (CNS) isolated from various clinical samples. 336 out of 403 staphylococci were identified as CNS and 67 as S.aureus. Oxacillin salt agar screening test was used according to the NCCLS recommendations. 227 (56.3 %) of 403 Staphylococcus strains [45 (67.2 %) of 67 S.aureus strains and 182 (54.2 %) of 336 CNS strains] were found resistant to oxacillin. The difference in methicillin resistance in S.aureus and CNS strains was found statistically insignificant. All strains were found susceptible to vancomycin. The resistance to erythromycin (p<0.001), ciprofloxacin (p<0.001), gentamicin (p<0.01) and tetracyclin (p<0.05) in methicillin resistant staphylococci were found significantly higher than sensitive strains; no significant difference was found for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance.

Keywords: antibiotic resistance, methicillin, Staphylococcus

GİRİŞ

Stafilokoklar klinik örneklerden sıklıkla izole edilen patojenler arasındadır. Nozokomiyal infeksiyonlarda özellikle koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) (*Staphylococcus*

epidermidis, *S.hominis*, *S. warneri*, *S.haemolyticus*, *S.simulans* vb.) ön sıralarda karşımıza çıkmaktadır. KNS özellikle yabancı cisimlerle ilişkili bakteriyemi etkeni olarak geniş bir grubu temsil etmektedir. *Staphylococcus aureus* ile oluşan hem hastane dışı hem de hastanede gelişen infeksiyonlar, kısa

Yazışma adresi: Özgür Doğan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

Tel.: (0312) 202 69 14

e-posta:ozgurd2003@yahoo.com.tr

Alındığı tarih: 27.12.2004, revizyon kabulü: 14. 02. 2005

sürede antibiyotik direnci geliştiği için önemlidir. Günümüzde önemli bir sorun olan metisiline direnç giderek artmaktadır. Direnç gelişimi ile nozokomiyal infeksiyon sıklığındaki artış arasında da bir paralellik bulunmaktadır⁽¹⁾.

Metisiline dirençli stafilocok infeksiyonlarında beta-laktam antibiyotiklerin kullanılamaması önemli tedavi sorunlarına yol açmaktadır. Bu suşların makrolidler, klindamisin, kloramfenikol, aminoglikozidler ve antiseptik maddelere de metisiline duyarlı suşlardan daha dirençli oldukları gösterilmiştir^(11,16). Bu çalışmada, hastanemizdeki klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* ve KNS suşlarında metisilin direnci ile çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1- Örneklerin tanımlanması

2002-2003 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde değişik kliniklerde yatan veya polikliniklere gelen 403 hastanın çeşitli örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler % 5'lik koyun kanlı agara ekilerek, 37°C'de 18 ile 24 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen bakteriler Gram boyası, koloni morfolojisi ve tüpte koagülaz yöntemleri ile tanımlanmıştır. Bu suşların 336'sı KNS, 67'si *S. aureus* olarak saptanmıştır.

2- Antibiyotik duyarlılığının incelenmesi

Antibiyotik duyarlılık testleri eritromisin, siprofloksasin, gentamisin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisin ticari diskleri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile gerçekleştirilmiştir⁽¹³⁾.

3- Metisilin direncinin saptanması

Metisilin direncini saptamak için NCCLS⁽¹²⁾ önerileri

doğrultusunda oksasilin tuz agar tarama testi kullanılmıştır. Suşların 0.5 McFarland bulanıklık standardına uygun (10^8 bakteri/ml) olarak steril serum fizyolojik içinde hazırlanan süspansiyonları % 4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin içeren Mueller-Hinton agara ekilmiş, 35°C'de 24 saat inkübe edilmiş, bir koloniden fazla üreme oksasilin (metisilin) direnci olarak değerlendirilmiştir. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 (duyarlı) kullanılmıştır.

BULGULAR

Stafilokok suşlarındaki metisiline direnç oranları tablo 1'de, metisilin direnci ile diğer antibiyotiklere direnç ilişkisi ve farklılıkların anlamlılık derecesi tablo 2'de gösterilmiştir. Vankomisine dirençli suş bulunmamıştır.

Tablo 1: Stafilocok suşlarında metisiline direnç [n (%)].

Suşlar (n)	Metisiline dirençli	Metisiline duyarlı
<i>S. aureus</i> (67)	45 (% 67.2)	22 (% 32.8)
KNS (336)	182 (% 54.2)	154 (% 45.8)
Toplam (403)	227 (% 56.3)	176 (% 43.7)

S.aureus ve KNS suşlarında direnç farklılığı $p>0.05$.

TARTIŞMA

Stafilokoklarda metisilin direnci ilk kez 1961 yılında gösterilmiştir. 1980'li yıllardan sonra metisiline dirençli suşlar önemli bir hastane infeksiyonu etkeni olmuştur. Direncin sebebi beta-laktam antibiyotiklere düşük afinitesi olan penisilin bağlayan protein 2a veya 2' (PBP 2a) olarak adlandırılan bir proteindir. Bu protein bakteri kromozomunda lokalize *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* genine sahip stafilocok

Tablo 2: Metisilin direnci ile diğer antibiyotiklere direnç ilişkisi [n (%)].

Suşlar (n)	Eritromisin	Siprofloksasin	Gentamisin	Tetrasiklin	Trimetoprim-sulfametoksazol
Metisiline dirençli <i>S.aureus</i> (45)	34 (75.6)	23 (51.1) ^x	13 (28.9)	10 (22.2)	13 (28.9)
Metisiline duyarlı <i>S.aureus</i> (22)	15 (68.2)	1 (4.5)	6 (27.3)	4 (18.2)	5 (22.7)
Metisiline dirençli KNS (182)	111 (61.0) ^x	161 (88.5) ^x	72 (39.6) ^x	77 (42.3) ^x	32 (17.6)
Metisiline duyarlı KNS (154)	54 (35.1)	15 (9.7)	29 (18.8)	37 (24.0)	27 (17.5)
Toplam (403)	212 (52.6)	200 (49.2)	130 (32.3)	136 (33.7)	78 (19.4)
Metisiline dirençli (227)	145 (63.9) ^x	184 (81.1) ^x	85 (37.4) ^{xx}	87 (38.3) ^{xxx}	45 (19.8)
Metisiline duyarlı (176)	67 (38.1)	16 (9.1)	45 (25.6)	49 (27.8)	33 (18.8)

Metisiline dirençli suşlarda duyarlılara göre direnç yükseklği: ^x $p<0.001$, ^{xx} $p<0.01$, ^{xxx} $p<0.05$, diğerleri $p>0.05$.

suşları metisiline intrinsek direnç gösterirler ve tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidirler.

Elde ettiğimiz sonuçlar, stafilkoklarda metisiline direncin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda metisilin direnci KNS'da % 21.3-56 ve *S. aureus*'larda % 11-64 arasında saptanmıştır^(10,14,15). Özkalp ve ark.⁽¹⁴⁾ yaptıkları çalışmada MRSA oranını % 20.6 olarak bildirmektedir. Yu ve ark.⁽²⁰⁾ ise metisiline direnci *S.aureus*'larda % 56, koagülaz negatif stafilkoklarda % 47.6 olarak saptamışlardır. Stafilkoklarda metisiline karşı direncin yıllar içinde arttığı dikkat çekmektedir. Farklı çalışmalarda MRSA oranları yıllara göre 1988'de % 31.7, 1992'de % 35.3, 1994'de % 31.6, 1998'de % 36.1, 2000'de % 60.2, 2001'de % 64 olarak tespit edilmiştir^(2,7,8,9,18,19). Tiemersma ve ark.⁽¹⁷⁾ Avrupa'da yaptıkları taramada 1999 ile 2002 yılları arasında MRSA oranını % 5-20 olarak saptamışlardır.

Metisiline intrinsek heterojen direnç gösteren stafilkok suşları, beta-laktam dışı antibiyotiklere de (eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, sülfonamidler, fluorokinolonlar, aminoglikozidler) sıklıkla çoklu direnç göstermektedir⁽⁵⁾. Bu durum özellikle stafilkoklara bağlı nozokomiyal epidemilerde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Özkalp ve ark.⁽¹⁴⁾ MRSA'larda eritromisine % 58.6, trimetoprim-sulfametoksazole % 37.6, Kaleli ve ark.⁽⁹⁾ MRSA'larda trimetoprim-sulfametoksazole % 44 direnç bulunduğunu bildirmektedir.

Cuevas ve ark.⁽³⁾ 1986'dan 2002'ye kadar *S.aureus* ve KNS'da antibiyotik direncine bakmışlar; 1986 ve 2002'de metisilin direncini *S.aureus* suşlarında % 1.5 ve % 31.2, KNS suşlarında % 32.5 ve % 61.3; eritromisin direncini *S.aureus*'da % 7 ve % 31.7, KNS'da % 41.1 ve % 63; gentamisin direncini *S.aureus*'da % 5.2 ve % 16.9, KNS'da % 25.4 ve % 27.8; siprofloksasin direncini *S.aureus*'da % 0.6 ve % 33.9, KNS'da % 1.1 ve % 44.9 olarak bildirmişlerdir.

Durmaz ve ark.⁽⁴⁾ nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda *S.aureus*'un çeşitli antibiyotiklere direncine bakmışlar; MRSA oranını % 31.3, MRSA'larda diğer antibiyotiklere direnci eritromisin için % 71, klindamisin için % 54, gentamisin için % 52, trimetoprim-sulfametoksazol için % 44.5, siprofloksasin için % 36 olarak saptamışlardır.

Gönlüğü ve ark.⁽⁶⁾ 1999 ile 2002 yılları arasında *S.aureus* suşlarını incelemişler ve metisiline % 76.9, eritromisine % 61.9, tetrasikline % 56.6, gentamisine % 50.7, ofloksasine % 42, trimetoprim-sulfametoksazole % 10.2 oranında direnç bulmuşlar, vankomisine direnç saptamamışlardır.

Köksal ve Samastı⁽¹⁰⁾ çalışmalarında MRSA'larda eritromisine % 75, siprofloksasine % 82, gentamisine % 98, tetrasikline % 85, trimetoprim-sulfametoksazole % 37; metisiline dirençli KNS'da eritromisine % 77, siprofloksasine % 66, gentamisine % 89, tetrasikline % 59, trimetoprim-sulfametoksazole % 62 oranında direnç saptamışlardır.

Metisiline dirençli stafilkoklarda makrolid grubu antibiyotiklere ve siprofloksasine karşı yüksek oranlarda direnç geliştiği bildirilmektedir. Yaptığımız çalışma da MRSA ve MRKNS'in eritromisine (% 75.6 ve % 61) ve siprofloksasine (% 51.1 ve % 88.5) direnç oranlarının yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Yaptığımız çalışma metisiline ve beta-laktam dışı antibiyotiklere karşı direncin arttığını göstermektedir. Birçok çalışmada metisiline dirençli KNS oranları MRSA oranlarına göre daha yüksek olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise, anlamlı fark olmasa da (p>0.05), MRSA (% 67.2) oranı metisiline dirençli KNS (% 54.2) oranına göre daha yüksek olarak saptanmıştır. Hasta grubumuzun % 70'ini yatan hastaların oluşturması ve hastanede yatış süresinin hastane enfeksiyonu etkeni olan MRSA oranını artırmasının sonuçlarımızı etkilediği düşünülebilir.

MRSA suşlarında duyarlı suşlara göre sadece siprofloksasin direnci anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.001). Diğer antibiyotikler için dirençli oranları daha yüksek bulunmuşsa da, muhtemelen suş sayısının azlığından anlamlı bir fark oluşmamıştır.

MRKNS suşlarında ise eritromisin, siprofloksasin, gentamisin ve tetrasiklin direnci duyarlı suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0.001).

Trimetoprim-sulfametoksazole karşı ise metisiline duyarlı ve dirençli stafilkoklarda direnç farklılığı saptanmamıştır.

Stafilkoklar hem metisilin direncine, hem de çoklu ilaç direncine sahiptir. Antibiyotik kullanımının kontrolsüz olması ve ampirik tedavilerde yanlış tercihlerin olması direnç probleminin artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle stafilkok enfeksiyonlarında, MRSA ve MRKNS'da diğer antibiyotiklere karşı da direnç söz konusu olduğu için antibiyotik seçimi duyarlılık testlerine göre yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Archer GL, Climo MW: Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci, Antimicrob Agents Chemother 1994;38(10):2231-7.
2. Arıkan S, Tunçkanat F, Özalp M, Günel A: Staphylococcus aureus suşlarında bazı makrolid antibiyotiklere ve trimetoprim-sulfametoksazole duyarlılığın metisilin direnciyle karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi, Mikrobiyoloji Bül 1995;29(4):333-7.
3. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, Bouza E: Evolution of the antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002, Antimicrob Agents Chemother 2004;48(11):4240-5.
4. Durmaz B, Durmaz R, Şahin K: Methicillin-resistance among Turkish isolates of S. aureus strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents, J Hosp Infect 1997;37(4):325-9.

5. Dündar V: Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları, *Klimik Derg* 2000;13(Özel sayı):26-7.
6. Gönügür U, Akkurt I, Özdemir L, Bakıcı MZ, İçağasıoğlu S, Gültekin F: Antibiotic susceptibility patterns of respiratory isolates of *S. aureus* in a Turkish university hospital, *Acta Microbiol Pol*, 2003;52(2):143-8.
7. Gündeş SG, Karadenizli A, Willke A: Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında çoğul antibiyotik direncinin değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Derg* 2001;15(3):303-6.
8. İnan M, Özgenç O, Oran E, Sancaktaroğlu İ: Koagülaz-pozitif ve koagülaz-negatif stafilokokların in vitro antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 1992;6(4):303-6.
9. Kaleli İ, Şengül M, Özen N, Akşit F: *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı, *İnfeksiyon Derg* 1998;12(3):351-4.
10. Köksal F, Samastı M: Kan kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 2002;16(1):10-3.
11. Mitchell BA, Brown MH, Skurray RA: QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines and guanyldrazones, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(2):475-7.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 11th Informational Supplement M 100-S11, NCCLS, Villanova, PA (2001).
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 12th Informational Supplement M 100-S12, NCCLS, Villanova, PA (2002).
14. Özkalp B, Baybek H: Klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları, *Genel Tıp Derg* 2003;13(2):65-8.
15. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün G: Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yatan hastalardan izole edilen stafilokokların antimikrobik maddelere duyarlılığı, *ANKEM Derg* 1996;10(1):48-51.
16. Paulsen IT, Firth N, Skurray RA: Resistance to antimicrobial agents other than beta-lactams, "Crosley KB, Archer GL (eds): *The Staphylococci in Human Disease*" kitabında s.175-212, Churchill Livingstone, New York (1997).
17. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H, European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants: Methicillin-resistant *S.aureus* in Europe, 1999-2002, *Emerg Infect Dis* 2004;10(9):1627-34.
18. Töreci K, Gürler N, Çalangu S, Sarpel C, Eraksoy N, Özsüt H, Çetin ET: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated in İstanbul, *ANKEM Derg* 1988;2(4):265-71.
19. Ünlü G, Ünlü M: Yara örneklerinden soyutlanan *Staphylococcus aureus* kökenlerinin glikopeptid antibiyotiklere duyarlılığı, *İnfeksiyon Derg* 2001;15(2):239-42.
20. Yu Q, Yin Q, Zhou R, Cheng X: Resistant antibiotic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus*, *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1997;28(3):329-33.