

STAFİLOKOKLarda METİSİLİN DİRENÇ MEKANİZMALARI VE BELİRLENMESİ

Ayşe WILLKE

Mechanisms and detection of methicillin resistance in staphylococci.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının tanımlanması ilk kez 1960'larda metisilinin klinik kullanımına girmesiyle hemen hemen aynı tarihlerde olmuştur. Önce Avrupa'da, sonra A.B.D., Avustralya gibi ülkelerde MRSA'ya bağlı infeksiyonlar; gerek hastane salgınları şeklinde, gerekse endemik şekilde sıkılıkla görülmeye başlamıştır (7). Başlangıçta büyük eğitim hastanelerinin nozokomiyal patojeni olarak beliren MRSA, hastaneler arası hasta naklinin yaygın olduğu günümüzde hemen tüm hastanelerde sorun olmakla kalmayıp, hastane dışı infeksiyonlardan da sorumlu olabilmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda koagülaz pozitif stafilocoklar içindeki oranı % 31-48 arasında değişmektedir (1,2,15).

Diğer yandan koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) girişimsel tanı ve tedavi yöntemlerinin kullanımının artması ile fırsatçı infeksiyon etkeni olarak artan sayıda saptanmaktadır, bu bakterilerdeki metisilen direnci de önem kazanmaktadır (12).

Metisiline dirençli stafilocoklar diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabileceği için bunların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanmaları ayrı bir önem taşımaktadır. Dirençli suşların duyarlı olarak rapor edilmesi özellikle sepsis, endokardit gibi ciddi infeksiyonlarda, hastanın hayatına mal olabilen tedavi başarısızlıklarına yol açar. Bu nedenle klinik bakteriyoloji laboratuvarlarında bu konuya gereken önem verilmeli, özen gösterilmelidir.

Bu konu hakkında metininde stafilocoklarda metisilen direncinin mekanizmaları tartışıldıktan sonra, bu suşların belirlenmesine yönelik öneriler üzerinde durulacaktır.

Stafilocoklarda metisilen direncinin mekanizmaları

1. İntrinsik metisilen direnci: *S.aureus*'lardaki metisilen direncinin en çok araştırılmış, en iyi belirlenmiş olanıdır. Bu tip direnç gösteren *S.aureus*'lara MRSA denmektedir.

MRSA suşlarındaki dirençlilik; bu bakterilerin normal penisilin bağlayan proteinlerden (PBP) farklı olarak beta-laktam antibiyotiklere daha düşük affinitesi olan, PBP_{2a} veya PBP2 denilen PBP'leri nedeniyedir (4,8). Bilindiği gibi; PBP'ler hücre membranında bulunan, bakteride penisilin etkisinin primer biyokimyasal hedefleridir. Bu proteinler aynı zamanda hücre duvar sentezi sırasında peptidoglikan polimerlerinin çapraz bağlanması reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Beta-laktamlar PBP'lerin aktif kısımlarından kovalen bağlarla bağlanırlar. Metisilen duyarlı stafilocoklarla (MSSA) MRSA'lar arasındaki esas farklılık PBP'lerindeki farklılıktır. MRSA'larda PBP_{2a}'nın diğer PBP'lerden molekül ağırlığı çok az farklıdır, ancak beta-laktam antibiyotiklere bağlanma eğilimi düştür. Diğer yandan PBP_{2a} yüksek antibiyotik yoğunlığında muhtemelen bakterideki diğer PBP'lerin fonksiyonunu da üstlenmektedir, aksi takdirde normal PBP fonksiyon eksikliği nedeniyle bakterinin ölümü söz konusu olacaktır (4,14).

MRSA'da PBP_{2a} oluşturulması kromozomal kontroldedir; çoğu zaman metisilen veya diğer beta-laktamların varlığında induklenebilir (inducible), bazen da yapısaldır (constitutive).

Yapışal oluşturulan PBP_{2a} içeren MRSA'ların direnç fenotipi homojendir, yani bakteri topluluğundaki tüm bireyler dirençlidir. İndüklenebilir PBP_{2a} içeren MRSA'larda ise direnç fenotipi heterojendir, aynı bakteri topluluğunda dirençli suş oranı 1/10³-1/10⁸ arasında değişir. Buna heterorezistans da denir (4,8,13). PBP_{2a} yapımına bağlı metisilen direncinin stafilocoklarda genetik temeli oldukça iyi anlaşılmıştır. Yapılan genetik çalışmalarında PBP_{2a}'nın *mec* ya da *mecA* geni denilen bir kromozal genin 2.1 kilobase'lik bir kısmı ile kodlandığı gösterilmiştir. Kotransduksiyon çalışmaları ile MSSA'larda *mecA*'ya uygun alel gösterilememiştir (8).

Yapılan çalışmaların verileri PBP_{2a} geninin, stafilocokların beta-laktamaz geni ile diğer cins bakterilerin PBP genlerinin füzyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir (4,8).

MRSA'larda *mec* geninin ekspresyonunu etkileyen, fenotipi belirleyen en az üç regülasyon mekanizması vardır. Bunlardan birincisi; PBP_{2a} oluşumunun bakteride hem *mecA* geni hem de beta-laktamaz plazmidi varsa, beta-laktamlar tarafından induklendiği gözlemine dayanmaktadır. Bu nedenle beta-laktamaz geninin kontrolü ile PBP_{2a} geninin benzer olduğu düşünülmektedir. İkinci regülasyon mekanizması *mec* geni içindeki bir kısmın PBP_{2a} yapımını regule ettiği, bunun da fenotipi etkilediği, üçüncüsü ise *mecA* dışında bir yerde lokalize olan *femA* geni tarafından metisilin direncinin ekspresyonunun belirlendiğidir (4,5,6,8,11,13).

İntrinsik metisilin direnci KNS'larda da vardır, ancak çok iyi incelenmemiştir.

2. "Borderline" metisilin direnci: Buna kazanılmış metisilin direnci denmektedir. Metisiline karşı bakteri direncinin azalmasının bir diğer mekanizması 1984'de McDougal ve Thornsberry (10) tarafından tanımlanan, stafilocokların aşırı beta-laktamaz üretimiyle bağlı dirençliliğidir. Bu suşlar metisilene sınırlı bir direnç gösterdiği için bunlara "borderline" *S.aureus* (BOSRA) denmektedir. Penisilinaza dirençli penisilinler (PRP) sırasında stafilocokların penisilinaz enzimlerinin hidrolitik etkilerine dayanıklıdır. Ancak bazı stafilocok suşları aşırı miktarda penisilinaz oluşturarak metisilin ve oksasilini yavaş fakat önemli ölçüde parçalar. Ortama sulbaktam veya klavulanat eklendiğinde bu suşlara karşı PRP'lerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) bir kaç misli düşmektedir. BOSRA suşları PBP_{2a} oluşturmamaları ve direnç kontrolünün plazmide bağımlı olmasıyla MRSA'lardan farklıdır (10).

3- "Intermediate" metisilin direnci: Stafilocoklarda modifiye PBP'lere bağlı metisilene duyarlılık azalmasıdır. Bu tip dirençli suşlara MODSA denmektedir. MODSA suşları normal yapıda PBP1 ve PBP2 içerirler ancak bu PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere affinitesi düşüktür. Ayrıca MODSA suşlarında normalden fazla miktarda PBP4 vardır. MODSA suşlarındaki direnç mekanizması pnömokoklardaki penisilin direncini andırır (4,7,9). MODSA, MRSAs ve BOSRA suşlarının metisilin ve oksasiline MIC değerleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *S.aureus*'ta semisentetik penisilinlere duyarlılığı azaltan direnç mekanizmaları.

Kategori	Mekanizma	Beklenen MIC $\mu\text{g}/\text{ml}$	
		Mesisilin	Oksasilin
MRSA (intrinsik direnç)	PBP2a oluşumu	≥ 16	≥ 4
BOSRA (sınırlı direnç)	Aşırı beta-laktamaz üretimi	2-4	1-2
MODSA (modifiye PBP'ler)	Normal yapıda düşük affiniteli PBP 1,2,4 oluşumu	4	1-2

Metisilene dirençli *S.aureus*'ların laboratuvar tanısı

MRSA'ların laboratuvara rutin yöntemlerle tanımlanması yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu yanlışlıklardan bir kısmı MRSA'ların gerçek olmayarak duyarlı çıkmalarıyla ilgili olanlardır. Bununla ilgili hatalar genellikle subpotent antibiyotik disklerinin (özellikle metisilin diskleri) kullanılması ve kültürlerin karışık olmasına bağlıdır. Özellikle enterokok, difteroid, KNS ile *S.aureus*'ların karışık kültürleri buna yol açabilir.

Diğer yandan antibiyotik duyarlılık testlerinde MRSA'ların gerçeğe uymayan bir şekilde metisilene duyarlı olarak saptanması daha sık görülen bir durumdur (3). Bu yalancı duyarlılığın nedeni MRSA'lardaki direnç fenotipinin heterojen olmasıdır. Bu nedenle gerçek MRSA'ların saptanmasına yönelik yöntem arayışları daha çok PBP_{2a}'ya bağlı intrinsik metisilin direncini saptamaya yönelikdir. MRSA'ların saptanmasında hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın aşağıda sayılan özellikler akılda tutulmalıdır:

1. MRSA'lar 30-35 °C'de 37 °C'den daha iyi ürerler.
2. MRSA'lar rutinde kullanılan tuz yoğunluğundan daha yüksek tuz yoğunluğunda daha iyi ürerler.
3. Kültürden kültüre farklı olmakla birlikte MRSA kolonileri daha küçüktür.

4. MRSA'lar daha yavaş ürediklerinden en az 24 saat, optimal 48 saatlik inkübasyona gereksinim vardır.

5. Hetererezistan suşlar bakteri populasyonunda az sayıda olduğu için duyarlılık testi için kullanılan bakteri süspansiyonunun daha yoğun bakteri içermesi gerekmektedir.

6. Bakteri süspansiyonunun bir gece veya 24 saat inkübe edilmiş katı besiyerindeki bakteriden hazırlanması gerekmektedir; çünkü burada dirençli bakteri oranı daha fazladır.

7. PRP diskı olarak oksasılın diskleri kullanılmalıdır. Çünkü oksasılın daha stabildir ve MRSA'ları saptamada daha sağlıklı sonuçlar vermektedir.

8. Antibiyogramı yapılan *S.aureus* suşu diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençli, metisiline duyarlı ise test tekrarlanmalıdır.

MRSA saptanmasına yönelik yöntemler tablo 2'de özetlenmiştir. Bunlar içinde en kullanışlı olanı mikrotüp dilüsyon yöntemidir (12). Bu yöntem kullanıldığı takdirde % 2'lük NaCl solusyonu yalnızca PRP içeren çukurlara damlatılabilir. Diğer yandan BORSA suşlarını saptamak disk difüzyon testi ile daha kolaydır. BORSA zon içinde minik koloniler şeklinde ürer, penisilin çok dar bir zon verirken beta-laktamaz inhibitörü içeren diskler çevresinde büyük zonlar verir.

Tablo 2. MRSA saptanmasında güvenilir in-vitro test yöntemleri (7).

Yöntem	Besiyeri/antibiyotik	İnokulum	İnkübasyon	MRSA için beklenen değerler
Mikrotüp dilüsyon	%2 NaCl içeren Mueller-Hinton buyyon, metisilin veya oksasılın	5x10 ⁵ cfu/ml, direkt süsp.	35C'de, 24 saat	Met. MIC ≥16µg/ml Oks. MIC ≥4µg/ml
Oksasılın agar tarama testi	%4 NaCl ve 6mcg/ml oksasılın içeren Mueller-Hinton agar	1x10 ⁸ cfu/ml, direkt spot inokülasyon	35C'de, 24 saat	Agar yüzeyinde ayrı, spot üreme
Disk difüzyon testi	1mcg'lık oksasılın veya 5mcg'lık metisilin diskı	1x10 ⁸ cfu/ml, agar yüzeyine yayma	35C'de, 24 saat	Metisilin zonu ≤9mm Oksasılın zonu≤10 mm

MRSA'ların saptanmasında otomatize veya alete dayalı antibiyotik duyarlılık testleri çok güvenilir değildir ve celişkili sonuçlar verir (7).

Sonuç olarak denilebilir ki; MRSA'ların laboratuvar tanısında bazı yöntemler önerilmekte birlikte bu suşların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha hızlı ve daha güvenilir şekilde saptanmasına yönelik yeni testlere (örn:PBP2a saptamaya yönelik ticari nükleik asit problemleri gibi) gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Akalın H E, Çelik E, Baykal M, Kardeş T: Metisiline dirençli *Staphylococcus*'ların bazı antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 1: 122 (1987).
2. Akgül A, Dündar V, Metin T, Selçuk S: Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde burun taşıyıcılarından izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında oksasılın direnci, *ANKEM Derg* 5: 159 (1991).
3. Fleming D W, Helgerson S D, Mallory B L, Foster L R, White M C: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: How reliable is laboratory reporting? *Infect Control* 7: 184 (1986).
4. Hackbart C J, Chambers H F: Methicillin resistant staphylococci: Detection methods and treatment of infections, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 995 (1989).
5. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T: Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mec A* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 600 (1990).
6. Jacoby G A, Archer G L: New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, *N Engl J Med* 324: 601 (1991).
7. Jorgensen J H: Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection, *Infect Control Hosp Epidemiol* 12: 14 (1991).
8. Lyon B R, Skurray R: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis, *Microbiol Rev* 51: 89 (1987).

9. Malouin F, Bryan L E: Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 30: 1 (1986).
10. McDougal L K, Thornsberry C: The role of betalactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins, *J Clin Microbiol* 23: 832 (1986).
11. Tesch W, Eyffel C, Strassle A, Kayser F H, Berger-Bachi B: Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 1703 (1990).
12. Thornsberry C: Methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci, *ANNLDO* 1 (6): 43 (1984).
13. Tomasz A: Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics, *Rev Infect Dis* 8: S260 (1986).
14. Tomasz A, Nachman S, Leaf H: Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 124 (1991).
15. Töreci K, Gürler N, Çalangu S, Sarpel C, Eraksoy H, Özşüt H, Çetin E T: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated in İstanbul, *ANKEM Derg* 2: 265 (1988).