

# STAFİLOKOK SUŞLARININ TEİKOPLANİN DUYARLILIKLARININ FARKLI YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep GÜLAY, İ. Mehmet Ali ÖKTEM, Meral BİÇMEN, Tuba ATAY, Nuran YULUĞ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 30'ar metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ile 8 metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) ve 32 metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok (MSKNS) suşunun teikoplanin duyarlılıkları disk difüzyon, E-test ve mikrodilüsyon yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi ve aralarındaki uyum araştırıldı. E-testi ve mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçlarında  $\pm 1$  dilüsyon içerisinde yer alan değerler uyumlu olarak kabul edildi. Disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri arasındaki uyum ise hem direnç kategorilerine hem de MİK değerleri ve inhibisyon zon çaplarının uyumuna göre değerlendirildi. Direnç kategorileri ele alındığında disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen sonuçlar arasındaki uyum %99, disk difüzyon ve E-test arasındaki uyum %99 olarak belirlendi. Disk difüzyon ile elde edilen sonuçların duyarlılık kategorileri her ne kadar E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilenlerle benzer olsa da zon çapları ile MİK değerleri arasındaki korelasyonun düşük olduğu saptandı. MİK değerleri ele alındığında, E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile alınan sonuçların % 66 oranında uyumlu olduğu bulundu. Sonuç olarak, teikoplanin duyarlılık testleri açısından kriterlerin yeniden gözden geçirilmesinin gerekli olduğu düşünüldü.

**Anahtar sözcükler:** *Staphylococcus* sp. Teikoplanin, duyarlılık test metodları.

## SUMMARY

Teicoplanin susceptibilities of 30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 30 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), 8 methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) and 32 methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci (MSCoNS) strains which had been isolated from various clinical materials were evaluated comparatively by the disk diffusion, E-test and microdilution methods and the correlation among these methods was analysed. For the E-test and microdilution method MICs within the accuracy limits of  $\pm 1$  dilution were regarded as agreement. Agreement between the susceptibility categories and the correlation between the MIC values and inhibition zone sizes were evaluated for the disk diffusion and microdilution methods. The correlations between the results obtained by the disk diffusion and microdilution method; by the disk diffusion and E-test as 99 % and 99 % respectively. Although the results of the susceptibility categories obtained by the disk diffusion were similar to those assessed by the microdilution and E-test the correlation among the zone diameters and MIC values were significantly low. When the MIC values were considered the correlation between the E-test and microdilution results were assessed as 66 %. In conclusion, it was deduced that susceptibility testing methods and criteria for teicoplanin should be re-evaluated.

**Key words:** *Staphylococcus* sp. Teicoplanin, Susceptibility test methods.

Stafilokoklar deri ve yumuşak doku infeksiyonları, septik artrit, osteomyelit etkenleri arasında ilk sırada karşımıza çıkmakta, bunlar yanısıra yatan hastalarda cerrahi yara infeksiyonlarından toksik şok ve organ yetmezliklerine kadar değişen tablolara yol açabilmektedir (1,2). Günümüzde özellikle beta-laktamazlara dayanıklı bir penisilin türeviden olan metisiline dirençli stafilokok suşları, beta laktam ajanların yanısıra, kinolonlar, makrolidler, aminoglikozidler gibi değişik antibiyotik gruplarına da dirençli olmaları nedeniyle tüm dünyada sorun oluşturmaktadır (3). Bu suşlar için önde gelen tedavi seçeneği glikopeptid antibiyotiklerdir.

Teikoplanin, yapısal olarak vankomisine benzerlik gösteren bir glikopeptid ajan olup gram pozitif aerob ve anaerob bakterilere karşı etkindir. Yukarıda da belirtildiği gibi, özellikle metisiline dirençli stafilokoklar ile gelişen infeksiyonların tedavisinde glikopeptid antibiyotikler önemli bir yer tutmaktadır. Buna karşın önce enterokoklarda son yıllarda ise stafilokoklarda da bu grup antibiyotiklere karşı direnç gözlenmesi dikkatleri bu direncin saptanabilmesi amacıyla uygulanan antibiyotik duyarlılık testlerine yöneltmektedir (4,5). Glikopeptid antibiyotiklere azalmış duyarlılığın saptanmasında teikoplanin ile uygulanan testlerin vankomisine kıyasla daha yol



gösterici olduğu belirtilmektedir (5). Ancak, teikoplanin molekülünün büyük olması nedeniyle agarda difüzyonunun zayıf olduğu buna bağlı olarak da disk difüzyon sonuçları ile mikrodilüsyon sonuçları arasında uyumsuzluk bulunabildiği bildirilmektedir (6).

Teikoplanin duyarlılığının değerlendirilmesinde disk difüzyon E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılabilir (7). Bu çalışmada, teikoplaninin stafilocok suşları üzerine in vitro etkinliğini farklı yöntemlerle araştırdık. Böylelikle hastanemiz stafilocok izolatlarının teikoplanin duyarlılığını ve bu duyarlılığı belirlemede kullanılacak en güvenilir yöntemi değerlendirmeyi amaçladık.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

**Suşlar:** Çalışmaya Haziran-Aralık 1998 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden soyutulan 30 MRSA, 30 MSSA, 32 MSKNS, 8 MRKNS suşu alındı. MRSA ve MRSE tanımlaması için 6 µg/ml'lik oksasilin agar tarama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, Mueller Hinton agar içerisine 6µg/ml olacak şekilde oksasilin ilave edilerek besiyerleri hazırlandı. Teikoplanine duyarlılık testleri sonucu "orta dirençli" bulunan suşlar Vitek (Biomerieux, Pasteur) otomatik identifikasyon sistemi ile tiplendirildi.

**Antibiyotik duyarlılık testleri** Suşların teikoplanine duyarlılıkları NCCLS önerilerine uyularak disk difüzyon, E-test ve mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirildi (8,9). Disk difüzyon yönteminde inhibisyon zon çapı  $\geq 14$  mm olan suşlar teikoplanine

duyarlı, 11-13 olanlar orta duyarlı,  $\leq 10$  mm olanlar dirençli; mikrodilüsyon yönteminde ve E-testde ise MİK değerleri sırası ile  $\leq 8$ , 16 ve  $\geq 32$ µg/ml olan suşlar, duyarlı, orta ve dirençli olarak değerlendirildi (8,9). Duyarlılık testlerinin uygulanmasında kalite kontrolü amacıyla Staphylococcus aureus ATCC 25923 suşu kullanıldı.

**İstatistiksel Analiz:** Teikoplanin E-test ile disk difüzyon ve mikrodilüsyon değerleri ve disk difüzyon sonuçları SPSS bilgisayar programı 8.0 versiyon kullanılarak Pearson'un korelasyon yöntemi ile karşılaştırıldı ve lineer regresyon eğrileri çizildi (10).

#### BULGULAR

Çalışmaya alınan MRSA suşlarının tümü kullanılan her üç yöntem ile de teikoplanine duyarlı bulundu (Tablo I). Koagülaz negatif stafilocok suşları değerlendirildiğinde mikrodilüsyon yöntemi ile bu suşların tümünün teikoplanine duyarlı olduğu saptandı (Tablo I). Mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile teikoplanine duyarlı olarak değerlendirilen bir MSKNS suşu E-test yöntemi ile "orta dirençli" bulundu (MİK 16 µg/ml). Yine bir MRKNS suşu ise E-test ve disk difüzyon yöntemi ile teikoplanine "orta dirençli", mikrodilüsyon yöntemi ile ise duyarlı olarak değerlendirildi.

E-test yöntemi ile orta dirençli olarak bulunan koagülaz negatif stafilocok suşları tiplendirildiğinde metisiline duyarlı olan suşun Staphylococcus haemolyticus diğeri ise Staphylococcus epidermidis olduğu bulundu.

Tablo I. MRSA, MSSA, MRSE ve MSSE suşlarının teikoplanin duyarlılıkları

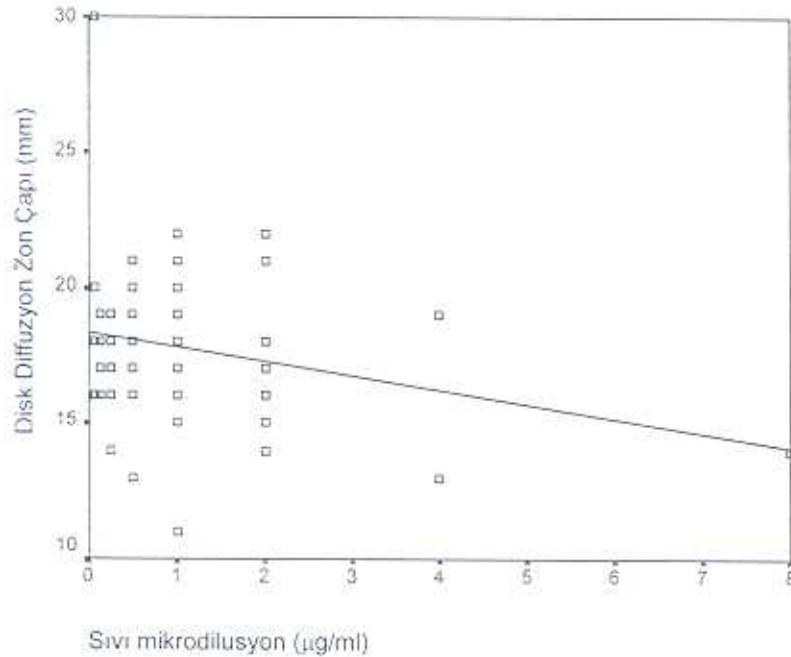
Suş (sayı)	E-TEST				Mikrodilüsyon			
	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	Dağılım	%*	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	Dağılımı	%*
MRSA (30)	1	1	0.125-4	100	0.5	1	0.125-2	100
MSSA (30)	0.75	1.5	0.125-1.5	100	0.5	1	0.06-2	100
MRKNS (8)	2	8	0.5-16	87	1	2	0.125-4	100
MSKNS (32)	1.5	3	0.06-12	97	1	2	0.06-8	100

\*:Yüzde duyarlılık

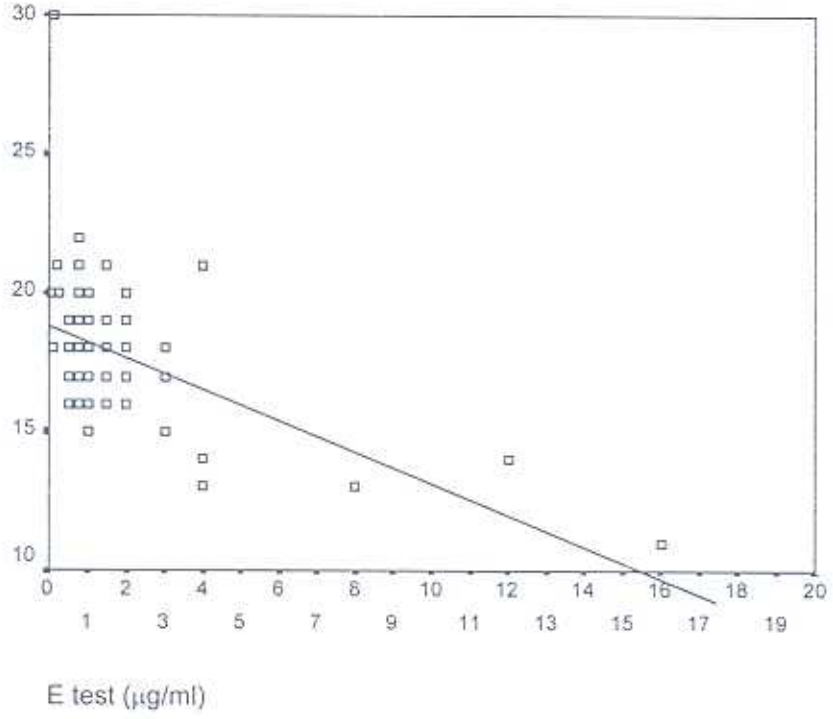
Disk difüzyon ve E-test, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen teikoplanin duyarlılık sonuçları kategorilerine göre karşılaştırıldığında %99 oranında uyumlu bulundu. Disk difüzyon ile elde edilen zon çapları E-test ve mikrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen MİK değerleri ile karşılaştırıldığında aralarındaki korelasyonun düşük olduğu (E-test için  $r=-0.5$  ve mikrodilüsyon için  $r=-0.2$ ) ve zon çaplarının genellikle 16 mm ve 20 mm arasında bir grup oluşturarak toplandığı belirlendi (Şekil 1,2). E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinde  $\pm 1$  dilüsyon uyumlu olarak kabul edilerek bu yöntemlerle elde edilen MİK değerleri karşılaştırıldığında ise uyum oranının % 66 olduğu saptandı (Şekil 3).

Teikoplanin özellikle metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde vankomisin yanısıra başarıyla kullanılan glikopeptid grubu bir antibiyotiktir.

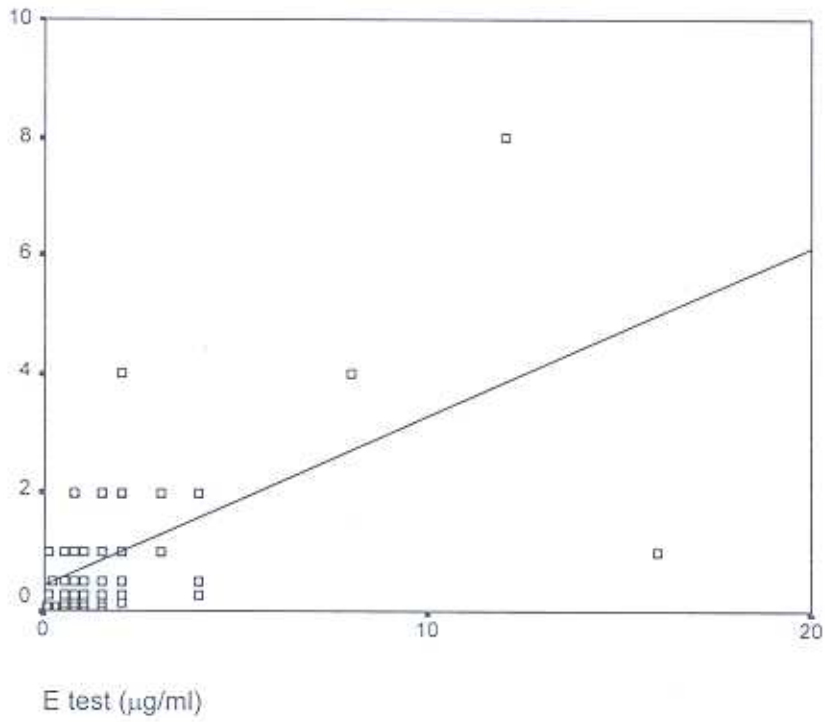
Ancak son yıllarda glikopeptid grubu antibiyotiklere direnç gelişiminin bildirilmeye başlanmasıyla, bu grup içerisinde yer alan teikoplanin ve vankomisin gibi antibiyotiklerin duyarlılık test sonuçları daha da önem kazanmıştır (4,5). Teikoplanin molekülünün büyük olması nedeniyle agarda difüzyonu zayıftır (6). Buna bağlı olarak da disk difüzyon metodlarında elde edilen zon çapları genellikle dar olmaktadır. Bu çalışmada incelenen *S. aureus* suşlarının tümü her üç yöntemle de teikoplanine duyarlı bulunurken, iki koagülaz negatif stafilokok suşunun teikoplanin duyarlılığı "orta dirençli" olarak değerlendirilmiştir. Bu suşlar Vitek otomatik analiz sistemi ile tiplendirildiğinde metisiline duyarlı olanın *Staphylococcus haemolyticus*, metisiline dirençli olanın ise *Staphylococcus epidermidis* olduğu gözlenmiştir. *S. haemolyticus* ve *S. epidermidis*'in teikoplanin duyarlılıkları ile ilgili çalışmalarda bu türlerde teikoplanin direncine daha sık olarak rastlandığı görülmektedir (11-15).



Şekil 1. Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen teikoplanin duyarlılık sonuçlarının lineer regresyon eğrisi



Şekil 2. Disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile elde edilen teikoplanin duyarlılık sonuçlarının lineer regresyon eğrisi



Şekil 3. E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile elde edilen teikoplanin duyarlılık sonuçlarının lineer regresyon eğrisi



Kato ve arkadaşlarının (11) Japonya'da yaptığı bir çalışmada, 1980-1997 yılları arasında koagülaz negatif stafilokoklarda glikopeptid ajanların MIK değerlerinin giderek arttığı gözlemlenmiştir. Ena ve arkadaşlarının (12) yaptığı bir çalışmada, 525 gram pozitif patojen arasında bir *S. haemolyticus* suşu teikoplanine dirençli bulunmuştur. Low ve arkadaşlarının (13) yaptığı bir çalışmada, *S. epidermidis* suşları için MIK<sub>90</sub> 4µg/ml ve altında bulunurken oksasilin duyarlı ve dirençli *S. haemolyticus* suşları için sırası ile 8 ve 16 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Felmingham ve arkadaşlarının (14) gram pozitif bakterilerin glikopeptid duyarlılıklarını belirlemek için yaptıkları bir çalışmada, *S. haemolyticus* suşlarından %4.4'ü teikoplanine "orta dirençli", %3.3'ü de dirençli bulunmuştur.

Yine Jansen ve arkadaşlarının (15) yaptığı bir çalışmada da, teikoplanin direnci %10.7 olarak belirlenmiş ve dirençli suşların tümünün *S. haemolyticus* ve *S. epidermidis* türleri olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda bahsedilen iki suş dışında tüm diğer tüm izolatlar her üç yöntemle de teikoplanine duyarlı

bulunduğu halde disk difüzyon zon çapları ile E-test yöntemiyle elde edilen MIK değerleri arasında ve disk difüzyon zon çapları ile mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MIK değerleri arasında korelasyonun zayıf olduğu gözlenmiştir. E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MIK değerlerinde ±1 dilüsyon uyumlu olarak kabul edildiği halde iki yöntem ile elde edilen sonuçların ancak %66 sı uyumlu olarak bulunmuştur. Genel olarak mikro- dilüsyon yöntemiyle elde edilen MIK değerlerinin E-test ile elde edilen MIK değerlerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sümbül ve arkadaşlarının (16) yaptığı bir çalışmada da teikoplanin duyarlılığı açısından mikrodilüsyon ve E-test karşılaştırıldığında bizim sonuçlarımıza benzer olarak E-test ile daha yüksek MIK değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu farklılığın teikoplaninin agar difüzyonunun zayıf olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, teikoplanin duyarlılığının belirlenmesinde disk difüzyon ve E-test yöntemleri uygulama kolaylığı nedeniyle rutin açıdan uygun olmakla birlikte, gerek teikoplanin gerekse vankomisin duyarlılığının değerlendirilmesinde uygulanan yöntemlerin in vivo bulgular ışığında yeniden standardize edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Waldvogel FA, Staphylococcus aureus, In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases, fourth edition. New York: Churchill Livingstone, 1995;1489-1511.
2. Archer GL, Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci, In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases, fourth edition. New York: Churchill Livingstone, 1995; 1511-1518.
3. Çetinkaya Y, Unal S. Metisilin dirençli Staphylococcus aureus infeksiyonları: Epidemiyoloji ve kontrol. Flora 1996; 3 Ek, 3-16.
4. Hiramatsu K, Antaka N, Hanaki H et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350; 1670-1673.
5. Tenover FC, lancester MY, Hill BC et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 1998;36;1020-1027.
6. Acar JF, Goldstein FW, Disk susceptibility, In: Lorian V, ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, fourth edition. Baltimore: Williams & Wilkins Comp, 1996.
7. Martin E, Nouvellon M, Pestel M, Pons JL, Lemeland JF. Evaluation of the Epsilometer test (E-test) for testing the susceptibility of coagulase-negative staphylococci to teicoplanin. J Antimicrob Chemother 1995; 36; 83-91.

8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Fourth Edition, Wayne Pa:1997, NCCLS, Approved Standard M7-A4 (M100-37).
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Sixth Edition, Wayne Pa:1997, NCCLS Approved Standard M2-A6 (M 100-57).
10. SPSS for Windows release 6.0 Chicago, Ill.SPSS Inc: 1993.
11. Kato D, Hanaki H, Cui L, Ogun T, Hiramatsu K. In vitro susceptibilities of clinical isolates of coagulase negative staphylococci to glycopeptide antibiotics. *Jpn J Antibiot* 1998; 51: 735-745.
12. Ena J, Houston A, Wenzel RP, Jones RN. Trends in grampositive bloodstream organism resistance: a seven year audit of five glycopeptides and other drugs at a large university hospital. *J Chemother* 1993;5:17-21.
13. Low DE, Mc Geer A, Poo R. Activities of daptomycin and teicoplanin against staphylococcus haemolyticus and staphylococcus epidermidis, including evaluation of susceptibility testing recommendations. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 585-588.
14. Felmingham D, Brown DF, Soussy CJ. European Glycopeptide Susceptibility Survey of gram-positive bacteria for 1995. European Glycopeptide Resistance Surley Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31: 563-567.
15. Jansen B, Schumacher-Perdreau F, Pulverer G. Susceptibility of staphylococci and enterococci to glycopeptides comparison of 3 test methods. *Zentralbl Bakteriol* 1995; 282: 402-408.
16. Sümbül M, Eroğlu C, Çınar T, Hökelek M, Leblebicioğlu H. Stafilocok suşlarında vankomisin ve teikoplanin duyarlılığını belirlemede mikrodilüsyon ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem* 1998;12:483-487.