

# Staphylococcus aureus İzolatlarında Agar Tarama ve Mikrodilüsyon Yöntemleri ile Vankomisin Direncinin Araştırılması<sup>§</sup>

Özlem BUCAK\*, Esra KOÇOĞLU\*\*, Tekin TAŞ\*\*, Duygu TEKİN\*\*, Fırat Zafer MENGELOĞLU\*\*

\*Denizli Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı

\*\*Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında vankomisine azalmış duyarlılığın araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda işleme alınan toplam 131 *S. aureus* (45 MRSA ve 86 MSSA) izolatı çalışıldı. Vankomisin orta duyarlı *S. aureus* (VISA) araştırılmasında, 4 µg/ml ve 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar besiyeri kullanıldı. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde üreme değerlendirildi. Vankomisin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. *S. aureus* için vankomisin MİK değeri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü kriterlerine göre değerlendirildi. Kalite kontrol suşları olarak Mu3 hVISA, *S. aureus* ATCC 29213 (vankomisine duyarlı) ve laboratuvarımızda konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemle (BD Phoenix 100, ABD) tanımlaması yapılmış olan vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* kullanıldı.

**Bulgular:** Çalışmada tarama besiyerlerinde üreme gözlenmemiştir. Tüm izolatlarda vankomisin MİK değeri 0.25-2 µg/ml olarak bulunmuştur. MİK<sub>90</sub> ve MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir. Vankomisin MİK değerleri; *S. aureus* için 1 µg/ml, Mu3 suşu için 4 µg/ml ve *Enterococcus faecalis* suşu için >16 µg/ml olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Hastanemizde izole edilen *S. aureus* suşlarında vankomisine azalmış duyarlılık saptanmamıştır. Enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik önlemlerin alınması amacıyla vankomisin direncinin tarama yöntemleri ile araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Vankomisin orta duyarlı *S. aureus* (VISA), *S. aureus*, mikrodilüsyon

## SUMMARY

**Investigation of Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus Strains Detected by Microdilution and Agar Screening Method**

**Objective:** In this study, it was aimed to investigate the rate of reduced susceptibility to vancomycin in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) isolates.

**Materials and Methods:** A total of 131 *S. aureus* (45 MRSA and 86 MSSA) strains isolated from various clinical specimens in medical microbiology department of Faculty of Medicine Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu were studied. Brain heart infusion agar medium containing 4 µg/ml and 6 µg/ml vancomycin was used for the investigation of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA). Growth was assessed at 24<sup>th</sup> and 48<sup>th</sup> hour of cultivation. Microdilution method was used for the determination of vancomycin minimal inhibitory concentration (MIC) values. Vancomycin MIC values were evaluated for *S. aureus* according to Clinical Laboratory Standards Institute guidelines. Mu3 hVISA, *S. aureus* ATCC 29213 (vancomycin sensitive), and vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* which have been defined by conventional methods and the automated system (BD Phoenix 100, USA) in our laboratory were used as quality control strains.

**Results:** In the study, no growth was observed on the screening medium. Vancomycin MIC values of all isolates were found to be between the range of 0.25 to 2 µg/ml. MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> values were expressed in 1 µg/ml. MIC values of vancomycin were found to be 1 µg/ml for *S. aureus*, 4 µg/ml for Mu3 hVISA strain, and >16 µg/ml for the *Enterococcus faecalis* strain.

**Conclusion:** Decreased susceptibility to vancomycin was detected in none of the *S. aureus* strains in this study. Continuous surveillance of vancomycin resistance in *S. aureus* strains with screening methods will be useful in terms of infection control and epidemiological measures.

**Key words:** Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), *Staphylococcus aureus*, microdilution

Alındığı tarih: 23.11.2014

Kabul tarihi: 17.03.2015

Yazışma adresi: Özlem Bucak, Denizli Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Denizli

e-posta: buke06@gmail.com

<sup>§</sup>Poster olarak 'The 6<sup>th</sup> Eurasia Congress of Infectious Diseases 24-27 Eylül 2014, poster No. 399 olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

*Staphylococcus aureus* bakteriyemi, pnömoni ve cerrahi yara enfeksiyonlarını içeren nozokomial enfeksiyonların önde gelen etkenleri arasındadır. Aynı zamanda sağlıklı kişilerde de kolonizasyona bağlı olarak endojen olarak enfeksiyonlara neden olabilmektedir<sup>(1)</sup>. Tedavisinde kullanılan penisilinlere karşı hızla yüksek düzey direnç gelişmesi sonucu, beta-laktamaz enzime dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin kullanıma girmiş, ancak iki yıl sonrasında metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatı tanımlanmıştır<sup>(2,3)</sup>.

MRSA suşlarında makrolidlere, kinolonlara, tetrasiklinlere, linkozamidlere, kloramfenikole ve aminoglikozidlere karşı direnç gelişmiş ve çoklu dirençli bakteriler ortaya çıkmaya başlamıştır. Günümüzde vankomisin, MRSA tedavisi için ilk basamak ilaçlar arasında kabul edilmektedir<sup>(1,4)</sup>.

1996 yılında, Japonya'dan Hiramatsu ve ark.<sup>(5)</sup> tarafından vankomisin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri 8 µg/ml olan *S. aureus* suşu bildirilmiştir. Vankomisine azalmış duyarlılık gösteren bu suş "vancomycin-intermediate *S. aureus*" (VISA, Mu50) olarak literatüre girmiştir. Daha sonra 1997 yılında yine Hiramatsu ve ark.<sup>(6)</sup> tarafından vankomisinin 4-9 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebilen Mu3 adı verilen "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan yeni bir izolat tanımlanmıştır.

Bu çalışmada MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında vankomisine azalmış duyarlılığın araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda işleme alınan çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 131 *S. aureus* (45 MRSA ve

86 MSSA) izolatı kullanıldı. VISA araştırılmasında, 4 µg/ml ve 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar besiyeri kullanılarak inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde üreme olup olmadığı değerlendirildi. Çalışmada ayrıca mikrodilüsyon yöntemi ile izolatlar için vankomisin MİK değerleri belirlendi. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre vankomisin MİK değeri *S. aureus* için ≤2 µg/ml olanlar vankomisine duyarlı (VSSA), 4-8 µg/ml olanlar VISA, ≥16 µg/ml olanlar vankomisine dirençli (VRSA) olarak değerlendirildi<sup>(7)</sup>. Kalite kontrol suşları olarak Mu3 hVISA suşu (K. Hiramatsu, Juntendo Üniversitesi, Japonya'dan sağlanmıştır). *S. aureus* ATCC 29213 standart suşu ve laboratuvarımızda izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistemle (BD Phoenix 100, Becton Dickinson, ABD) tanımlaması yapılmış olan vankomisine dirençli bir *Enterococcus faecalis* suşu kontrol olarak kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde, 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren tarama besiyerlerinde üreme olmamış ve VISA varlığı saptanmamıştır. Tüm izolatlarda vankomisin için MİK değer aralığı 0.25-2.0 µg/ml olarak bulunmuş olup, suşların MİK<sub>90</sub> ve MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir. Kontrol suşlarında vankomisin MİK değerleri; *S. aureus* ATCC 29213 için 1 µg/ml, Mu3 suşu için 4 µg/ml ve VRE suşu için >16 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışmada elde edilen MİK değerlerinin dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

Vankomisin antimikrobiyal etkinliğini peptidoglikan sentezinde görevli olan D-alanil-D-alanin rezidülerine bağlanarak gösterir. Böylece transpeptidaz aktivitesi engellenerek, peptidoglikan uzaması durur ve bakterinin hücre duvarı sentezi

Tablo 1. İzolat sayılarının MİK değerlerine göre dağılımı.

Duyarlılık	MİK değerleri (µg/ml)	MSSA izolat sayısı (n)	MRSA izolat sayısı (n)	Toplam
	0.25	1	1	2
Duyarlı	0.5	33	18	51
	1	52	26	78
Toplam		86	45	131

bozular. Peptidoglikan tabakalarındaki D-alanil-D-alanin oranının artması sonucu bakteri hücre duvarının kalınlaşması, vankomisin direncine katkı sağlayan temel mekanizma olarak kabul edilebilir<sup>(1,3)</sup>. VRSA suşlarında görülen vanA direnç geni, VISA ve hVISA izolatlarında saptanmamıştır. VISA ve hVISA'larda vankomisin direncinin genetik temeli henüz tam olarak açığa kavuşturulmuş değildir. Bununla birlikte, VISA ve hVISA suşlarında azaltılmış glikoprotein duyarlılığı ile birlikte kalınlaşmış hücre duvarı olduğu görüşü bildirilmiştir<sup>(3,8,9)</sup>.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında vankomisine karşı azalmış duyarlılık testinde disk difüzyon metoduyla saptanamamaktadır<sup>(7,10,11)</sup>. VISA ve h-VISA kökenlerini saptanmasında; vankomisin içeren (4-6 µg/ml) BHI agar ile tarama, sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test gibi otomatize olmayan yöntemler kullanılmaktadır. "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" tarafından 6 µg/mL vankomisin içeren BHI agar ile tarama ve bu besiyerlerinde üreme gözlenen izolatlar için sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon ya da agar gradient difüzyon (E-test) yöntemi ile MİK belirlenmesi önerilmektedir. Vankomisin içeren BHI agar tarama yöntemi, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle daha çok kullanılmaktadır. Ancak duyarlılığı, hVISA izolatlarında yanlış negatif sonuç vermesi nedeniyle düşüktür. E-test yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü, agar tarama yöntemine göre yüksek olmasına rağmen, elde edilen sonuçlar Populasyon Analiz Profili-Eğri Altında Kalan Alan (PAP-AUC) yöntemiyle doğrulanmalıdır<sup>(12)</sup>.

Ülkemizde farklı merkezlerde hVISA ve VISA prevalansının araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Hoşgör-Limoncu ve ark.<sup>(13)</sup> 2007 yılında yaptıkları çalışmada, 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar tarama yöntemi ile birlikte standart E-test ve makro E-test yöntemleri kullanmışlardır. Nakipoğlu ve ark.<sup>(14)</sup> yaptıkları çalışmada agar tarama ve populasyon analiz metodunu uygulamışlardır. Her iki çalışmada hVISA veya VISA suşlarına rastlanmamıştır. Cesur ve ark.<sup>(15)</sup> vankomisin agar tarama testi ve E-test yöntemi kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada MRSA suşlarının hiçbirinde vankomisine duyarlılığı azalmış veya vankomisine dirençli izolat saptanmamıştır. Aktaş ve ark.<sup>(16)</sup> çalışmalarında, 390 MRSA izolatında 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar ve agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Suşların MİK<sub>90</sub> ve MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml olarak belirlenmiş olup, izolatlar arasında VISA suşuna rastlanmamıştır. Çalışmamızda, 4 µg/ml ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyeri ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, ancak VISA varlığı saptanmamıştır. Tüm izolatlarda vankomisin için MİK<sub>90</sub> ve MİK<sub>50</sub> değerleri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Türkiye'de ilk hVISA suşu 1998 yılında Gülay ve ark.<sup>(17)</sup> tarafından bildirilmiştir ve MRSA izolatlarında mikrodilüsyon metoduyla %5.3 oranında pozitiflik bulunmuştur. Sancak ve ark.<sup>(18)</sup> MRSA izolatlarında hVISA oranını 1998 yılında %1.6 bulurken, 2001'de %36 olarak saptamışlardır ve bu artış hastanedeki yaygın glikopeptid kullanımına bağlanmıştır. Kuşçu ve ark.<sup>(4)</sup> metisiline dirençli 148 stafilokok izolatlarının 5 (%3.4)'ini VISA, 2 (%1.4)'sini ise hVISA olarak tanımlamış ve *S. aureus* suşları dikkate alındığında ise, VISA (1/107) ve hVISA (1/107) prevalansı benzer olarak %0.9 oranında bulmuşlardır. Aynı çalışmada, tarama plaklarının yalnızca negatiflik sonuçlar verebileceği ve ön tarama amacıyla kullanmış oldukları 6 µg/ml vankomisin içeren plaklar, hVISA suşlarının tespit edilmesini engellemiş olabileceğini bildirmişlerdir.

Güneş ve ark.<sup>(19)</sup> yaptıkları çalışmada, 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar kullanılmış; MSSA izolatlarının hiçbirinde üreme gözlenmezken, iki MRSA suşunda üreme gözlenmiş ve bu suşların h-VISA olduğu PAP-AUC yöntemiyle doğrulanmıştır. Sonuçların değişik çalışmalarda farklı olmasının nedeni kullanılan yöntemlerin farklı olması olabilir.

Çin’de 2013 yılında agar tarama, mikrodilüsyon ve PAP-AUC yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, MRSA ve MSSA izolatlarında %10 oranında hVISA ve %0.5 oranında VISA saptanmıştır ve aynı çalışmada hVISA ve VISA oranlarının özellikle MRSA suşlarında yüksek olduğu belirtilmiştir<sup>(20)</sup>. Farklı merkezlerden epidemiyolojik çalışmaların olduğu bir derlemede hVISA sıklığını MRSA suşlarında %1.3 olarak bildirilmiştir<sup>(21)</sup>. Direncin rutin yöntemlerle saptanamaması nedeniyle birçok ülkede VISA ve h-VISA kökenlerin oranı tam olarak bilinmemektedir. Stafilkoklarda vankomisin direnç oranının artmaması için gereken önlemlerin daha kolay alınabilmesi için, bu ajana karşı azalmış duyarlılık oranlarının bilinmesi önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, hastanemizde izole edilen *S. aureus* suşlarında vankomisine azalmış duyarlılık saptanmamıştır. Enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik önlemlerin alınması ve ülkemizdeki genel direnç oranlarının belirlenmesi amacıyla, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında vankomisin direncinin tarama yöntemleri ile araştırılması önemli katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. **Loomba PS, Taneja J, Mishra B.** Methicillin and vancomycin resistant *S. aureus* in hospitalized patients. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:275-83. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-777X.68535>
2. **Dowling HF.** The newer penicillins. *Clin Pharmacol Ther* 1961; 2:572-80.
3. **Sancak B.** *Staphylococcus aureus*’ta metisilin ve vankomisin direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2007; 38:127-34.
4. **Kuşcu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S.** Metisiline dirençli stafilkoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:248-57.
5. **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:135-6. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/40.1.135>
6. **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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07324-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07324-8)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23, CLSI, Wayne, Pennsylvania. 2013.
8. **Cui L, Ma X, Sato K, et al.** Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5-14. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.5-14.2003>
9. **Cosgrove SE, Carroll KC, Perl TM.** *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Clin Infect Dis* 2004; 39:539-45. <http://dx.doi.org/10.1086/422458>
10. **Hageman JC, Patel JB, Carey RC, Tenover FC, McDonald LC.** Investigation and control of vancomycin intermediate and resistant *Staphylococcus aureus*: A Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Atlanta, GA 2006. [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/visa\\_vrsa\\_guide.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/visa_vrsa_guide.pdf).
11. **Appelbaum PC.** Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:398-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.011>
12. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, et al.** Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2439-44. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.7.2439-2444.2001>
13. **Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, Taş H, Kurutepe S.** Metisiline dirençli stafilkok izolatlarında glikopeptid direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 511-6.
14. **Nakipoglu Y, Derbentli S, Cagatay AA, Katrancı H.** Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. *BMC Infect Dis* 2005; 5:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-5-31>
15. **Cesur S, Irmak H, Şimşek H, et al.** Türkiye’de yedi ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA-VRSA araştırılması ve antibiyotik duyarlılık durumlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:352-8.
16. **Aktaş E, Mengeloğlu FZ, Külah C, Cömert FB.** Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:339-41.
17. **Gülşay Z, Atay T, Yuluğ N.** *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12:101.
18. **Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hasçelik G.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:519-23.

<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki272>

19. **Güneş H, Çetin ES, Kaya S, Cicioğlu-Aridoğan B.** Investigation of reduced glycopeptid susceptibility among methicillin resistant staphylococci. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6:453-9.
20. **Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H.** Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin

resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. *PLoS One* 2013; 12:8:e73300.

21. **van Hal SJ, Paterson DL.** Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:405-10.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01133-10>