Daptomisin VRE ve MRSA Suşlarına İn Vitro Etkinliği*

In Vitro Activity of Daptomycin Against VRE and MRSA Strains

Gülseren AKTAŞ¹, Şengül DERBENTLİ¹

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University Faculty of Istanbul Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışmanın bir bölümü, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş ve 7. Balkan Mikrobiyoloji Kongresi (Microbiologia Balkanica 2011; October 25-29, 2011, Belgrade, Serbia)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 03.07.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.11.2013

ÖZET

Çoğul antibiyotik dirençli gram-pozitif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlar, tüm dünyada gide- rek artmaktadır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), hastane enfeksiyonlarına neden olan en önemli bakterilerdir. Tedavide yaygın vankomisin kul- lanımı, duyarlılığı azalmış veya dirençli suşların giderek artmasına yol açmaktadır. Yeni bir lipopeptid antibiyotik olan daptomisin, MRSA ve enterokok türleri dahil, gram-pozitif bakterilerin çoğuna karşı hızlı bir bakterisidal etkinliğe sahiptir. Bu çalışmada, hastanemizin çeşitli kliniklerinde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen VRE ve MRSA suşlarının in vitro daptomisin duyarlılığının araştırılması amaçlan- mıştır. Çalışmaya 118 VRE ve 111 MRSA olmak üzere toplam 229 suş alınmış olup, tümü rektal sürüntü örneklerinden izole edilen VRE suşlarının ikisi aynı zamanda linezolid de dirençlidir (MİK değerleri 8 µg/ ml ve 12 µg/ml). Suşların tanımlanması konvansiyonel yöntemler ile yapılmış; daptomisin duyarlılığının araştırılmasında CLSI önerilerine uygun olarak, sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen MİK değerleri, daptomisin için CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınır değerlerine göre yorumlanmıştır. VRE izolatlarında daptomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml olarak bulunmuş, MİK aralığı ise 0.125-2 µg/ml olarak belirlenmiştir. MRSA izolatlarında daptomisin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.12 µg/ml ve 0.5 µg/ml, MİK aralığı ≤ 0.032-1 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu verilere göre dap- tomisin, linezolid de dirençli iki suş da dahil olmak üzere, tüm VRE ve MRSA suşlarına (%100) etkili bulun- muştur. Sonuç olarak daptomisin, VRE ve MRSA enfeksiyonlarının sınırlı sayıdaki tedavi seçeneklerine bir alternatif tedavi olanağı sunmasına karşın, azalmış duyarlılık gösteren suşlar ve tedavi sırasında duyarlılık azalması göz önüne alınarak, özellikle uzun süreli daptomisin tedavileri esnasında izole edilen VRE ve MRSA suşlarında MİK değerlerinin dikkatle izlenmesi, tedavi başarısızlığını önlemede yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Daptomisin; duyarlılık; vankomisine dirençli enterokok; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; mikrodilüsyon yöntemi.

İletişim (Correspondence): Dr. Gülseren Aktaş, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 212 414 2000, **E-posta (E-mail):** gulserena2001@yahoo.co.uk

ABSTRACT

Infections with multidrug-resistant (MDR) gram-positive bacteria are gradually increasing in the world. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) are among the leading pathogens isolated from nosocomial infections. The increased use of vancomycin in the treatment has led to the development of isolates with reduced susceptibility and resistance. Daptomycin is a novel lipopeptide antibiotic which has a rapid bactericidal activity against infections caused by gram-positive bacteria including MRSA and VRE. The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of daptomycin against VRE and MRSA strains isolated from clinical samples of hospitalized patients. A total of 229 isolates of which 118 were VRE and 111 were MRSA have been included in the study. All of the VRE strains were isolated from rectal swab samples and two of them were also resistant to linezolid with the MIC values of 8 µg/ml and 12 µg/ml. Bacterial identification was performed by conventional methods and susceptibility testing of daptomycin was performed by using the broth microdilution method as recommended by CLSI. The MIC values were interpreted according to CLSI susceptibility criteria for daptomycin. Daptomycin MIC₅₀ and MIC₉₀ values for VRE were found as 1 µg/ml and 2 µg/ml, respectively, with a MIC range of 0.125-2 µg/ml. Daptomycin MIC₅₀ and MIC₉₀ values for MRSA were determined as 0.12 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively, and the overall distribution of MIC values ranged between ≤ 0.032-1 µg/ml. All VRE including two linezolid-resistant strains and all MRSA strains (100%) were found susceptible to daptomycin. It was concluded that daptomycin is one of the few alternative agents for the treatment of infections caused by VRE and MRSA, nevertheless it was suggested that daptomycin MICs should better be monitored to prevent treatment failure due to the presence of non-susceptible strains and possible emergence of strains with decreased susceptibility during long-term therapy.

Key words: Daptomycin; susceptibility; vancomycin-resistant enterococci; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; microdilution method.

GİRİŞ

Gram-pozitif kokların etken olduğu enfeksiyonların tedavisi çoğul antimikrobiyal dirençli suşların yaygınlaşması nedeniyle her geçen gün zorlaşmaktadır. Son yıllarda yapılan süreyans çalışmaları, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşlarının etken olduğu enfeksiyonların tüm dünyada giderek arttığını ve hastanelerde en sık izole edilen dirençli bakteriler olduğunu göstermektedir¹. Glikopeptid antibiyotiklerin kullanıma girmesi önemli bir tedavi olanağı sunmuşsa da, bu antibiyotiklere dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonların oranı giderek artmaktadır. Özellikle vankomisine duyarlılığı azalmış *S.aureus* (VISA) ve vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) suşlarının ortaya çıkışı, ciddi MRSA enfeksiyonlarının tedavisindeki seçenekleri kısıtlamıştır^{2,3}.

Daptomisin, lipopeptid yapısında yeni bir antibiyotik olup, VRE, MRSA ve VISA gibi tedavisi güç enfeksiyonlara neden olan bakteriler de dahil, aerop ve anaerop gram-pozitif bakterilere, konsantrasyona bağımlı olarak hızlı bakterisit etki göstermektedir. Etki mekanizması diğer antimikrobiyal ilaçlardan farklı olan daptomisin, oligorimerizasyon ile hücre zarı bütünlüğünü bozarak etkinlik gösterir. Depolarizasyon sonucu sitoplazma zarı işlevini kaybeder ve hücre hızla ölür. Daptomisin hücre lizisine neden olmadığından,

hücre duvarı ve hücre içi komponentlerinin salınımı ve buna bağlı komplikasyon gelişme riski oluşturmamaktadır⁴. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen VRE ve MRSA suşlarına karşı daptomisin'in etkinliğinin in vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, hastanemizin çeşitli kliniklerinde yatan hastalardan alınan klinik örneklerin rutin incelenmesi sırasında izole edilen 118 VRE ve 111 MRSA suşu alındı.

VRE suşları hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole edildi. Örnekler, enterokoklar için seçici bir besiyeri olan azid-dekstrozu buyyonuna (Merck, Almanya) ekilerek 35°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra 6 µg/ml vankomisin içeren triptik-soy agar (TSA; Oxoid, İngiltere) besiyerine ekilerek aynı koşullarda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Vankomisinli TSA besiyerinde üreyen bakteriler, konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde tanımlandı^{5,6}. Gram-pozitif, katalaz negatif, %6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme, %40 safra varlığında eskülini hidrolize etme ve pirolidonil arilamidaz (PYR; BD, ABD) testi pozitif suşlar *Enterococcus* spp. olarak kabul edildi ve disk difüzyon yöntemi ile vankomisin (30 µg; Oxoid, İngiltere) direnci araştırıldı. Çalışmaya alınan 118 VRE suşundan ikisi aynı zamanda linezolidde de dirençli suşlar olup, E-test yöntemiyle linezolid MİK değerleri 8 ve 12 µg/ml olarak belirlendi⁷.

S.aureus suşlarının izolasyon ve tanımlanması da konvansiyonel yöntemlerle yapıldı⁶. Gram-pozitif, küme oluşturan; katalaz, DNaz ve plazma koagülaz testleri pozitif olan ve 30 µg'lık sefoksitin diski ile yapılan duyarlılık deneylerinde dirençli bulunan suşlar MRSA olarak tanımlandı⁶.

Daptomisin'in (Novartis Pharma AG, İsviçre) VRE ve MRSA suşları için MİK değerleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Deneylerde, %12.5 µg/ml magnezyum ve 50 µg/ml kalسيوم ilave edilmiş Mueller-Hinton buyyonu (BBL™, Becton Dickinson, ABD), çözücü, sulandırıcı ve suşların inokülasyonunda besiyeri olarak kullanıldı⁸. Her iki bakteri cinsi için antibiyotik'in test edilen konsantrasyon aralığı 0.032-16 µg/ml idi. Plaklar bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra gözle görülen üremenin durduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu, MİK değeri olarak saptandı ve sonuçlar CLSI'nın belirlediği direnç sınır değerlerine göre (VRE: ≤ 4 µg/ml; MRSA: ≤ 1 µg/ml) değerlendirildi. Kalite kontrol suşları olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve *E.faecalis* ATCC 29212 kullanıldı⁹.

BULGULAR

Çalışmamızda, VRE ve MRSA izolatlarına karşı saptanan daptomisin'in in vitro duyarlılık sonuçları Tablo I'de sunulmuştur. Linezolidde dirençli iki suş da dahil, incelenen 118 VRE ve 111 MRSA suşlarının tümü daptomisine duyarlı bulunmuştur. VRE ve MRSA suşlarında daptomisin MİK değerlerinin dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I. VRE ve MRSA Suşlarına Karşı Daptomisin In Vitro Duyarlılık Sonuçları

Suşlar (Sayı)	MİK (µg/ml)			Duyarlılık (%)
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	
VRE (118)	1	2	0.125-2	100
MRSA (111)	0.12	0.5	≤ 0.032-1	100

Tablo II. VRE ve MRSA Suşlarında Daptomisin MİK Değerlerinin Dağılımı

Suşlar (Sayı)	MİK (µg/ml) (%)						
	≤ 0.032	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2
VRE (118)	0	0	1 (0.8)	1 (0.8)	43 (36.4)	53 (45)	20 (17)
MRSA (111)	10 (9)	13 (11.7)	43 (38.7)	29 (26)	15 (13.5)	1 (0.9)	0

TARTIŞMA

Daptomisin, siklik bir lipopeptid antibiyotiktir ve bakteri sitoplazma zarının depolarizasyonuna neden olarak hızlı bakterisidal etki gösterir⁴. Stafilokoklarda görülen daptomisin direncinin başlıca nedenleri; lisilfosfatidil-gliserin sentetaz, histidin kinaz ve RNA polimeraz alt ünitelerini kodlayan sırasıyla *mprF*, *ycyG*, *rpoB* ve *rpoC* genlerindeki mutasyonlardır¹⁰. Bunun yanı sıra vankomisin ile karşılaşmış olmanın, daptomisin direnci gelişimine zemin oluşturabileceğini gösteren veriler vardır¹¹. Enterokoklarda daptomisin direncine ilişkin kesin bilgi bulunmamakla birlikte, stafilokoklardaki direnç mekanizmalarına benzer yollarla geliştiği düşünülmektedir¹².

Ülkemizin de dahil olduğu 13 Avrupa ülkesinden 34 merkezin katıldığı bir çalışmada, 2003-2009 yılları arasında izole edilen %27.2'si metisiline dirençli 18.352 *S.aureus* ve %9.4'ü vankomisine dirençli 7.241 enterokok suşunun in vitro daptomisin duyarlılığı araştırılmış ve suşların %100'ü daptomisine duyarlı bulunmuştur¹³. Aynı suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla MRSA suşları için 0.25 ve 0.5, VRE için ise 2 ve 2 µg/ml olarak bildirilmiştir¹³. Bizim çalışmamızda bu değerler sırasıyla 0.12 ve 0.5 ile 1 ve 2 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2003 yılı sonlarında *S.aureus*'un etken olduğu komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının, 2006 yılında da bakteriyemilerin tedavisinde daptomisin kullanılmaya başlanmıştır. Daptomisin direncinin araştırıldığı bir sürveyans çalışmasında, 2007-2008 yıllarında ABD'deki tıp merkezlerinden toplanan 4.514 MRSA ve vankomisine dirençli 78 *E.faecalis*, 640 *E.faecium* suşunun daptomisin MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.5, 1 ve 2 µg/ml, duyarlılık oranları da aynı sıra ile %99.8, %100 ve %99.7 olarak bildirilmiştir¹⁴. Aynı çalışmada, 2002-2003 (daptomisin onayı öncesi) ve 2007-2008 yıllarında izole edilen *S.aureus* ve enterokok suşları için belirlenen daptomisin MİK değerlerinin birbirine çok yakın olduğu da vurgulanmıştır¹⁴.

Bazı çalışmalarda daptomisine duyarlı olmayan (MİK > 4 µg/ml) çok az sayıda enterokok suşuna rastlanmasına karşın¹⁴, vankomisin, linezolid ve kinupristin/dalfopristin ile kıyaslandığında, en yüksek duyarlılık oranlarının veya en düşük MİK değerlerinin daptomisin ile elde edildiği bildirilmektedir^{14,15}. Bazı çalışmalarda ise, VRE ve *S.aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların daptomisin ile tedavisi sırasında yükselmiş MİK değerlerinin saptandığı ve bu durumun tedavi başarısızlıklarına yol açtığı ifade edilmektedir¹⁶. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, sekiz farklı şehirden dokuz hastanenin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen 260 MRSA suşunda E-test yöntemi ile daptomisin aktivitesi araştırılmıştır¹⁷. Suşların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.094 ve 0.19 µg/ml olarak saptanmış, MRSA izolatlarından birinin (1/260, %0.4) ise daptomisine duyarlı olmadığı bildirilmiştir¹⁷. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda E-test ile MRSA suşlarının MİK değerleri ≤ 1 µg/ml olarak belirlenmiştir¹⁸⁻²⁰. Çalışmamızın verileri ve diğer araştırmaların¹⁸⁻²⁰ sonuçları, klinik örneklerden izole edilen gram-pozitif patojenler arasında, Cesur ve arkadaşlarının¹⁷ rapor ettiği bir suş hariç, ülkemizde daptomisine duyarlı olmayan suşa rastlanmadığını göstermektedir. Bu bulgular VRE ve MRSA dahil çoğul antibiyotik dirençli gram-pozitif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde daptomisinin güvenilir bir alternatif oluşturabileceği fikrini vermektedir. Daptomisinin ülkemizde 2010 yılında kullanılmaya başlanan yeni bir antibiyotik olması¹⁸ ve tedavi sırasında duyarlı olmayan suşların ortaya çıkabileceği¹⁶ dikkate alınarak, daptomisin MİK değerleri izlenmelidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan daptomisini sağlayan Novartis Pharma AG firmasına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. European Centre for Disease Prevention and Control. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Available at: <http://www.rivm.nl/earss/database/>
2. 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(1): 135-6.
3. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51(26): 565-7.
4. Cottagnoud P. Daptomycin: a new treatment for insidious infections due to gram-positive pathogens. Swiss Med Wkly 2008; 138(7-8): 93-9.
5. Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus*, pp: 422-33. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM press, Washington DC.
6. Winn W Jr, Allen S, Janda W, et al (eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 2006, 6th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
7. Aktaş G, Bozdoğan B, Derbentli S. Linezolid ve dalbavansinin vankomisine dirençli enterokok suşlarına karşı in vitro aktivitesi. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 359-65.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, Document M7-A7, 2006. CLSI, Wayne, PA.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement M100-S18, 2008. CLSI, Wayne, PA.
10. Friedman L, Alder JD, Silverman JA. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(6): 2137-45.
11. Hirschwerk D, Ginocchio CC, Bythrow M, Condon S. Diminished susceptibility to daptomycin accompanied by clinical failure in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(3): 315-7.
12. Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. Expert Rev Ant Infect Ther 2008; 6(5): 637-55.
13. Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial activity of daptomycin tested against gram-positive strains collected in European hospitals: results from 7 years of resistance surveillance (2003-2009). J Chemother 2011; 23(4): 200-6.
14. Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from US medical centers: results of the Daptomycin Surveillance Program (2007-2008). Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65(2): 158-62.
15. Canton R, Ruiz-Garbajosa P, Chaves RL, Johnson AP. A potential role for daptomycin in enterococcal infections: what is the evidence? J Antimicrob Chemother 2010; 65(6): 1126-36.
16. Kelesidis T, Humphries R, Uslan DZ, Pegues D. De novo daptomycin-non-susceptible enterococcal infections. Emerg Infect Dis 2012; 18(4): 674-6.
17. Cesur S, Irmak H, Simşek H ve ark. Türkiye’de yedi ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA-VRSA araştırılması ve antibiyotik duyarlılık durumlarının saptanması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 352-8.
18. Yılmaz Bozkurt G, Kutlu H, Arslan A, Memikoğlu O. Yeni bir antibakteriyel ajan: daptomisin. Ankara Üniv Tıp Fak Mecm 2010; 63(3): 85-8.
19. Afşar I, Güngör S, Şener AG, Demirci M. Daptomisin kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına in vitro etkinliği. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 755-7.
20. Çelikkalek N, Özdem B, Gürel FC, Güvenman S, Güner HR, Açıkgöz ZC. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının vankomisin, teikoplanin, linezolid ve daptomisine in vitro duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 512-8.