
Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri

Serhat ÜNAL

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, ANKARA

ÖZET

Stafilokoklarda en sık rastlanan metisilin direnç mekanizması yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP 2a) kazanılması ile meydana gelir. Moleküler biyolojik çalışmalar PBP 2a'nın sentezini sağlayan genetik bilginin mec A geninde taşındığını göstermiştir. Bu gen yalnızca metisilin dirençli stafilokoklarda mevcuttur. Transdüksiyon ile duyarlı suşlara aktarılabilir. Mec A geninin ekspresyonunu kontrol eden başka genler de (faktör X, fem A, fem B, mec R, mec I gibi) direnç oluşumunda etkili olmaktadır. Bunun sonucunda PBP 2a'ya bağlı metisilin direnci, homojen direnç ve heterojen direnç olarak iki ayrı şekilde ortaya çıkmaktadır. Stafilokoklarda metisilin direncine neden olan diğer iki mekanizma beta laktamaz salgılanması ve mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalmadır.

Anahtar Kelimeler: Stafilokoklar, Metisilin Direnci

SUMMARY

Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococci and Methods Used in The Diagnosis of Methicillin Resistance

The most common mechanism of methicillin resistance in staphylococci is the synthesis of a new penicillin binding protein (PBP2a). The genetic material responsible for PBP 2a synthesis is carried in mec A gene. Only methicillin resistant staphylococci have this gene. It can be transported to sensitive strains by transduction. There are also other genes (factor X, fem A, fem B, mec R, mec I) which control the expression of mec A gene. As a result of interaction of these genes 2 types of PBP 2a related methicillin resistance occurs: Homogenous resistance, heterogeneous resistance. Besides chromosomal (intrinsic) resistance, methicillin resistance in staphylococci can develop through secretion of beta lactamase enzymes or decrease in the affinity of PBP's to beta lactam antibiotics.

Key Words: Staphylococci, Methicillin Resistance

Stafilokoklarda metisilin direnci değişik mekanizmalarla meydana gelebilir (Tablo 1) (1). Bunlar içerisinde en sık rastlanılanı, stafilokokların yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) kazanmaları ile oluşan dirençtir (2). Bu mekanizma nedeniyle metisiline dirençli olan stafilokoklarda, metisiline duyarlı olanlardan farklı olarak yeni, ilave bir PBP vardır. PBP 2'nin hemen altında yer aldığı için PBP 2a adı verilen 78 kDa moleküler ağırlığındaki bu enzimin beta laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. Bu nedenle metisilin dirençli bakteri beta laktam antibiyotiklerle karşılaştığı zaman diğer tüm PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edilir, ancak bu enzim düşük afinite nedeniyle beta laktam antibiyotiği bağlamaz ve tüm fonksiyonları üzerine alarak bakteri duvar sentezini devam ettirir. Ortamda beta laktam antibiyotik olsa da olmasa da PBP 2a sentezlenir, ancak ortamda antibiyotik yok ise fonksiyon göstermez. PBP 2a miktarı ile bakterinin metisiline direnç düzeyi arasında bir ilişki yoktur.

PBP 2a dünyanın değişik bölgelerinden izole edilmiş metisiline dirençli olan koagülaz pozitif yada negatif tüm stafilokoklarda gösterilmiştir. Metisilin duyarlı olanlarda ise mevcut değildir (2).

Moleküler biyolojik çalışmalar sonucunda PBP 2a'nın sentezini sağlayan genetik bilginin bakteri kromozomunda lokalize 2 kb'lık bir gen olan "mec A" geninde taşındığı gösterilmiştir. Bu gen metisilin dirençli stafilokoklarda mevcut, duyarlı olanlarda ise yoktur (3). Transdüksiyon ile bu genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı olan suşlara aktarılabilmektedir. Mec A geni muhtemelen bir transpozon üzerindedir. Bakteride metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için mec A geninin eksprese olması gerekir. Ancak bu ekspresyon her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu nedenle mec A geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli ve hatta duyarlı stafilokoklar olabilmektedir. Yani mec A geninin varlığı bu tür metisilin direnci için mutlak gerekli, ancak yeterli değildir. Muhtemelen mec A geninin ekspresyonunu kontrol eden başka bazı genler de (faktör X, fem A, fem B, mec R, mec I gibi) direnç oluşumunda etkili olmaktadır. Bu genlerin birbiri ve mec A geni ile birlikte çalışmaları sonucuna göre PBP 2a nedeniyle meydana gelen metisilin direnci iki şekilde olabilir (1,3):

Homojen direnç: Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler mec A genini taşırlar ve hepsinde bu gen eksprese olmuştur, yani fonksiyoneldir. Yüksek düzeyde dirence neden olur. Direncin tespiti ortamın pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon sü-

Tablo 1. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları.

1. İntrensek (kromozomal) direnç :

A. Yeni bir PBP=PBP 2a sentezi nedeni ile oluşan direnç

Mec A geni tarafından sentezlenir. Bu yapısal gen ve faktör X, fem A, fem B gibi bazı diğer yardımcı genlerin kontrolündedir. Yapısal genin ekspresyonuna göre iki şekilde olabilir.

a. Heterojen direnç: Koloniyi oluşturan bakterilerin çoğu metisilin düşük konsantrasyonlarına duyarlı iken (MİK=1-5 µg/ml), ancak 10⁵ ya da 10⁸ bakteride bir bakteri yüksek metisilin direnci gösterir (MİK=100 µg/ml).

b. Homojen direnç: Koloniyi oluşturan tüm bakterilerde mec A geni eksprese olmuştur ve hepsi metisiline yüksek dirençlidir.

B. Mevcut PBP'lerin beta laktam antibiyotiklere afinitelerinin azalması.

Düşük düzeyli (borderline, MİK=8-16 µg/ml) dirence neden olur. Son derece seyrek.

2. Kazanılmış (plazmid) direnç :

Stafilokokal beta laktamazların fazla salgılanması ile meydana gelir. Düşük düzeyli dirence neden olur. Beta laktamaz inhibitörlerinin ilavesi ile direnç yenilebilir.

resi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen stafilokokların az bir kısmında metisilin direnci bu şekildedir.

Heterojen direnç: Klinik uygulamada daha sık görülen ve direnç ekspresyonunun yukarıda sayılan çevre koşullarında etkilenmesi nedeniyle tespiti güç olan direnç türüdür. Koloniyi oluşturan tüm bakteriler mec A genini taşımalarına rağmen, direnç ancak 10⁶ ya da 10⁸ bakteriden birinde tespit edilebilmektedir. Bunun, mec A geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan "factor essential for methicillin resistance = fem A, faktör X veya mec R, mec I" gibi kontrol genlerine bağlı olarak meydana geldiği sanılmaktadır. Ancak heterojen direncin neden olduğu kesinlikle bilinmemektedir. Bu tür direnç, duyarlılık testleri %4 NaCl içeren ortamda, düşük ısıda yapıldığı ve inkübasyon süresinin 48 saat olduğu şartlarda daha iyi tespit edilebilmektedir (4,5). Ancak bu şartlar sağlanmasına rağmen değişik mikrobiyolojik duyarlılık testlerinde direncin saptanabilme şansı en iyi laboratuvar olanaklarında bile %85-100 arasında değişmektedir (Tablo 2). Bu nedenle metisilin direncini tespit için mec A geninin varlığını göstermeye dayalı yeni moleküler biyolojik yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Tablo 3) (6,7,8).

İntrensek olarak metisilin dirençli stafilokok suş-

Tablo 2. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Tespiti "Mikrobiyolojik Yöntemler"

Metod	Şartlar	Direnç	Sensitivite (%)		Spesifite (%)	
			SA	KNS	SA	KNS
Disk Diffüzyon (NCCLS M2)	MHA, 35°C, 24 s, 1 µg oxa disk, 0.5 Mc Farland	R:≤11 mm I:11-12 mm S:≥13 mm	95	95	99	100
Broth Mikrodilüsyon (NCCLS M7)	CSMHB, %2 NaCl, 30-35°C, 24 s, oxa, 5 10 ⁵ cfu/ml	R:≥4 µg/ml S:≤2 µg/ml	95 100	90 100	95 100	100
Agar Dilüsyon (NCCLS M7)	MHA %2 NaCl 30-35°C, 24 s, 10 ⁴ cfu/nokta	R:≥4 µg/ml S:≤2 µg/ml	99 100	96 97	90 97	100
Agar tarama	MHA 35°C, 24 s, 6 µg/ml oxa, 10 ⁵ -10 ⁶ cfu	Üreme yok ise dirençli	99 100	97 100	80 90	99

SA: *Staphylococcus aureus*

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

oxa: Oxacillin

MHA: Mueller-Hinton agar

CSMHB: Ca suplemante edilmiş Mueller-Hinton broth

Tablo 3. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Tespiti "Moleküler Biyolojik Yöntemler"

Metod	Şartlar	Direnç	Sensitivite (%)		Spesifite (%)	
			SA	KNS	SA	KNS
DNA probe	p32 digitoksijenik İşaretleme	+/- hibridizasyon	100	100	100	100
PCR	mec A primerleri	Agaroz jel UV ışık	100	100	100	100

SA: *Staphylococcus aureus*,

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

ları sadece beta laktam antibiyotiklere değil, pek çok başka antibiyotiklere de dirençlidir. MRSA suşlarının çoğunun makrolid antibiyotikler, klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler ve aminoglikozid antibiyotiklere dirençli olabilecekleri gösterilmiştir (Tablo 4) (9). Bu nedenle bu antibiyotikler için duyarlılık testleri de mutlak yapılmalıdır.

Stafilokoklarda bu kromozomal (intrensek) dirençten başka metisilin direncine neden olan iki mekanizma daha vardır. Bunlar:

1. Beta laktamaz salgılanması: Beta laktamaz salgılanması esas olarak penisiline dirence neden olur. Metisilin bu enzimlere dayanıklıdır. Ancak aşırı miktarlarda salgılandıklarında metisilini de kısmen parçalayarak metisilin direncine neden oldukları gösterilmiştir. Bu tür direnç, beta laktam antibi-

yotiklerin, beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmesi ile yenilebilir (10).

Tablo 4. Metisilin Dirençli Stafilokokların Değişik Antibiyotiklere Duyarlılıkları.

Genellikle Duyarlı	Genellikle Dirençli	Dirençli olabilir.
Vankomisin	Penisilinler	Makrolidler
Rifampin	Sefalosporinler	Klindamisin
TMP-SMX	Diğer β-laktam antibiyotikler	Tetrasiklinler Kloramfenikol Aminoglikozidler Kinolonlar

2. Mevcut PBP'lerde betalaktam antibiyotik afinitesinde azalma: Son yıllarda betalaktamaz negatif olup, mec A geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıdaki bu tür izolatlar incelendiğinde, bu bakterilerinin mevcut PBP'lerinin beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır (11).

Bütün bu mekanizmalar arasında PBP 2a sentezi en sık rastlanan ve metisilin dirençli stafilokok denildiğinde akla gelen esas direnç mekanizmasıdır. Diğer iki mekanizma az rastlanan metisilin direnç mekanizmalarıdır ve ancak "sınırdan direnç" (borderline) denen düşük düzeyli dirence neden olurlar (MİK = 8-16 g/ml).

KAYNAKLAR

1. Francioli MJ, Bille MP, Glauser, and P Moreillon. Beta-lactam resistance mechanisms of methicillin-resistant *S. aureus*. *J Infec Dis* 1991;163:514-23.
2. Hartman BJ and A Tomasz: Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *S. aureus*. *J Bact* 1984;158:513-516.
3. Ryffel, C, Kayser FH, Berger-Bachi B. Correlation between regulation of mec A transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:25-31.
4. Lencastre HD, Figueiredo A, Urban C, Rahal J, Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;35:632-9.
5. NCCLS, Antimicrobial Susceptibility Testing/SC3 Third Edition. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Document M2-A4. Villanova, Pa. 10:M7-A2, Dilution Testing (Aerobes) and M2A4, Disc Testing, 1990.
6. Gordon A, Pennel E. Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe. *Antimicrob Agent Chemother* 1990;34:1720-4.
7. Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:6-9.
8. Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch J, Wu E, Preston D, Skatrud P. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1685-91.
9. Maple PC, Hamilton-Miller JM and W Brumfitt. Worldwide antibiotic resistance in methicillin-resistant *S. aureus*. *Lancet* 1989;i:537-40.
10. Chambers H, Archer G, Matsuhashi M. Low-level methicillin resistance in strains of *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:424-8.
11. Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1867-9.

YAZIŞMA ADRESİ:

Prof. Dr.Serhat ÜNAL
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi
Hacettepe-ANKARA