

# Çeşitli Klinik Örneklerden Elde Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Fosfomisin-Teikoplanin Kombinasyonunun Antibakteriyel Sinerjistik Etkinliğinin Araştırılması

## Investigation of the Antibacterial Synergistic Activity of Fosfomycin-Teicoplanin Combination in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Various Clinical Sample

Rümeysa Tuba BİÇER(ID), Tuncer ÖZEKİNCİ(ID), Mücahide Esra KOÇOĞLU(ID)

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

İstanbul Medeniyet University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

**Makale Atfı:** Biçer RT, Özekinci T, Koçoğlu ME. Çeşitli klinik örneklerden elde edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında fosfomisin-teikoplanin kombinasyonunun antibakteriyel sinerjistik etkinliğinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(2):113-124.

### ÖZ

Bu çalışmada metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)] izolatlarının teikoplanin ve fosfomisin antibiyotik duyarlılıklarının farklı yöntemlerle belirlenmesi, teikoplanin-fosfomisin kombinasyonunun dama tahtası yöntemiyle sinerjistik etkisinin araştırılması ve bir izolatta her iki ilacın ayrı ayrı ve birlikte zamana bağlı bakterisidal aktivitesinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışılan klinik örneklerden izole edilen 45 adet MRSA izolatı dahil edilmiştir. İzolatların teikoplanin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, fosfomisin MİK değeri ise hem sıvı mikrodilüsyon, hem de agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Teikoplanin-fosfomisin kombinasyonu dama tahtası yöntemiyle çalışılmış ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (ΣFİK) değerlerine göre iki ilacın kombinasyon etkinliği belirlenmiştir. Çalışılan izolatlar arasından rastgele seçilen bir MRSA izolatında zamana bağlı öldürme yöntemiyle (time-kill) antibiyotik kombinasyonunun sinerjistik etkinliği ve bakterisidal aktivitesi 24 saat süreyle araştırılmıştır. Teikoplanin ve fosfomisin antibiyotik duyarlılık çalışmaları sonucunda tüm izolatlar Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)]'nin belirlediği duyarlılık sınır değerlerine göre her iki antibiyotige de duyarlı bulunmuştur. Dama tahtası yöntemiyle çalışılan 45 izolatın 22 (%49)'sinde sinerjistik etki, 22 (%49)'sinde aditif etki ve birinde (%2) indifferans etki tespit edilmiştir. Kırk beş izolatın ΣFİK ortalaması 0.5 bulunmuştur. Zamana bağlı öldürme yöntemi çalışılan izolatın, antibiyotiklerin 1/8 MİK konsantrasyonlarının kombinasyon çalışmasında 12. saat ve 24. saatte sinerjizm, 1/4 MİK konsantrasyonlarının kombinasyon çalışmasında ise 6. saat, 12. saat ve 24. saatte sinerjizm tespit edilmiştir. Çalışmada antibiyotiklerin 1/4 MİK konsantrasyonlarının kombinasyon çalışmasında altıncı saatte bakterisidal etki tespit edilmiş ve bu etkinin 12. saat ve 24. saatte kaybolduğu görülmüştür. Yapılan testlerin sonucunda

MRSA izolatlarında in vitro olarak teikoplanin-fosfomisin kombinasyonunun antibakteriyel etkisinin yüksek oranda sinerjiyle sonuçlandığı görülmüştür. Antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda yapılan bu tür çalışmalar, klinisyenlere farklı tedavi seçenekleri sunmakta ve sağkalımın artırılmasına katkı sağlamaktadır. Bu çalışma sonucunda, ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi koşuluyla, MRSA suşlarının etken olduğu toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlarda, teikoplanin-fosfomisin kombinasyonunun etkili bir alternatif tedavi seçeneği olabileceği söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; teikoplanin; fosfomisin; in vitro sinerjizm.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the detection of teicoplanin and fosfomycin antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains by different methods and to evaluate the antibacterial synergistic effect of teicoplanin-fosfomycin combination by using checkerboard assay and time kill curve assay. Forty-five MRSA strains isolated from clinical samples in routine medical microbiology laboratory of Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın City Hospital were included in the study. In the first stage of the combination study, minimum inhibitory concentrations (MIC) were investigated by broth microdilution for teicoplanin and by both broth microdilution and agar dilution methods for fosfomycin. The combination of teicoplanin and fosfomycin was tested by the checkerboard method in 45 MRSA strains and combination effect was determined according to fractional inhibitory concentration index ( $\Sigma$ FIC) calculation. The synergistic effect and bactericidal activity of antibiotic combination were studied against a randomly selected strain from the strains used in the study by using time-kill method for 24 hours. As a result of teicoplanin and fosfomycin antibiotic susceptibility studies, all isolates were found to be susceptible to both antibiotics according to the susceptibility breakpoints determined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). A synergistic effect was found in 22 (49%), additive effect in 22 (49%) and indifferent effect in one (2%) of the 45 strains studied with the checkerboard method. The mean  $\Sigma$ FIC of 45 isolates was found to be 0.5. In the combination study of the antibiotics of the isolate that was studied with time-kill method, synergism was detected for 1/8 MIC concentrations at 12<sup>th</sup> hour and 24<sup>th</sup> hour and synergism at 1/4 MIC concentration at sixth hour, 12<sup>th</sup> hour and 24<sup>th</sup> hour. In the combination study of 1/4 MIC concentrations of antibiotics, bactericidal effect was detected at sixth hour and this effect was observed to disappear at 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours. High rate of synergistic antibacterial effect of teicoplanin-fosfomycin combination on MRSA isolates was demonstrated as a result of in vitro tests. Such studies conducted on antibiotic-resistant bacterial infections will provide clinicians different treatment options and will contribute to increasing survival. As a result of this study, provided that it is supported by future clinical studies, it can be stated that the teicoplanin-fosfomycin combination may be an effective treatment option in community and hospital-acquired infections caused by MRSA.

**Keywords:** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; teicoplanin; fosfomycin; in vitro synergism.

## GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)] ilk tespit edildiği 1961 yılından bugüne kadar hastane enfeksiyonları etkenleri arasında en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olmuştur<sup>1</sup>.

Stafilokoklarda metisilin direnci, sıklıkla *mecA* ve nadiren *mecC* geni tarafından kodlanan, yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2a/PBP2c) sentezlenmesine bağlıdır. Etkeni MRSA olan enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan glikopeptit grubu antibiyotikler, bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptitlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanarak peptidoglikan oluşumunu inhibe eder ve bakterinin hücre duvar sentezini bozar<sup>2</sup>. Son yıllarda dirençli gram-pozitif nozokomiyal patojenlerin çoğalmasıyla glikopeptit grubu

antibiyotiklerden vankomisin ve teikoplanin kullanımı artış göstermiştir. Bu durum glikopeptit grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarında azalmalara yol açmıştır<sup>3</sup>. Bu nedenle MRSA tedavisinde alternatif seçenekler aranmaktadır. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi, uzun ve maliyetli bir süreç gerektirdiğinden eski antibiyotikler yeni endikasyonlarla yeniden kullanılmaya başlanmıştır<sup>4</sup>. Bu antibiyotiklerden biri olan fosfomisin, peptidoglikan sentezinin fosfoenolpirüvat sentetaz içeren ilk basamağını inhibe ederek bakterilerin hücre duvarı oluşumunu engeller<sup>5</sup>. Fosfomisinin diğer antibiyotiklerle kombine kullanımı hem sinerjistik etkiye neden olabilmekte hem de bakterinin tedavi sırasında fosfomisin direnci geliştirme riskini azaltmaktadır<sup>6</sup>.

Bu çalışmada, Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen MRSA izolatlarının teikoplanin ve fosfomisin antibiyotik duyarlılıklarının farklı yöntemlerle belirlenmesi, teikoplanin-fosfomisin kombinasyonunun dama tahtası yöntemiyle sinerjistik etkisinin araştırılması ve bir izolatla zamana bağlı öldürme yöntemiyle antibiyotiklerin bakterisidal aktivitesinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu (Tarih: 05.10.2022 ve Karar No: 583) onayı ile gerçekleştirildi.

### Bakteri İzolatları

Çalışmaya 01.06.2021 ve 01.06.2022 tarihleri arasında Göztepe Prof. Dr. Süleyman Yalçın Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş toplam 45 adet MRSA izolatı dahil edildi. Çalışmaya aynı hastanın tekrarlayan numuneleri dahil edilmedi. Tüm izolatların tanımlaması matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi [matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF MS)] (VITEK MS, bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)]'nin belirlediği duyarlılık sınır değerlerine göre çalışıldı. VITEK 2 otomatize sisteminde sefoksitin tarama testi sonucu pozitif çıkan örneklerin metisilin direnci Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle EUCAST sınır değerlerine göre doğrulandı. Çalışmada kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı.

### Kullanılan Antibiyotikler

Teikoplanin (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) ve fosfomisin sodyum (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) toz halinde temin edildi. Antibiyotik çözücü ve sulandırıcı olarak her iki antibiyotik için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)] önerileri doğrultusunda steril distile su kullanıldı. Hazırlanan stok

antibiyotik çözeltileri her bir çalışma için gereken miktarlarda hazırlanarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp çalışma gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

### Agar Dilüsyon

EUCAST önerilerine göre MRSA izolatlarının fosfomisin MİK değerleri, referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemiyle çalışıldı<sup>7</sup>. Belirlenen fosfomisin dilüsyon aralığında bir adet de üreme kontrolü hesaplanarak 14 cm çapında toplam 11 steril petri plağı 50 kareye bölünerek numaralandırıldı. Fosfomisin stok çözeltilerinden her biri toplamda 5 ml olacak şekilde 640-1.25 mg/L aralığında 10 antibiyotik dilüsyon çözeltisi steril falkon tüpler içerisinde hazırlandı. Her bir antibiyotik dilüsyonu için 25 mg/L glukoz-6-fosfat (G-6-P) ilave edilmiş Mueller-Hinton agar (MHA)'dan 45 ml eklenerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı ve antibiyotik çözeltileri 1/10 oranında seyreltilerek son konsantrasyon (0.125 mg/L-64 mg/L) elde edildi. Antibiyotik içermeyen petri için hazırlanan tüpe ise 50 ml MHA konuldu. 10<sup>7</sup> cfu/mL konsantrasyonunda hazırlanan bakteri süspansiyonları 2 µL eklenerek son bakteri konsantrasyonu 10<sup>4</sup> cfu/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Oda sıcaklığında inokulum alanları kuruduktan sonra petriler 35 ± 2 °C etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.

### Sıvı Mikrodilüsyon ve Dama Tahtası Yöntemi

Çalışmada kullanılan MRSA izolatlarının teikoplanin MİK değerleri, antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Dama tahtası yöntemiyle sinerji araştırması yapılacağı için çalışılacak izolatların fosfomisin MİK değerleri agar dilüsyon yönteminin yanı sıra 25 mg/L G-6-P ile desteklenmiş katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (KAMHB) kullanılarak sıvı mikrodilüsyon testiyle de çalışıldı. Sıvı mikrodilüsyon testinde teikoplanin MİK değerleri 0.03 mg/L ve 16 mg/L, fosfomisin MİK değerleri 0.125 mg/L ve 64 mg/L aralığında çalışıldı ve tespit edilen MİK değerleri esas alınarak antibiyotiklerin dama tahtası testi için kullanılacak MİK değerleri belirlendi. Teikoplanin konsantrasyonu 32 µg/mL, fosfomisin konsantrasyonları ise 0.5 µg/mL - 32 µg/mL aralığında yedi dilüsyon olarak hazırlandı. Çalışma sırasında antibiyotik stok çözeltileri G-6-P ile desteklenmiş KAMHB kullanılarak seyreltildi ve böylece kuyucuklarda fosfomisin için istenen 25 mg/L G-6-P konsantrasyonu sağlanmış oldu. Kuyucuklarda antibiyotik çözeltilerinden 50 µL eklendi. Besiyeri kontrol kuyucuğu dışındaki tüm kuyucuklara bakteri süspansiyonu konularak her kuyucukta 5 x 10<sup>5</sup> cfu/mL konsantrasyonda bakteri inokulumu sağlandı. Mikroplaklar 35 ± 2 °C'da 18-24 saat inkübe edildi.

Inkübasyon sonunda mikroplaklarda üreme olmayan tüm kuyucuklar taranıp not edildi. Bu kuyucuklarda bulunan her iki ilacın fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) değerleri, ilaçlardan birinin kombinasyondaki MİK değerinin, tek başına sahip olduğu MİK değerine bölünmesiyle elde edildi. FİK değerleri toplanarak fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi (ΣFİK) değerlerine ulaşıldı. Mikroplakta tespit edilen en düşük ΣFİK değeri değerlendirmeye alınıp kaydedildi.

Kombinasyonun etkinliği  $\Sigma FIK$  değeri  $\leq 0.5$  ise sinerjizm, 0.5 ve 1 arasında ise aditif, 1 ve 4 arasında veya 1'e ve 4'e eşitse indifferans,  $> 4$  antagonizm olarak değerlendirildi<sup>8</sup>.

### Zamana Bağlı Öldürme Testi

Zamana bağlı öldürme testi (time-kill yöntemi) için dama tahtası yöntemiyle sinerjizm gösteren izolatlardan rastgele biri seçildi. Bu izolatin dama tahtası yönteminde sinerjizm görülen kombinasyondaki antibiyotik konsantrasyonları belirlenerek her bir ilaç için MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonları test edildi. Testte örneklem zaman noktaları 0., 3., 6., 12. ve 24. saatler olarak belirlendi.

Zamana bağlı öldürme yönteminde test edilecek antibiyotik konsantrasyonlarının 100 katı olacak şekilde her birinden 1 ml hazırlandı. 100 ml hazırlanan KAMHB besiyeri için 2.5 mg G-6-P tartıldı. KAMHB besiyerinden ayrılan 20 ml içinde G-6-P çözülüp, membran filtreden geçirilerek besiyerine eklendi. Tekil antibiyotik çalışılacak steril tüplere 9.9 ml, kombinasyon çalışılacak tüplere 9.8 ml, sterilite ve üreme kontrolü yapılacak tüplere ise 10 ml KAMHB konuldu. Sterilite ve üreme kontrol tüpleri haricindeki diğer tüplere hazırlanan antibiyotik çözeltilerinden 0.1'er ml eklendi. Sterilite kontrol tüpü haricindeki diğer tüplere hazırlanan bakteri süspansiyonu eklenerek tüplerde istenen son bakteri konsantrasyonu ( $5 \times 10^5$  cfu/mL) sağlandı. Tüpler örneklem zaman noktalarında çıkarılmak üzere  $35 \pm 2$  °C etüvde inkübasyona alındı. Örneklem zaman noktalarında tüplerden 0.1 ml örnek alınarak altı kat seri dilüsyon uygulandı ve her dilüsyondan 0.1 ml alınarak numaralandırılmış petrilere ekim yapıldı. Petriler 24 saat sonra değerlendirilmek üzere  $35 \pm 2$  °C etüvde inkübasyona alındı.

İnkübasyon süresi sonunda petriler incelendiğinde 30-300 arası koloni sayısı bulunan petriler tespit edilerek koloni sayıları, test edilen antibiyotik konsantrasyonu ve örneklem zaman noktalarıyla birlikte kaydedildi. Koloni sayıları, ekim yapılırken uygulanan dilüsyonların katsayısıyla çarpılarak mililitredeki cfu sayısı hesaplandı. Zamana bağlı öldürme grafiği çizilebilmesi için hesaplanan sayının 10 tabanında logaritması alındı.

Zamana bağlı öldürme testi sonuçları yorumlamasında, sinerjizm en etkili bulunan ajana kıyasla uygulanan kombinasyonla canlı koloni sayısındaki  $\geq 2\text{-log}_{10}$  cfu/mL azalma, antagonizm en etkili bulunan ajana kıyasla uygulanan kombinasyonla canlı koloni sayısındaki  $\geq 2\text{-log}_{10}$  cfu/mL artma ve bakterisidal etkinlik başlangıç inokulumuna göre canlı bakteri sayısındaki  $\geq 3\text{-log}_{10}$  cfu/mL azalma olması şeklinde tanımlandı<sup>8</sup>.

### BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan 45 adet MRSA izolatının 20 (%45)'si kan, 10 (%22)'u yara, beşi (%11) trakeal aspirat, dördü (%9) balgam, ikisi (%5) aspirat sıvısı, biri (%2) eklem sıvısı, biri (%2) bronkoalveolar lavaj, biri (%2) nazofarenks ve biri (%2) burun kültüründen izole edilmiştir.

Agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri çalışılan 45 MRSA izolatının fosfomisin ve teikoplanin MİK sonuçları EUCAST v.13.1 kriterlerine göre değerlendirilerek fosfomisin MİK  $\leq 32$  mg/L ve teikoplanin MİK  $\leq 2$  mg/L olan değerler duyarlı olarak yorumlanmıştır. 45 izolatın fosfomisin MİK değerleri 1 mg/L ve 16 mg/L, teikoplanin MİK değerleri ise 0.125 mg/L ve 1 mg/L aralığında bulunmuştur. Fosfomisin MİK değerlerinin çalışıldığı sıvı mikrodilüsyon testinin referans yöntem olan agar dilüsyon testi ile kategorik uyum oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

Dama tahtası yöntemiyle teikoplanin-fosfomisin kombinasyon çalışması sonucu 22 izolatta (%49) sinerjistik etki ( $\Sigma FİK = 0.18-0.5$ ), 22 izolatta (%49) aditif etki ( $\Sigma FİK = 0.5-1$ ) ve birinde (%2) indiferans etki ( $\Sigma FİK = 1$ ) tespit edilmiştir. 45 MRSA izolatının  $\Sigma FİK$  ortalaması 0.5 bulunmuştur. Çalışmada antagonistik etki tespit edilmemiştir.

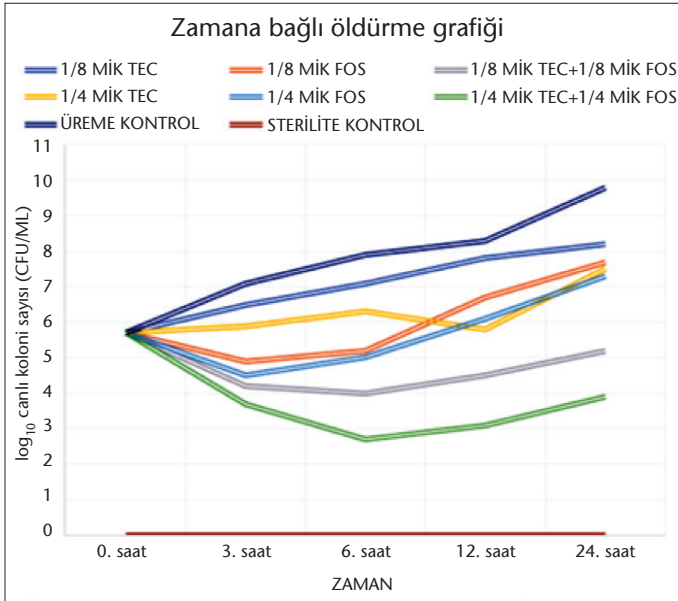
Zamana bağlı öldürme testi çalışılan izolatın 1/8 MİK teikoplanin + 1/8 MİK fosfomisin (0.06 mg/L teikoplanin ve 0.5 mg/L fosfomisin) kombinasyonu incelendiğinde en etkili ajana kıyasla canlı bakteri sayısının  $\log_{10}$  tabanındaki farkının ikinin üzerinde olduğu 12. ve 24. saatte sinerjizm ve 1/4 MİK teikoplanin + 1/4 MİK fosfomisin (0.12 mg/L teikoplanin ve 1 mg/L fosfomisin) kombinasyonu incelendiğinde ise 6. saat, 12. saat ve 24. saatte sinerjizm tespit edilmiştir.

1/4 MİK teikoplanin + 1/4 MİK fosfomisin kombinasyonunda başlangıç inokulumuna göre canlı bakteri sayısının  $\log_{10}$  tabanındaki farkının üçün üzerinde olduğu 6. saatte bakterisidal etkinlik olduğu, 12. saat ve 24. saatte ise bakterisidal etkinin kaybolduğu görülmüştür. Zamana bağlı öldürme testi sonucunda koloni sayısındaki değişim Tablo I'de, çalışılan izolatın zamana bağlı öldürme grafiği ise Şekil 1'de verilmiştir.

**Tablo I.** Çalışılan MRSA İzolatının Zamana Bağlı Öldürme Testinde Değerlendirme Saatlerindeki Canlı Koloni Sayısı ( $\log_{10}$ )

|                           | $\log_{10}$ Canlı Koloni Sayısı (CFU/mL) |         |         |          |          |
|---------------------------|------------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
|                           | 0. saat                                  | 3. saat | 6. saat | 12. saat | 24. saat |
| 1/8 MİK TEC               | 5.7                                      | 6.5     | 7.1     | 7.8      | 8.2      |
| 1/8 MİK FOS               | 5.7                                      | 4.9     | 5.2     | 6.7      | 7.7      |
| 1/8 MİK TEC + 1/8 MİK FOS | 5.7                                      | 4.2     | 4.0     | 4.5*     | 5.2*     |
| 1/4 MİK TEC               | 5.7                                      | 5.9     | 6.3     | 5.8      | 7.5      |
| 1/4 MİK FOS               | 5.7                                      | 4.5     | 5.0     | 6.1      | 7.3      |
| 1/4 MİK TEC + 1/4 MİK FOS | 5.7                                      | 3.7     | 2.7**   | 3.1*     | 3.9*     |
| Üreme Kontrol             | 5.7                                      | 7.1     | 7.9     | 8.3      | 9.8      |
| Sterilite Kontrol         | 0                                        | 0       | 0       | 0        | 0        |

TEC: Teikoplanin, FOS: Fosfomisin, \*: Sinerji, \*\*: Bakterisidal etki.



**Şekil 1.** Çalışılan MRSA izolatında antibiyotiklerin ve antibiyotik kombinasyonlarının 1/4x MİK ve 1/8x MİK değerleri için zamana bağlı öldürme testi sonuçları.

## TARTIŞMA

MRSA enfeksiyonlarındaki en önemli sorun çoğul antibiyotik direncidir<sup>9</sup>. Vankomisin ve teikoplanin, beta-laktamlara dirençli gram-pozitif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde günümüzde kullanılan glikopeptitlerdir. Glikopeptitlerin artan kullanımı, vankomisine orta duyarlı *S.aureus* (VISA), vankomisine dirençli *S.aureus* [vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA)] ve vankomisine heterojen dirençli *S.aureus* [heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)] suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu suşlar, ciddi MRSA enfeksiyonlarında glikopeptit kullanımıyla tedavi başarısızlıklarına neden olmuştur<sup>3</sup>.

MRSA enfeksiyonlarında kullanılabilecek yeni antibiyotik sayısının az olması, mevcut antibiyotik kombinasyonlarının değerlendirilmesini gerektirmektedir. MRSA suşlarında yapılan antibiyotik sinerji çalışmalarına örnek olarak, Çokça ve arkadaşları<sup>10</sup> dama tahtası mikrodilüsyon yöntemiyle MSSA suşlarında vankomisin-amikasin ve vankomisin-siprofloksasin kombinasyonlarını, MRSA suşlarında ise vankomisin-imipenem kombinasyonunu sinerjistik etkili bulmuştur. Vankomisin-rifampisin kombinasyonunun ise hem MSSA hem MRSA suşlarında indifferans etkili olduğu tespit edilmiştir.

Aktaş ve arkadaşları<sup>11</sup> 25 MRSA suşunda daptomisin; fosfomisin, gentamisin, fusidik asit ve rifampisin ile kombinasyonlarının in vitro aktivitesini dama tahtası yöntemiyle araştırmış ve sırasıyla %100, %68, %16 ve %12 sinerjistik etkileşim bulmuştur.

Bu çalışma ile çalışmamızda ortak antibiyotik olan fosfomisinin daptomisinle kombinasyonunun MRSA suşlarında %100 sinerjistik etki göstermesi dikkat çekmektedir.

MRSA tedavisinde kombine antibiyoterapiyle ilgili veriler, in vitro deneylerin yapıldığı çalışmalar dışında klinik araştırmalardan da elde edilmektedir. Sipahi ve arkadaşları<sup>12</sup> tarafından bildirilen MRSA'ya bağlı gelişen beyin apsesi olgusunda moksifloksasin-vankomisin ve vankomisin-rifampin kombine tedavisinden yanıt alınamamış ancak linezolid-rifampin kombinasyon tedavisinden yanıt alınmıştır.

Fosfomisin, dünya genelinde değişen uygulama endikasyonlarına sahip eski bir antibiyotiktir. MRSA ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) gibi farmakoterapiyi engelleyen bakteri suşlarının yakın zamanda ortaya çıkması, fosfomisin gibi uzun süredir kullanılan antimikrobiyal ajanların yeniden klinik kullanıma girmesine neden olmuştur<sup>13</sup>. Fosfomisin, diğer antibiyotik sınıflarına çapraz direnç göstermemektedir. Bu nedenle, diğer antibiyotiklerle kombinasyonu, dirençli bakterilere karşı potansiyel olarak sinerji gösterebilmektedir<sup>14</sup>. İntravenöz kullanılan fosfomisinin *S.aureus*'a karşı antibakteriyel etkisinin ve farmakodinamik indeksinin araştırıldığı bir çalışmada üç MSSA ve iki MRSA suşu kullanılmıştır<sup>15</sup>. Bu çalışma sonucunda elde edilen farmakodinamik parametrelere ( $C_{max}$ /MİK, AUC/MİK) göre fosfomisinin *S.aureus* enfeksiyonlarında iyi bir terapötik seçenek olabileceği bildirilmiştir. Bunun dışında fosfomisinin *S.aureus*'un fagositler tarafından fagosit edilmemesini ve hidroksil radikallerini indükleyerek hücre dışı ve hücre içi öldürülmesini artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur<sup>16</sup>.

Fosfomisin içeren antibiyotik kombinasyon çalışmalarına örnek olarak Grif ve arkadaşları<sup>17</sup> dama tahtası mikrodilüsyon tekniğini kullanarak, fosfomisin ile vankomisin, rifampisin, linezolid, kinopristin/dalfopristin, sefazolin, meropenem ve moksifloksasin kombinasyonlarının aktivitesini iki *S.epidermidis* ve beş *S.aureus* suşunda in vitro olarak incelemiştir. Bu kombinasyonların tümünde en yaygın etki sinerjistik etki (%78) olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer olarak Kussmann ve arkadaşları<sup>18</sup> beş MRSA ve beş MSSA suşunda fosfomisin-sefazolin kombinasyon tedavisini in vivo olarak *Galleria mellonella* modeliyle, in vitro olarak ise dama tahtası yöntemiyle test etmiş ve her iki yöntemde de tüm suşlarda sinerjistik etki tespit etmiştir. Bu çalışmalardaki veriler, diğer antistafilokokal antimikrobiyallerle kombinasyon halinde kullanılan fosfomisinin önemli bir potansiyel antimikrobiyal ajan olduğunu göstermiştir.

Antibiyotik kombinasyonlarının sinerjistik etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda dama tahtası yöntemi dışında bakterisidal etkinin değerlendirilebildiği zamana bağlı öldürme deneyleri de yapılmaktadır. Bu deneylerde sinerjistik etkinliğin değerlendirilebilmesi için kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonları ve örnekleme zaman noktalarıyla ilgili araştırmacılar farklı yöntemler kullanmaktadır. Bu durum testin standart bir uygulamasının ve değerlendirmesinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Chen ve arkadaşları<sup>19</sup> sekiz *S.aureus* izolatında linezolidin tek başına ve fosfomisin ile kombinasyonunun antibakteriyel etkisini dama tahtası ve zamana bağlı öldürme deneyleri ile araştırmış, sekiz suş



için de sinerjistik etki tespit etmiştir. Coronado ve arkadaşları<sup>20</sup> ise iki MRSA ve iki MSSA suşunda zamana bağlı öldürme yöntemiyle daptomisin-fosfomisin antibiyotik kombinasyonunun antimikrobiyal aktiviteyi artırdığını göstermiştir.

MRSA enfeksiyonlarının glikopeptit antibiyotiklerle tedavisi sürecinde MİK değerlerinde artış ve direnç gelişimi görülebilmektedir. Zheng ve arkadaşları<sup>21</sup> iki MRSA ve iki hVISA izolatında 28 gün boyunca in vitro olarak tek başına vankomisin ve vankomisinle sırasıyla sefazolin, fosfomisin, gentamisin, meropenem, rifampin ve piperasilin kombinasyonlarının vankomisin MİK değerlerine ve hücre duvar kalınlığına etkisini test etmiştir. Bu çalışmada yalnız vankomisin ve beta-laktam antibiyotik kombinasyonlarının tedavi sırasında vankomisin MİK artışlarını önlediği ve hücre duvar kalınlığını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Tek başına vankomisin kullanımı ve beta-laktam içermeyen kombinasyonların kullanımında ise tedavinin 2 - 4. haftaları sırasında vankomisin MİK değerlerinde ve hücre duvar kalınlığında artış görülmüştür.

Biyofilm oluşumunun antibiyotiklere dirençli bir durum oluşturmamasından dolayı antibiyotik kombinasyonlarının *S.aureus*'un oluşturduğu biyofilme etkisini ölçen çalışmalar da yapılmaktadır. Tang ve arkadaşları<sup>22</sup> planktonik ve biyofilme gömülü MRSA ve MSSA suşlarında rifampisin ve fosfomisin; fusidik asit, linezolid, vankomisin, teikoplanin, minosiklin ve tigesiklinle yapılan kombinasyonlarının etkinliğini incelemiştir. Linezolid, minosiklin, vankomisin veya teikoplanin ile birleştirilen fosfomisin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gelişmiş antibakteriyel aktiviteler sergilemiş ve rifampisin kombinasyonlarından daha iyi performans göstermiştir. Bu çalışma fosfomisinle yapılan antibakteriyel kombinasyon tedavilerinin MRSA ve MSSA nedenli kateterle ilişkili enfeksiyonlarda veya protez eklem enfeksiyonlarında terapötik avantajlar sağlayabileceğini göstermiştir.

İn vivo ortamdaki biyofilmler üzerinde de antibiyotik kombinasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bunlardan biri Shi ve arkadaşlarının<sup>23</sup> bir sıçanın karboksimetil selüloz kesesinde MRSA'nın oluşturduğu biyofilm modelinde vankomisin-fosfomisin kombinasyonunun bakterisidal etkisini gösterdikleri çalışmadır. Bu çalışmada kombinasyon tedavisinin biyofilme gömülü MRSA üzerinde sinerjistik olarak bakterisidal etkili olduğu bulunmuştur.

Garrigos ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada<sup>24</sup> MRSA suşuyla oluşturulmuş yabancı cisim enfeksiyonu modelinde daptomisin-rifampin kombinasyonu ile fosfomisin'in ayrı ayrı daptomisin, imipenem ve rifampinle olan kombinasyonları karşılaştırılmış; daptomisin-rifampin kombinasyonunun MRSA yabancı cisim enfeksiyonlarına karşı en etkili tedavi olduğu ancak yüksek doz daptomisin veya rifampin ile fosfomisin kombinasyonlarının da bu ortamda etkili alternatif tedaviler olduğu bildirilmiştir.

Çalışmada test ettiğimiz teikoplanin ve fosfomisin antibiyotik kombinasyonu, Lee ve arkadaşları<sup>6</sup> tarafından bildirilen klinik bir olguda hasta tedavisinde kullanılmış ve iyileşme sağlanmıştır. Bildirilen olguda 85 yaşındaki kadın hastanın vankomisin veya teikoplanin monoterapisine rağmen düzelme olmayan osteomyelite bağlı MRSA bakteriyemisi, teikoplanin-fosfomisin kombinasyon tedavisiyle iyileşme göstermiştir.

Çalışmamızda MRSA enfeksiyonlarında yaygın kullanımı olan teikoplanin ile eski bir antibiyotik olan fosfomisin'in in vitro kombinasyonunun etkinliği araştırılmış ve dama tahtası yönteminde 45 MRSA izolatının 44'ünde sinerjizm veya aditif etki görülmüştür. Zamana bağlı öldürme yöntemiyle çalıştığımız izolatta ise 1/8 MİK teikoplanin + 1/8 MİK fosfomisin ve 1/4 MİK teikoplanin + 1/4 MİK fosfomisin kombinasyonlarında sinerjizm tespit edilmiştir. Bu sonuç izolatın dama tahtası testi sonuçlarıyla tutarlılık gösterdiğinden, zamana bağlı öldürme yöntemiyle dama tahtası testinin sonuçları uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca zamana bağlı öldürme yönteminde antibiyotiklerin 1/4 MİK kombinasyonlarının çalışıldığı testin 6. saatinde bakterisidal etki tespit edilmiş olması da önemli bir bulgudur. Bu çalışmanın zayıf tarafları olarak, moleküler yöntemlerle izolatların *mecA* ve *mecC* varlığının araştırılamamış olması, çalışmada teikoplanin veya fosfomisine dirençli izolat bulunmaması, zamana bağlı öldürme yöntemiyle fazla sayıda izolat çalışılamaması ve yalnızca bir antibiyotik kombinasyonunun test edilmiş olması sayılabilir. Bunların dışında antibiyotik kombinasyon deneyleri, sonuçları yorumlamada çıkacak zorluklardan dolayı fosfomisin için referans yöntem olan agar dilüsyon yöntemiyle çalışılamamış, 25 mg/L G-6-P içeren KAMHB ile hazırlanan dama tahtası yöntemiyle test edilmiştir. Benzer çalışmalarda da bu şekilde uygulandığı görülmüştür<sup>11,17,18</sup>.

İleri klinik çalışmalarla desteklenmesi koşuluyla, bu çalışma sonucunda MRSA enfeksiyonlarında teikoplanin-fosfomisin kombinasyonunun etkili bir alternatif tedavi seçeneği olabileceği söylenebilir. Antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda bu tür antibiyotik kombinasyon çalışmalarının yapılması, klinisyenlere farklı tedavi seçenekleri sunmakta, sağkalımın artırılması ve ölüm oranlarının azaltılmasına katkı sağlamaktadır.

Sonuç olarak, MRSA suşlarının etken olduğu toplum ve hastane kökenli enfeksiyonların artışı ve MRSA kökenlerinin birçok antibiyotiğe dirençli olmaları nedeniyle, bu bakterilerle oluşan enfeksiyonlarda akılcı antibiyotik kullanımına ve enfeksiyon kontrol önlemlerine dikkat edilmesi gerekmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, S.B. İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 05.10.2022 ve Karar no: 2022/0583).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. SURVEILLANCE REPORT: Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2014.
2. Li N, Zhu L, Xu G, Ge T, Qi F, Li M. Optimal teicoplanin dosage regimens for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in endocarditis patients and renal failure patients. J Chemother 2017; 29(6): 358-64. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1334031>

3. McGuinness WA, Malachowa N, Deleo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 2017; 90: 269-81.
4. Múñez RE, Ramos MA, Fernández CA. Fosfomycin in antimicrobial stewardship programs. *Rev Esp Quimioter* 2019; 32(Suppl 1): 62-6.
5. Falagas ME, Roussos N, Gkegkes ID, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: A review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 921-44. <https://doi.org/10.1517/13543780902967624>
6. Lee W Sen, Chen YC, Chen HP, Chen TH, Cheng CY. Vertebral osteomyelitis caused by vancomycin-tolerant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Experience with teicoplanin plus fosfomycin combination therapy. *J Microbiol Immunol Infect* 2016; 49(4): 600-3. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.09.002>
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Definitive document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(9): 509-15. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>
8. Lynne SG. Clinical microbiology procedures handbook. 4th ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 2016.
9. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31(4): e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
10. Çokça F, Arman D, Altay G. Vankomisin ile rifampisin, amikasin, siprofloksasin ve imipenem kombinasyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına in vitro sinerjik etkisi. *Klinik Dergisi* 1998; 109-11.
11. Aktas G, Derbentli S. In vitro activity of daptomycin combinations with rifampicin, gentamicin, fosfomycin and fusidic acid against MRSA strains. *J Glob Antimicrob Resist* 2017; 10: 223-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.022>
12. Sipahi ORŞ, Çağiran I, Yurtseven T, Taşbakan MI, Arda B, Tünger A, et al. Linezolid + rifampisin kombinasyonu ile tedavi edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu beyin apsesi olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 651-5.
13. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: An old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(2): 127-42. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0833-2>
14. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66(4): 359-68. <https://doi.org/10.1007/s00228-010-0794-5>
15. Noel A, Attwood M, Bowker K, MacGowan A. The pharmacodynamics of fosfomycin against *Staphylococcus aureus* studied in an in vitro model of infection. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 56(1): 105985. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105985>
16. Shen F, Tang X, Cheng W, Wang Y, Wang C, Shi X, et al. Fosfomycin enhances phagocyte-mediated killing of *Staphylococcus aureus* by extracellular traps and reactive oxygen species. *Sci Rep* 2016; 6(August 2015): 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep19262>
17. Grif K, Dierich MP, Pfaller K, Miglioli PA, Allerberger F. In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(2): 209-17. <https://doi.org/10.1093/jac/48.2.209>
18. Kussmann M, Obermueller M, Karer M, Kriz R, Chen RY, Hohl L, et al. Synergistic effect of cefazolin plus fosfomycin against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo in an experimental *Galleria mellonella* model. *Front Pharmacol* 2021; 12(May): 1-6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.685807>
19. Chen H, Li L, Liu Y, Wu M, Xu S, Zhang G, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of linezolid in combination with fosfomycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist* 2018; 11: 2107-15. <https://doi.org/10.2147/IDR.S175978>
20. Coronado-Álvarez NM, Parra D, Parra-Ruiz J. Clinical efficacy of fosfomycin combinations against a variety of gram-positive cocci. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; 37(1): 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.05.009>
21. Zheng X, Berti AD, Mccrone S, Roch M, Rosato AE, Rose WE, et al. Combination antibiotic exposure selectively alters the development of vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(2): e02100-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02100-17>

22. Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, Toh HS, Su BA, Chiang SR, et al. In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 944-50. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr535>
23. Shi J, Mao NF, Wang L, Zhang HB, Chen Q, Liu H, et al. Efficacy of combined vancomycin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms in vivo. PLoS One 2014; 9(12): 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113133>
24. Garrigós C, Murillo O, Lora-Tamayo J, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, et al. Fosfomycin-daptomycin and other fosfomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1): 606-10. <https://doi.org/10.1128/AAC.01570-12>