

# VANKOMİSİNE ORTA DERECE DUYARLI S. AUREUS KERATİTİNDE LİNEZOLİDİN TEK BAŞINA VE VANKOMİSİNLE KOMBİNE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Abdulkadir Küçükbayrak, Ümit Doğan, Fırat Zafer Mengelolu, Gulzade  
Ozyalvacı, Tekin Taş, Hayrettin Akdeniz  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi

# Giriş

- Keratit olgularında en sık etken *Staphylococcus aureus*'tur.
- Özellikle metisilin dirençli suşlar ciddi bir morbidite sorunu oluşturmaktadır.
- Son zamanlarda vankomisin orta derece duyarlı *S. aureus* suşlarında enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir.
- Vankomisin orta duyarlı suşların nedeni genotipik bir direnç değil fenotipik olarak hücre duvar kalınlığının artmasına bağlı vankomisinin hücreye girişinin zorlaşmasıdır. Bu durum enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sorun oluşturmaktadır.
- Son 10 yıl içerisinde onay alan linezolid bu sorunu çözmeye aday bir antibiyotik gibi durmaktadır. Metisilin rezistan *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisin orta duyarlı *Staphylococcus aureus* (VOSA) suşlarına etkin bir protein sentez inhibitörüdür.
- Literatürdeki çalışmalarda keratiti modellerinde kullanılan hayvan tavşandır.
- Bunun nedeni gözün büyük olması ve insan gözüne benzer bir yapısı olmasıdır.

# Amaç

- Bizim daha önce yaptığımız literatürde bir ilk olan tavşanlarda oluşturulan MRSA ilişkili keratit modelinde linezolid etkin bulunmuştu. Bu çalışmada ise tavşanlarda oluşturulan heterojen VOSA (hVOSA) keratit modelinde topikal linezolidin etkinliğini araştırdık.

# Deney Suşunun İzolasyonu

- \* Deney suşu olarak hVOSA Mu-3 standart suşu kullanıldı.
- \* Bu suşun frozen stok solüsyonu (%20 gliserol içeren triptik soy broth içinde); %5 koyun kanlı agara kolonilerin izolasyonu için ekildi.
- \* 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.
- \* İzole edilen kolonilerden bir kısmı alınarak steril saline içerisinde 0.5 McFarland (1-2x 10<sup>8</sup> bakteri/mL) yoğunluk oluşturacak şekilde süspanse edildi.
- \* Süspansiyonun bulanıklığı spektrofotometre ile ölçülerek ayarlandı.
- \* Bu solüsyondan 10'ar kat dilüsyonlar yapıldı.
- \* Dördüncü dilüsyondan (10.000 cfu/mL) 10 µL (100 kfu) tavşanların korneal enfeksiyonu oluşturmak için kullanıldı.

Sanders ME, Norcross EW, Moore QC III, et al.. Efficacy of besifloxacin in a rabbit model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis. *Cornea*. 2009;28:1055–1060. [Ovid Full Text](#) [SerialSolutions Bibliographic Links](#) [\[Context Link\]](#)

Dajcs JJ, Hume EB, Moreau JM, et al.. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1432–1437. [SerialSolutions Bibliographic Links](#) [\[Context Link\]](#)

# Tavşanlarda Korneal Enfeksiyon

- Bu çalışmada 2-3 kg ağırlığında New-Zealand tipi 24 beyaz erkek tavşan kullanıldı.
- Her tavşana genel anestezi olarak i.m. 10 mg/kg xylazine (100 mg/mL) ve 35 mg/kg ketamine hidroklorid (100 mg/mL) enjeksiyonu yapıldı.
- Topikal anestezi olarak her bir göze 2'şer damla proparakain hidroklorid (0.5 %) uygulandı.
- Her göz forceps klemp ile kaldırılarak, 0.1 mL'lik gaz sızdırmaz şiringada 30 gauge iğne ile korneal stroma içine doğru, 100 CFU hVISA içeren 10 µL sıvı enjekte edildi.
- Bu işlem çalışmaya dahil edilen tüm tavşanların sadece sol gözüne uygulandı.

Sanders ME, Norcross EW, Moore QC III, et al.. Efficacy of besifloxacin in a rabbit model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus keratitis. Cornea. 2009;28:1055–1060. [Ovid Full Text](#) [SerialSolutions](#) [Bibliographic Links](#) [\[Context Link\]](#)

Dajcs JJ, Hume EB, Moreau JM, et al.. Lysostaphin treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus keratitis in the rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:1432–1437. [SerialSolutions](#) [Bibliographic Links](#) [\[Context Link\]](#)

# Tavşan gözlerinin Muayenesi ve Skorlaması

- + Tüm çalışma tavşanlarının korneaları; hVOSA inokülasyonunun (tedavi öncesi) 16. saatinde ve 25. saatinde (tedavi sonrası) iki bağımsız göz hastalıkları uzmanı tarafından muayene edildi.
- + Bu muayene sırasında enfeksiyonunun şiddetini belirlemek için; enjeksiyon, kemozis, iritis, korneal infiltrat, korneal ödem, fibrini hipopyon ve epitel erozyonu varlığı gibi 8 parametre değerlendirildi.
- + Her hekim; her bir parametre için en fazla 4 puan, toplamda da 7 parametre için en fazla 28 puan verdi.
- + Her iki göz hekiminin değerlendirmesi sonucu elde edilen skorların ortalamaları alındı.
- + Kornealar; diameter ölçümü ve fluorescein ile boyanarak epitelyum erozyonu varlığı açısından değerlendirildi.

# Tedavi protokolü

- Tedaviye; oluşturulan hVOSA enfeksiyonununun 16. saatinde, skorlamadan hemen sonra başlandı.
- Tavşanlar; ortalamaları bilmeyen bir araştırmacı tarafından, 7'şerli 4 gruba ayrıldı.
- Birinci gruba steril fosfat-tampon saline solüsyonu, 2. gruba 50 mg/mL topikal vankomisin, 3. gruba 2 mg/mL topikal linezolid, 4. gruba 2 mg/mL dozunda topikal linezolid ve 50 mg/mL topikal vankomisin solüsyonları birer damla damlatıldı.
- Solüsyonlar; her bir göze bir damla olacak şekilde, 15 dakikada bir olmak üzere toplam 5 kez, daha sonra 30 dakikada bir olmak üzere toplam 14 doz olacak şekilde uygulandı (Toplam 19 doz tedavi).

# Tedavi Sonrası Korneaların Mikrobiyolojik Değerlendirmesi

- Tedavi sonunda her tavşanın sol gözü (toplam 24 tavşan) mikrobiyolojik değerlendirmeye tabi tutuldu.
- Kornealar alınarak steril kaplar içerisinde ağırlıkları ölçüldü.
- Daha sonra kaplara 2000 mcl steril salin solüsyonu yerleřtirildi.
- İçerik vortekslendi ve içerikten 1, 10 ve 100 mcl alınarak kanlı agara çiftli ekimler yapıldı.
- 37 0C'de bir gece bekletildikten sonra üreyen koloniler sayıldı ve CFU/Gram olarak hesaplandı.
- Her gruptan bir izolat BD Phoenix™ ile tanımlandı..



# Ötenazi ve dokuların imhası

- Tavşanlara 25. saatte (Enfeksiyon sonrası) 10 mg/kg xylazine (100 mg/mL) ve 35 mg/kg ketamine hidroklorid (100 mg/mL) enjeksiyonu yapılarak derin sedasyon sağlanacaktır. Kornea eksizyonu sonrası ötenazi yapılacaktır.

# İstatistik

- Veriler SPSS 17.0 programı ((version 11.5 for Windows; SPSS, Inc, Chicago, IL) ile istatistiksel değerlendirmeye alındı.
- Değişkenlerin dağılımı Shapiro–Wilk testi kullanılarak değerlendirildi.
- Değişkenlerin homojenitesini değerlendirmek için Levene testi kullanıldı.
- Veriler means  $\pm$  standard deviasyon veya medians (interquartile range, IQR) olarak gösterildi.
- Ortalama değerler (Mean) arasındaki farklar one-way analizi ile ortanca (median) arasındaki farklar ise Kruskal-Wallis testi ile hesaplandı.
- One-way anova testi ile veya Kruskal-wallis testi ile hesaplanan p değerleri anlamlı olursa a post hoc Tukey veya Conover nonparametric çoklu kıyaslama metodu ile gruplar arasındaki kıyaslama yapıldı. Wilcoxon testi grup içi kıyaslamalar için kullanıldı.
- $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.
- Bonferroni düzeltmesi gerekli yerlerde kullanıldı.

# Bulgular-1

- Çalışmamızda ölen tavşan olmamış ve 24 tavşanla tamamlanmıştır. Çalışılan parametrelerin sayısal verileri Tablo.1'de sunulmuştur.

# Tablo.1 Gruplarda Çalışılan Parametrelerin Değerleri

Gruplar	Üreme koloni sayısı (log)	Tedavi Öncesi skorlar	Tedavi Sonrası Skorlar
Grup-1	7 (6,7-7,0)	11 (8-18)	24,17±4,40
Grup-2	5,7 (0-6,7)	10,5 (8-13)	14,33±5,79
Grup-3	6,5 (6,3-6,9)	11(11-18)	17,50±2,43
Grup-4	6 (4,7-6,3)	14 (9-15)	12,50±4,72

# Bulgular-2

- Çalışma grupları arasında; bakteri sayıları ve tedavi sonrası göz klinik skorlamaları arasında anlamlı fark bulunmuştur (Tablo. 2).

## Tablo.2 Çalışılan Parametrelerin Gruplar arası Değerlendirilmesi

Parametreler	p
Bakteri üreme sayısı (log)	0,005*
Tedavi öncesi	0,32
Tedavi sonrası	0,0001**

\*Kruskal Wallis  $p < 0,005$ , \*\*One-W Anova  $p < 0,005$

# Bulgular-3

- Grup içi yapılan istatistikte, bakteri sayılarının median değer kıyaslamasında en düşük değer vankomisin (VA) grubunda en yüksek değer kontrol grubunda olmakla birlikte anlamlı fark sadece kontrol ile vankomisin+linezolid (VA +LZD) grubunda bulundu. Tedavi sonrası ortalama klinik skorlamalarda ise en düşük skor VA-LZD, en yüksek skor kontrol grubunda saptandı. Anlamlı fark ise kontrol ile VA arasında (p:0,006) ve kontrol ile VA+LZD arasında (p: 0,001) saptandı. (Tablo-3)

# Tablo.3 Grup için Karşılaştırmalar

Grup İçi Karşılaştırma	Bakteri koloni sayısı (log)	Tedavi sonrası klinik skorlar
1.2	0,016	0,006**
1.3	0,032	0,08
1.4	0,008*	0,001**
2.3	0,095	0,62
2.4	0,69	0,89
3.4	0,016	0,25

\*Bonferroni düzeltmesine göre anlamlık  $p < 0,008$ , \*\*Tukey'e göre anlamlık düzeyi  $p < 0,05$



# Sonuç

- Sonuç olarak hem bakteri sayılarında hemde tedavi sonrası klinik skorlamalarda kontrole göre anlamlı azalma sağlayan sadece VA+LZD grubuydu. VA+LZD heterojen vankomisin orta derece duyarlı *Staphylococcus aureus* tedavisinde kullanılabilir.
- Linezolidin; VOSA olanlarda dahil olmak üzere MRSA ilişkili keratitte kullanılabilecek vankomisine alternatif bir ilaç olabileceğini düşünüyoruz. Özellikle vankomisin ve linezolid kombinasyonu VOSA suşlarında hem bakteri yükünü azaltması açısından hemde klinik skorları iyileştirmesi açısından uygun bir kombinasyondur.

# Öneriler

- Bu çalışmanın sonuçları daha önce yaptığımız deneysel çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde; linezolidin keratit modellerinde kullanılabilecek alternatif bir ilaç olabileceğini fakat daha güçlü bir öneri oluşturabilmek için insan çalışmalarına ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz