

STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI*

COMPARISON OF THE METHODS USED FOR THE DETECTION OF
METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI

Çiğdem KUZUCU**, **Mehmet DALGALAR****

Rıza DURMAZ**, **Şahin DİKEREL****

ÖZET: Bu çalışmada, laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli olarak saptanan 112 *Staphylococcus aureus* ve 93 koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşunda metisilin direnci, mikrodilüsyon ve oksasilin tuz agar tarama testleri çalışılarak disk difüzyon yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Uyumsuz sonuçlarda polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle *mecA* geni araştırılmıştır. *S.aureus* suşlarının tamamı (%100) ile KNS suşunun %69.9'u (65/93) her üç yöntemle de metisiline dirençli olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle dirençli bulunan 28 KNS suşu ise, oksasilin tuz agar tarama yöntemiyle duyarlı olarak bulunmuş ve bu suşların 27'sinde *mecA* geni pozitif olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, *S.aureus* suşlarında metisilin direncini saptamada test edilen her üç yöntemin de uygun olduğunu, ancak KNS suşları için oksasilin tuz agar yönteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Stafilokok, metisilin direnci, disk difüzyon, mikrodilüsyon, agar tarama, mecA.*

SUMMARY: In this study, the methicillin resistance of 112 *Staphylococcus aureus* and 93 coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) strains, which were initially found methicillin resistant by routine disk diffusion method in our laboratory, have been searched by microdilution and oxacillin agar screen test and the results were compared with the results obtained by disk diffusion method. The presence of *mecA* gene was investigated by polymerase chain reaction in case of discordant results. All *S.aureus* strains (100%) and 69.9% (65/93) of CNS strains were found resistant to methicillin by three of the methods. Of CNS isolates, 28 strains which were found methicillin resistant by disk diffusion method, were found methicillin susceptible by oxacillin agar screen method, and 27 of these were detected as *mecA* positive. Our results indicated that, the three methods tested were reliable for the detection of methicillin resistance in *S.aureus* strains, but oxacillin agar screen revealed to be unsatisfactory for the detection of methicillin resistance in CNS.

* XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (30 Eylül-5 Ekim 2002, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

Key words: Staphylococci, methicillin resistance, disk diffusion, microdilution, agar screen, mecA.

GİRİŞ

Stafilokoklarda metisilin direnci, hızla yayılan ve özellikle hastanede yatan hastalarda oldukça yüksek seviyelere ulaşmış olması nedeniyle de tedavide sorunlar oluşturan önemli bir problemdir. Metisiline dirençli suşların beta laktam antibiyotikler yanında, diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabilmeleri metisilin direncinin kısa sürede, doğru olarak saptanmasının önemini daha da artırmaktadır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, agar dilüsyon, mikrodilüsyon, lateks aglütinasyon tarama testi, otomatize sistemler ve moleküler yöntemler gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır¹⁻⁴. Ancak rutin uygulamada bu yöntemlerin herbirinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Dirençli suşların bazılarında, metisilin direncinin ekspresyonu heterojen olduğundan, bu suşlar beta-laktam antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarına karşı duyarlı saptanabilmektedirler^{1,2}. Bu nedenle metisilin direncini saptamada, direncin oluşumunda etkili olan *mecA* geninin araştırıldığı polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PZR) geliştirilmiştir. Yalnızca metisiline dirençli suşlarda bulunan *mecA*'nın gösterilmesi, izolatin dirençli olduğunun kanıtı kabul edilmektedir⁵.

Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklarda metisilin direncini saptamada üç fenotipik yöntem karşılaştırılarak, elde edilen sonuçlar polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle araştırılan *mecA* geni bulguları ile tartışılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve laboratuvarımızda rutin olarak disk difüzyon yöntemiyle oksasiline dirençli bulunan 112 *Staphylococcus aureus*, 93 koagülaz negatif stafilokok (KNS) olmak üzere toplam 205 izolat alındı. Metisilin direncini saptamak için mikrodilüsyon yapıldı ve eş zamanlı olarak disk difüzyon testi yeniden çalışıldı. Doğrulama testi olarak oksasilin tuz agar tarama testi yapıldı. Uyumsuz örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *mecA* geni araştırıldı.

Duyarlılık yöntemleri National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerine göre çalışıldı^{6,7}. Oksasilin toz antibiyotik Sigma'dan temin edildi. Standart suş olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve *S. aureus* ATCC 70699 kullanıldı.

PZR ile *mecA* geni saptanmasında, lizozim (20µg/ml) ve stafilolizin (100µg/ml) ile bakteriyel lizisi takiben standart fenol-kloroform ekstraksiyon ve etanol presipitasyonu uygulandı. *mecA*₁ ve *mecA*₂ primerleri kullanılarak amplifikasyon yapıldı. Agaroz jel elektroforezini takiben 310 baz çiftlik amplifikasyon bandının görülmesi *mecA* pozitif olarak değerlendirildi⁸.

BULGULAR

Çalışmamızda, disk difüzyon, oksasilin agar tarama testi ve mikrodilüsyon ile *S.aureus* suşlarının tamamı metisiline dirençli bulunmuş ve metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları için yöntemler arasındaki uyum %100 olarak belirlenmiştir.

Toplam 93 KNS suşunun 65'i (%69.9) her üç yöntemle de metisiline dirençli olarak saptanmış, ancak disk difüzyon testi ile dirençli bulunan 28 izolat oksasilin agar tarama testi ile duyarlı olarak sonuç vermiştir. Bu suşlardan 27'si mikrodilüsyon testi ile dirençliken biri duyarlıdır. Çalışılan yöntemlerle uyumsuz sonuç alınan 28 suşta *mecA* geni varlığı araştırıldığında, suşların 27'sinde *mecA* pozitifliği belirlenmiştir. *mecA* negatif bulunan bir suşun ise, oksasilin agar tarama testi ile duyarlı, disk difüzyon ve mikrodilüsyon ile dirençli olduğu gözlenmiştir (Tablo I).

Tablo I: *mecA* Geni Araştırılan Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Yöntemler Arasındaki Korelasyon

Yöntem	<i>mecA</i> Pozitif (n: 27)		<i>mecA</i> Negatif (n: 1)	
	Metisilin Duyarlı	Metisilin Dirençli	Metisilin Duyarlı	Metisilin Dirençli
Oksasilin tuz agar tarama	27	–	1	–
Disk difüzyon	–	27	–	1
Mikrodilüsyon	1	26	–	1

KNS izolatlarında *mecA* geni varlığı ile metisilin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri arasındaki korelasyon Tablo II'de görülmektedir.

Tablo II: *mecA* pozitif Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Metisilin MİK (µg/mL) Değerlerinin Dağılımı

<i>mecA</i>	Metisilin MİK Değerleri (µg/mL)											
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	
Pozitif (n: 27)	–	1	–	–	8	7	5	1	–	–	5	
Negatif (n: 1)	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	

TARTIŞMA

Stafilokokların bir çok türünde heterojen metisilin direnci bulunmakta ve bu direnci gösterebilmek için çeşitli laboratuvar yöntemleri geliştirilmektedir⁵. *S. aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanması sırasında şüpheli sonuç alındığında, NCCLS tarafından önerilen doğrulama testi oksasilin tuz agar tarama testidir. Mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve disk difüzyonda özellikle heterorezistans varlığında yorum yapmak güçtür. Bu nedenle doğrulama amacıyla, 6 µg/mL oksasilin olacak şekilde %4 NaCl eklenmiş Mueller-Hinton agara 10⁴CFU/ml nokta inokülasyon yapılmakta ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Bu yöntem *mecA* geninin saptandığı referans yöntemle en iyi korelasyonu sağlamaktadır⁹. Swenson ve arkadaşları¹⁰, *S.aureus* türlerinde mikrodilüsyon, disk difüzyon ve oksasilin tuz agar tarama testi arasından, oksasilin tuz agar tarama yönteminin duyarlılığını en yüksek olarak saptamışlardır. Oksasilin agar tarama testi duyarlı ve özgül bir test olarak tanımlanmasına rağmen, Cavassini ve arkadaşları¹¹ MRSA suşlarında bu yöntemin duyarlılığını düşük (%82.5) bulmuşlardır. Ögünç ve arkadaşları¹² *S.aureus* izolatlarında metisilin direncini saptamada, mikrodilüsyon yönteminin duyarlılığını %95.5, disk difüzyon yönteminin duyarlılığını %95.5, özgüllüklerini ise sırasıyla %99.1

ve %93.4 olarak bildirmişlerdir. Oğuz ve arkadaşları¹³ *S. aureus* izolatlarında agar tarama, disk difüzyon ve PZR yöntemleriyle metisilin direncini araştırmışlar, agar dilüsyona göre, agar tarama yönteminin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %95, disk difüzyonun duyarlılığını %100, özgüllüğünü %92.6 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda *S. aureus* izolatlarında disk difüzyon, mikrodilüsyon ve oksasilin tuz agar tarama testi sonuçları arasında tam bir uyum bulunmuştur.

Koagülaz negatif stafilokoklar mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla izole edilen mikroorganizmalardır. KNS suşlarında metisilin direncini saptamak zor olduğundan, NCCLS bu organizma için oksasilin yorumlama kriterini yeniden modifiye etmiş ve MIK $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ ise duyarlı, $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ise dirençli olarak tanımlamıştır⁷. Tenover ve arkadaşları¹⁴, oksasilin tuz agar tarama testinin duyarlılığını KNS'lar için düşük bulmuşlar ve NCCLS tarafından da KNS'lar için artık önerilmediğini, ancak *S. aureus* izolatları için kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Stafilokoklarda *mecA* geninin varlığı, metisilin direnciyle sinonim olarak düşünülür ve antibiyotik duyarlılık testlerini değerlendirirken sıklıkla referans yöntem olarak *mecA* genini saptayan moleküler yöntemler kullanılır^{3,15-17}. PZR, metisilin direncini saptamak için altın standart olarak tanımlanmasına rağmen, çoğu laboratuvar rutin olarak bu yöntemi kullanmak maliyet açısından uygun değildir. Çalışmamızda *mecA* geni bulunan 27 KNS suşu disk difüzyon ve mikrodilüsyon ile metisiline dirençli bulunurken, oksasilin agar tarama ile duyarlı bulunmuştur. Bu bulgu, önceki araştırmacıların belirttikleri gibi oksasilin tuz agar tarama testinin KNS'lar için uygun olmadığını desteklemektedir.

Sonuç olarak NCCLS'in önerdiği disk difüzyon yöntemi, inkübasyon koşulları ve süresine uyularak, ekonomik ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle stafilokoklardaki metisilin direncinin araştırılmasında güvenle kullanılabilir. Ancak KNS izolatlarının metisilin direncini saptamada oksasilin tuz agar tarama testi kullanılmamalı ve şüpheli sonuçlarda doğrulama testi olarak mümkünse *mecA* geni araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R: Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 2051-2054.
2. Gradelski E, Valera L, Aleksunes L, Bonner D, Tomc JF: Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 2961-2963.
3. Yamazumi T, Furuta I, Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN: Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-screen latex agglutination test, and *mecA* analysis for detecting oxacillin resistance in a geographically diverse collection of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 3633-3636.
4. Yamazumi T, Marshall SA, Wilke WW, Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN: Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 53-56.
5. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE: Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 2170-2173.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 11th Informational Supplement M100-S11, 2001. NCCLS, Wayne.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard M7-A4, 1997, 4th ed. NCCLS, Wayne.
8. Murakami K, Minamide W: PCR identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ (Eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. 1993, 1st ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
9. Gill V, Fedorko DP, Witebsky FG: The clinician and microbiology laboratory, p: 205. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, 2000, 5th edition, Churchill Livingstone, Philadelphia.
10. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, Mohr O'hara C, Tenover FC: Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001, 39: 3785-3788.
11. Cavassini M, Wenger A, Jaton K, Blanc DS, Bille J: Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999, 37: 1591-1594.
12. Ögünç D, Çolak D, Bakır Saygan M, Öngüt G, Saygan S, Gültekin M: *Staphylococcus aureus* suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankem Derg 2001, 15: 84-87.
13. Oğuz Avkan V, Dodanlı S, Yıldırım İ, Öztürk O, Sargüzel N, Seber E: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) prevalansının farklı yöntemlerle araştırılması. Flora 2001, 6: 178-183.
14. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH: Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: Results of a multicenter study. J Clin Microbiol 1999, 37: 4051-4058.
15. York MK, Gibbs L, Chehab F, Brooks GF: Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. J Clin Microbiol 1996, 34: 249-253.
16. Prasad KN, Kumar R, Tiwari DP, Mishra KK, Ayyagari A: Comparison of various conventional methods with a polymerase chain reaction assay for detecting methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains. Ind J Med Res 2000, 112: 198-202.
17. Jayaratne P, Rutherford C: Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from growth on mannitol salt oxacillin agar using PCR for nosocomial surveillance. Diagn Microbiol Infect Dis 1999, 35: 13-18.