

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA OKSASİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA E-TEST, MİKRODİLÜSYON VE DİSK DİFÜZYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dilara ÖĞÜNÇ, Dilek ÇOLAK, Mehmet Bakır SAYGAN, Gözde ÖNGÜT,
Sibel SAYGAN, Meral GÜLTEKİN

ÖZET

Staphylococcus aureus suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. Referans yöntem agar tarama testi ile karşılaştırıldığında, E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon testlerinin duyarlılığı sırasıyla % 98.5, % 95.5, % 95.5 ve özgüllüğü % 100, % 99.1, % 93.4 olarak bulunmuştur.

E-test yöntemi basit, güvenilir ve zaman kazandıran bir yöntem olması ve aynı zamanda duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeni ile rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecek bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

SUMMARY

Comparison of E-test, broth microdilution and disk diffusion methods for detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus strains.

The aim of this study was to compare E-test, broth microdilution and disk diffusion methods for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. By comparison with reference agar screening test, the E-test, broth microdilution, and disk diffusion tests showed sensitivities of 98.5%, 95.5%, 95.5%, and specificities of 100%, 99.1%, 93.4%, respectively. Because E-test is simple, reliable, and is not time consuming in addition to having high sensitivity and specificity; we have concluded that it is a useful test for routine clinical microbiology laboratories.

GİRİŞ

Son 30 yılda metisiline (oksasilin) dirençli stafilokok infeksiyonları dünyada önemli sorun olmuştur (12). Metisilin klinik kullanıma girmesinden sadece iki yıl sonra, 1961 yılında ilk metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatı saptanmıştır. Daha sonra bazı hastanelerde MRSA prevalansının endemik hale gelmesiyle problemin boyutları dramatik olarak büyümüştür (2,3).

MRSA prevalansı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Prevalansın düşük olduğu ülkelerde bunun ciddi sağlık politikaları ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Bu ülkelerde MRSA taşıyıcısı hastalar izole edilmekte, taşıyıcıların aktif taraması yapılmakta ve sonunda tedavi edilmektedirler. *S.aureus* suşlarında oksasilin direncinin doğru ve hızlı saptanma-

sı bu politikanın başarısı için esastır. Bunun dışında MRSA suşlarının doğru ve hızlı tanımlanması, bu mikroorganizma ile infekte hastaların tedavisinde uygun antibiyotığın seçilmesinde büyük önem taşımaktadır (12).

Metisiline direnç mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Stafilokoklardaki metisilin direnci sıklıkla β -laktam antibiyotiklere çok düşük afinitesi olan PBP2a aracılığıyla meydana gelir (2).

PBP2a'yı kodlayan gen olan mecA yalnız dirençli bakteri suşlarında bulunur. PBP2a miktarının aynı olmasına rağmen direnç düzeyinin farklı olabilmesi, metisilin direncinin fenotipik ekspresyonunda başka bazı faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmüştü ve *S.aureus* kromozomunda "fem" (factor essential for the expression of methicillin resistance) olarak isimlendirilen bir grup gen saptanmıştır (1,2). Bunlar içinde en önemlisi femAB'dir. Bu genin inaktivasyonu MRSA suşlarını metisiline duyarlı hale getirmektedir (2).

Diğer antibiyotiklere direnç genleri MRSA suşlarıncaya kolayca kazanılmakta ve bu suşlar sıklıkla çoklu antibiyotik direnci göstermektedirler (2). Bu nedenle oksasilin direncinin saptanması ayrı bir önem taşımaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında stafilokokların oksasilin direncinin saptanmasında; disk difüzyon, mikrodilüsyon, oksasilin agar tarama, E-test, otomatize duyarlılık testleri, DNA hibridizasyon teknikleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmaktadır. Oksasilin agar tarama yöntemi referans yöntem olarak kabul edilmektedir (5,8,9,11).

Sunulan çalışmada *S.aureus* suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin referans agar tarama yöntemiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Toplam 173 *S.aureus* klinik izolatu aşağıda belirtildiği gibi test edilmiştir.

Disk difüzyon testi: 1 μ g oksasilin diskleri kullanılarak, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerileri doğrultusunda yapılmıştır (10).

E-test: E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) üretici firmanın önerileri doğrultusunda % 2 NaCl eklenmiş Mueller-Hinton agar plaklarında yapılmıştır. MIC değeri ≥ 4 μ g/ml olan suşlar dirençli kabul edilmiştir.

Oksasilin agar tarama testi: 10^8 CFU/ml konsantrasyonda hazırlanan inokulum, 6 μ g/ml oksasilin ve % 4 NaCl eklenmiş Mueller-Hinton agar plaklarına yayılmış ve 35°C 'de 24 saat inkübasyondan sonra $1 \leq$ koloni üretmesi oksasilin direnci göstergesi olarak kabul edilmiştir (4).

Mikrodilüsyon testi: Besiyeri olarak katyon destekli, % 2 NaCl ilave edilmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmıştır. İnokulum $3-5 \times 10^5$ CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon plakları 35°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. MIC değeri ≥ 4 μ g/ml olan suşlar oksasiline dirençli olarak kabul edilmiştir (4).

S.aureus ATCC 25923, ATCC 29213 ve ATCC 43300 suşları referans bakteri suşları olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Agar tarama testi ile toplam 173 *S.aureus* suşunun 67'si oksasiline dirençli, 106'sı oksasiline duyarlı bulunmuştur.

Agar tarama testi referans test olarak kabul edildiğinde E-test, mikrodilüsyon testi ile disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük ve tutarlılığı tabloda gösterilmiştir.

Tablo. S.aureus suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında kullanılan test yöntemlerinin duyarlılık; özgüllük ve tutarlılık yüzdeleri.

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Tutarlılık (%)
E-test	98.5	100	99.4
Mikrodilüsyon	95.5	99.1	97.7
Disk difüzyon	95.5	93.4	94.2

TARTIŞMA

Metisiline dirençli ilk stafilokokun izole edildiği günden beri, stafilokoklarda β -laktam antibiyotiklere duyarlılık testleri problem olmuştur. Bunun nedeni stafilokokların çoğunda metisiline direncin heterojen olmasıdır. Heterorezistan stafilokoklara özel şartlar sağlanmadan β -laktam antibiyotikler için duyarlılık testleri yapıldığında, yavaş üreyen dirençli subpopülasyon gözden kaçır. Heterorezistan stafilokokların gerçek metisilin duyarlılıklarının ortaya çıkarılabilmesi için duyarlılık testlerinin özel şartlarda yapılması gereklidir (10).

37°C yerine 30-35°C'de inkübasyon, besiyerine NaCl eklenmesi, inkübasyon süresinin 16-18 saat yerine 24 saate uzatılması gibi modifikasyonların yapılması metisilin direncinin fenotipik ekspresyonunu artırmaktadır (10,12).

Çalışmamızda referans oksasilin agar tarama yöntemine göre E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla % 98.5, % 95.5, % 95.5 ve özgüllükleri % 100, % 99.1, % 93.4 olarak bulunmuştur.

Razlighi ve Derbentli (7) mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemlerini duyarlılık ve özgüllük yönünden % 100 uyumlu bulmuşlar, disk difüzyon yönteminin ise bu iki yöntemle karşılaştırıldığında duyarlılığını % 100, özgüllüğünü % 97.5 olarak belirlemişlerdir.

Sünbül ve ark. (9) mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin oksasilin agar tarama testine göre duyarlılık, özgüllük ve uyumunu araştırmışlar; testlerin duyarlılık, özgüllük ve uyumunu sırasıyla mikrodilüsyon yöntemi için % 95.4, % 93.1, % 94.1, disk difüzyon yöntemi için % 95.3, % 95.2, % 96 olarak bulmuşlardır.

Disk difüzyon yöntemi uygulanımı kolay ve ucuz bir test olmasına karşı, agar tarama testi ile uyumu düşüktür.

Mikrodilüsyon yönteminin özgüllüğü ve agar tarama testi ile uyumu yüksektir. Ancak, rutin laboratuvarlar için uygulanımı güç ve zaman alıcı bir yöntemdir.

Bizim çalışmamızda referans yöntemle en fazla uyum gösteren E-test yöntemi, NCCLS tarafından da önerilen bir yöntemdir.

E-test özgüllük ve duyarlılığı yüksek, uygulanımı kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Dezavantajı maliyetinin yüksek oluşudur. Bu nedenle özellikle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında oksasilin direncinin saptanmasında kullanılacak yöntemin belirlenmesinde yöntemin kolaylığı yanında maliyeti, laboratuvarında uygulanacak test miktarı ve halen uygulanmakta olan yöntemden memnuniyet gibi kavramların göz önünde tutulması gerekir.

KAYNAKLAR

- 1- Baron EJ: Genetic aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods used for its detection in clinical laboratories in the United States, *J Chemother* 7 (Suppl 3):87 (1995).
- 2- Carbon C: MRSA and MRSE: is there an answer? *Clin Microbiol Infect* 6 (Suppl 2):17 (2000).
- 3- Heseltine P: Has resistance spread to the community? *Clin Microbiol Infect* 6 (Suppl 2):11 (2000).
- 4- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Ninth International Supplement, M100-S9, NCCLS, Wayne (1999).
- 5- Novak SM, Hindler J, Bruchner DA: Reliability of two novel methods, Alamar and E test, for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 31:3056 (1993).
- 6- Petersson AC, Miorner H, Kamme C: Identification of *mecA*-related oxacillin resistance in staphylococci by the E test and the broth microdilution method, *J Antimicrob Chemother* 37:445 (1996).
- 7- Razlighi RA, Derbentli Ş: *Staphylococcus aureus* suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodilüsyon, disk diffüzyon ve agar tarama yöntemlerinin karşılaştırılması, *ANKEM Derg* 8:62 (1994).
- 8- Richard P, Meyran M, Carpentier E, Thabaut A, Drugeon HB: Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 32:613 (1994).
- 9- Sünbül M, Furtun F, Esen Ş, Eroğlu C, Günaydın M, Leblebicioğlu H: Hastane enfeksiyonlarından izole edilen stafilokok suşlarında oksasilin direncinin dört ayrı yöntemle araştırılması, *Mikrobiyol Bült* 34:215 (2000).
- 10- Ünal S: Stafilokoklarda metisilin direnci, "*Antibiyotik Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı*" kitabında s. 72, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 33, İstanbul (1997).
- 11- Ünal S, Werner K, DeGirolami P, Barsanti F, Eliopoulos G: Comparison of tests for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory, *Antimicrob Agents Chemother* 38:345 (1994).
- 12- van Griethuysen A, Pouw M, van Leeuwen N, Heck M, Willemse P, Buiting A, Kluytmans J: Rapid slide latex agglutination tests for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 37:2789 (1999).