

KLİNİK ÖRNEKLERDEN METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLASYONU İÇİN OKSASİLİNLİ MUELLER-HINTON BESİYERİNİN KULLANILMASI: ÖN ÇALIŞMA SONUÇLARI*

Nihal KARABİBER, Mehmet KARAHAN, Hasan KILIÇ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden 24 saatte metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolasyonuna olanak verecek bir besiyeri geliştirmektir. Bu amaçla, 100 örnekten kanlı jeloze, EMB jeloze yanısıra, 6 µg/ml oksasilin içeren Mueller-Hinton agar (OMHA) besiyerine ekim yapılmış, 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Besiyerlerinde oluşan kolonilerden Gram boyaması yapılmış ve daha sonra gerekli görülen testler (koagülaz testi, % 6.5 NaCl buyyonunda üreme, safra-eskülin reaksiyonu gibi) yapılarak idantifikasyona gidilmiştir. Kültürü yapılan 100 örnekten 50'sinde MRSA üremiştir. OMHA besiyerinde üreyen ve *S.aureus* olduğu tesbit edilen suşların metisilin direnci disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır.

OMHA besiyeri kanlı jeloze ile paralel kullanılarak, 24 saatte MRSA izolasyonuna olanak veren bir besiyeridir. Ancak bu besiyerinde *S.aureus*'dan başka mikroorganizmalar da (ör: *Candida*, enterokok, Gram negatif çomaklar gibi) ürettiği için, Gram boyaması ve koagülaz testi yapılmadan, OMHA besiyerinde meydana gelen üremeler MRSA olarak tanımlanmamalıdır.

SUMMARY

Use of oxacillin-containing Mueller-Hinton agar for isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from clinical samples: Preliminary study results.

The aim of this study was to devise a medium which confers us to isolate MRSA directly from clinical samples in 24 h. For this purpose oxacillin-containing (6 µg/ml) Mueller-Hinton agar (OMHA) was used as a primary inoculation medium together with blood agar (BA) and eosine methylene blue agar. 100 specimens were processed. Inoculated plates were incubated overnight at 37°C. Various colonies grown on OMHA and on other media were Gram stained, then tests required for identification such as coagulase test, growth in 6.5 % NaCl broth, bile-esculin reaction were performed. Of the 100 specimens cultured, 50 yielded MRSA. Methicillin-resistance was also confirmed by disk diffusion test.

OMHA can be used for isolation of MRSA from clinical samples if inoculated together with BA. However without performing Gram stain and coagulase test, all growth on OMHA should not be identified as MRSA, since various microorganisms other than MRSA such as *Candida*, enterococci, Gram-negative bacilli can grow in this medium.

* 10. Türkiye Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (6-9 Haziran 1995, Antalya).

Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Sağlık İşletmesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

GİRİŞ

Rutinde kullanılan besiyerleri ile, bir klinik örnekten metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolasyonu ve identifikasyonu en az 48 saat sürmektedir (1).

Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden 24 saatte MRSA izolasyon ve identifikasyonuna olanak verecek bir besiyeri geliştirmektir. Bu amaçla 6 µg/ml oksasilin içeren Mueller-Hinton agar (OMHA) besiyerini, rutinde kullandığımız besiyerlerinin yanında primer ekim için kullanarak, 24 saatte klinik örneklerden MRSA izolasyon ve identifikasyonu olanağı araştırılmıştır. OMHA besiyerini seçmemizin nedeni, daha önce yaptığımız bir çalışmada bu besiyerinde MRSA'ların 24 saatte ürediğini, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA)'ların ise hiç üremediğini saptamış olmamızdır (4).

GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 1994 - Mart 1995 tarihleri arasında cerrahi kliniklerden gönderilen 70'i yara sürüntüsü, 25'i balgam, 5'i kateter ucu olmak üzere toplam 100 adet klinik örnek çalışma kapsamına alınmıştır. Örnekler, deneyimlerimize göre MRSA üreme olasılığı yüksek olanlar arasından seçilmiştir.

Yara sürüntüleri ve balgam örnekleri azaltma yöntemi ile, kateter ucu kültürleri ise Maki yöntemi ile (6), kanlı agar (KA), eosine methylene blue (EMB) agar ve oksasilinli Mueller-Hinton agar (OMHA) besiyerlerine ekilmiştir. KA ve EMB agar üretici firmanın önerilerine göre (Oxoid), OMHA besiyeri ise yine üretici firmanın önerdiği şekilde (Biolife) hazırlanmış, 6 µg/ml olacak şekilde oksasilin katılmıştır. Potensi % 83.51 olan oksasilin M.Nevzat İlaç Firması- tarafından sağlanmıştır.

Ekim yapılan plaklar 37°C'de bir gece inkübe edilmiş, bu süre sonunda meydana gelen değişik kolonilerden Gram boyaması yapılmıştır. Gram boyalı preparatların incelenmesi sonucuna göre Gram pozitif koklar için identifikasyona yönelik olarak gerekli testler (tüp koagülaz testi, katalaz testi, % 6.5 NaCl buyyonunda üreme, safra-eskülün reaksiyonu gibi) yapılarak tanıya gidilmiş, Gram negatif mikroorganizmalar ise klasik yöntemlerle adlandırılmıştır (2, 3, 5).

OMHA besiyerinde ve KA'da paralel üreme gösteren ve *S.aureus* olarak tanımlanan mikroorganizmaların MRSA olup olmadığı, her iki plaktan ayrı ayrı olmak üzere, standart disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (7).

BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 100 klinik örneğin 50'sinden MRSA izole edilmiştir. Bu 50 örnekten 48'inde OMHA ve KA'da yoğun üreme olmuş, 2'sinde ise sadece OMHA besiyerinde üreme saptanmıştır. OMHA'da üreyen ve *S.aureus* olarak tanımlanan mikroorganizmaların tümü rutin antibiyogram sonuçlarına göre, metisiline dirençli bulunmuştur.

100 örnekten 10'unda metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), 2'sinde ise metisiline duyarlı *S.epidermidis* (MSSE) izole edilmiş, bu mikroorganizmaların hiçbiri OMHA'da ürememiştir.

OMHA besiyerinde MRSA'dan başka *Candida* sp., enterokok, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *Klebsiella* gibi çeşitli mikroorganizmalar da üremiştir. Bir balgam ve bir yara örneğinde OMHA ve KA'da MRSA ve *P.aeruginosa* karışık olarak üremiş,

OMHA'da *S.aureus* sarı pigmenti ve koloni morfolojisi ile *P.aeruginosa* kolonilerinden kolaylıkla ayırdedilebilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan 100 örneğin kültür değerlendirme sonuçları tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. 100 klinik örneğin kültür sonuçları.

İzole edilen mikroorganizma	Klinik örnek sayısı			
	Yara sürüntüsü	Balgam	Kateter ucu	Toplam
MRSA	40	9	1	50
MSSA	8	1	1	10
S.epidermidis	2	-	-	2
Beta-hem.streptokok	1	-	-	1
Enterokok	4	1	-	5
Candida sp.	-	5	-	5
E. coli	3	1	-	4
K.pneumoniae	-	2	-	2
P.aeruginosa	1	1	1	3
Üreme olmayan	11	-	2	13
Patojen etken üremeyen	-	5	-	5
Toplam	70	25	5	100

TARTIŞMA VE SONUÇ

MRSA ile kolonize ya da infekte olan hastaların mümkün olduğu kadar erken belirlenmesi hem infeksiyonun kontrolü, hem de hastaya uygun tedavinin başlanması bakımından son derece önemlidir. Bu şekilde zaman kaybedilmeden hastaların izolasyonu ve uygun şekilde tedavisine başlanabilmesi mümkün olabilir (1).

Çalışmamızın amacı, rutin besiyerleri ile en az 48 saat olan MRSA izolasyon ve identifikasyon süresini 24 saate indirebilmek idi. OMHA besiyeri amaca uygun bulunmuştur ve Mart 1995'den bu yana (Ağustos 1995) rutin olarak kullanılmaktadır. Bir ön çalışma niteliğinde olan bu çalışmada OMHA besiyerini yeterince test edebilmek için, MRSA izolasyon olasılığı fazla olan örnekler seçilmiştir. MRSA izolasyon oranı bu nedenle yüksektir (% 50). Esasen laboratuvarımızda 1994 yılı MRSA izolasyon oranı % 21.2 (228/1074)'dir.

Klinik örneklerden MRSA suşlarının primer izolasyonu amacıyla Van Enk ve Thompson (9) oksasilinli manitol salt agar (OMSA) besiyerini denemişler, 936 örnekten 105'inde manitol pozitif mikroorganizmalar izole etmişler, bunların da 29'unu MRSA olarak tanımlamışlardır. Aynı besiyerini kullanan Tunçkanat ve ark. (8)'nin çalışmasında ise 326 örnekten 29'unda manitolü fermente eden mikroorganizmalar üremiş, bunlardan 15'i MRSA olarak değerlendirilmiştir. Bu besiyerinde *S.aureus* dışı manitol pozitif (koagülaz negatif stafilkoklar, difteroidler ve mayalar) ve manitol negatif mikroorganizmaların da ürediği bildirilmiştir (8, 9).

Tunçkanat ve ark. (8), OMSA besiyerinde, mannitol fermentasyonu sonucu ortaya çıkan renk değişikliğinin çok net olarak değerlendirilemediğini, mannitol pozitif olduğu düşünülen kolonilerden ayrıca mannitol salt agara pasaj yapmaları gerektiğini, bunun da süreyi uzattığını belirtmişlerdir. Bizim kullandığımız OMHA besiyerinde ise MRSA'lar sarı pigmentli koloniler oluşturması ile diğer mikroorganizmalardan kolaylıkla ayırdedilebilmiştir.

Yukarıda sözü edilen araştırmacılar (8, 9), az sayıda MRSA içeren örneklerde ya da , MRSA'nın MSSA veya başka mikroorganizmalarla karışık olarak bulunduğu örneklerde MRSA'nın maskelenebileceğini, bu nedenle OMSA gibi seçici ve ayırıcı bir besiyerinin rutin olarak kullanılmasının, MRSA izolasyonunda duyarlılığı arttırabileceğini öne sürmüşlerdir.

Laboratuvarımızda MRSA, genellikle belirli kliniklerden gönderilen, belirli örneklerde, çoğunlukla saf kültür halinde ve yoğun olarak üremektedir. Bu nedenle kültürünü yaptığımız klinik örneklerde MRSA'nın başka mikroorganizmalar tarafından maskelenmesi gibi bir duruma pek rastlanmamaktadır. Ancak bu çalışma sırasında bir yara örneğinde MRSA ve MSSA'ların karışık bulunduğu, örneğin OMHA besiyerine ekilmiş olması sayesinde saptanabilmiştir. Tüm çalışma boyunca OMHA ve KA'da paralel üreyen *S.aureus*'ların rutin antibiyogramları her bir plaktan ayrı ayrı olmak üzere yapılıyordu. Sözü edilen örnekte, OMHA'dan yapılan antibiyogram sonucu MRSA, KA'dan yapılanın sonucu ise MSSA olarak değerlendirildi. KA'dan OMHA besiyerine yapılan pasajlarla KA'da MRSA ve MSSA'ların karışık halde bulunduğu saptandı. Bu da, bir klinik örnekte MRSA ve MSSA birlikte bulunuyorsa ve sadece KA'a ekilmişse, antibiyogram için seçilen 3-4 koloninin metisiline duyarlı suşlara rastlanması halinde, MRSA izolasyonunun mümkün olamayacağını göstermektedir.

Sonuç olarak, MRSA'ların klinik örneklerden primer izolasyonu için rutin besiyerlerinin yanısıra seçici ve ayırıcı bir besiyeri kullanılması, hem identifikasyon süresini kısaltması, hem de duyarlılığı arttırması bakımından yararlı olacaktır. OMHA besiyeri her iki amaca da uygun bulunmuştur. Yine de rutin antibiyogram yapılarak metisilin direncinin doğrulanması daha güvenli olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Boyce JM, Jackson MM, Pugliese G, Batt M D, Fleming D, Garner J S, Hartstein A I, Kauffman C A, Simmons M, Weinstein R: Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities, *Infect Control Hosp Epidemiol* 15: 105 (1994).
- 2- Facklam R R, Washington J A: *Streptococcus* and related catalase - negative Gram - positive cocci, "Balows A, Hausler W J, Herrmann K L, Isenberg H D, Shadomy H J (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.238, American Society for Microbiology, Washington (1991).
- 3- Farmer J J, Kelly M T: *Enterobacteriaceae* "Balows A, Hausler W J, Herrmann K L, Isenberg H D, Shadomy H J (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.360, American Society for Microbiology, Washington (1991).
- 4- Karabiber N, Karahan M: *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin saptanmasında agar tarama (screen) ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması, *Mikrobiol Bült* 29: 20 (1995).
- 5- Kloos W E, Lambe D W Jr: *Staphylococcus*, "Balows A, Hausler W J, Herrmann K L, Isenberg H D, Shadomy H J (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı kitabında s.222, American Society for Microbiology, Washington (1991).

- 6- Maki D G, Wiese C E, Sarafin H W: A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter-related infection, *N Engl J Med* 296: 1305 (1977).
- 7- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-A4*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1991).
- 8- Tunçkanat F, Özalp M, Arıkan S, Özkuyumcu C, Günalp A: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının izolasyonunda "oxacillin-mannitol-salt agar" besiyerinin kullanılması, *Mikrobiol Bül* 28: 93 (1994).
- 9- Van Enk R A, Thompson K D: Use of primary isolation medium for recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 30: 504 (1992).