

STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE VITEK OTOMATİZE SİSTEM SONUÇLARIYLA *mecA* GEN ANALİZİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Tuba ATAY, Zeynep GÜLAY

ÖZET

Staphylococcus aureus'un etken olduğu infeksiyonlarda uygun tedavinin yapılabilmesi için metisilin direncinin doğru olarak saptanması son derece önemlidir. Metisilin direncinin belirlenmesinde en fazla fenotipik duyarlılık testleri uygulanmaktadır. Ancak, son yıllarda otomatize sistemler bakteri identifikasyonu ve duyarlılıkların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 100 *S.aureus* izolatı ile beş kontrol izolatının Vitek otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile elde edilen metisilin duyarlılık sonuçlarıyla, altın standart olarak kabul edilen *mecA* gen analizi sonuçları karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya alınan klinik izolatların 70'inde *mecA* geni varlığı belirlenmiştir. *mecA* gen analizi ile karşılaştırıldığında Vitek otomatize sistemin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 83 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, Vitek sisteminin metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılabilir bir sistem olduğu, ancak duyarlılık paterninde uyumsuz sonuçlar elde edildiğinde diğer duyarlılık yöntemleriyle sonuçun doğrulanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, Vitek, otomatize identifikasyon sistemleri, *mecA* geni saptanması

SUMMARY

Comparison of the results obtained from Vitek system and mecA gene detection for methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates.

Determination of the methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains is crucial for effective treatment of infections caused by this microorganism. Although phenotypic susceptibility tests are widely employed in routine laboratories, automatic systems have begun to be used for the identification and susceptibility tests of the isolates in recent years. In this study we compared the methicillin susceptibility results of 100 clinical and five control *S.aureus* isolates obtained by the Vitek system (bioMerieux, France) and *mecA* gene analysis which is accepted as the "gold standard".

mecA gene was detected in 70 clinical isolates. The sensitivity and specificity of the Vitek system were 100% and 83% respectively when compared with the *mecA* analysis.

Our results suggest that the Vitek system is a reliable tool for the detection of methicillin resistance; however, in cases of discrepancies in the susceptibility patterns, other standard susceptibility methods should be applied in order to confirm the result.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, Vitek, automated identification systems, *mecA* gene analysis

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, deri ve yumuşak doku infeksiyonları başta olmak üzere kemik ve eklem infeksiyonları, pnömoni, bakteriyemi gibi değişik infeksiyon tablolarına yol açmaktadır (17). Bu bakteri virülans özellikleri yanısıra, tedavide kullanılan antibiyotiklere dirençli olabilmesi nedeniyle de önem taşımaktadır. *S.aureus* ile ilgili güncel direnç sorunlarının başında metisilin (oksasilin) direnci gelmektedir. Özellikle hastane kökenli infeksiyonlardan soyutulan stafilkok suşlarında metisilin direncine sık rastlanmaktadır. Bu direnç özelliğine yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) üretimi neden olmakta, *mecA* geni tarafından kodlanan bu

proteinin sentezi sonucunda stafilkoklar tüm beta-laktam ajanlara dirençli hale gelmektedir (2,15). Metisilin direncinin homojen veya heterojen direnç şeklinde görülebileceği bildirilmektedir (2,15). Metisiline dirençli izolatlar aynı zamanda kinolonlar, aminoglikozidler, makrolidler gibi çeşitli antibiyotiklere çoğul direnç göstermekte ve bu nedenle metisiline dirençli izolatlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde glikopeptid antibiyotikler tek seçenek haline gelmektedir (2,15).

Metisiline dirençli izolatları saptamak için laboratuvarlarda sıklıkla fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak heterojen direncin saptanmasında bu yöntemler yetersiz ka-

labilmektedir (3). Bu durumda, tedavi başarısızlıkları görüldüğü gibi, MRSA yayılımını engelleyecek önlemlerin alınması da gecikmektedir. Buna karşın bir suşun yanlış olarak dirençli sanılması da, glikopeptidlerin gereksiz kullanımına neden olmaktadır. MRSA suşlarının saptanmasında *mecA* geninin varlığını göstermeye yönelik polimeraz zincir tepkimesi (PZR) tabanlı yöntemler, homojen ve heterojen direncin ortaya çıkarılmasında duyarlılık ve özgüllüğünün % 100 olması nedeniyle tercih edilmektedir (10). Ancak bu yöntemlerin uygulaması da özel donanım ve eğitim gerektirmektedir. Bu nedenle *mecA* analizi ile uyumlu sonuçlar veren ve rutin

laboratuvarlarda uygulanabilecek güvenilir bir fenotipik yöntem arayışı sürmektedir.

Son yıllarda identifikasyon ve duyarlılık testlerinde otomatize sistemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan Vitek sistemi 1997'den beri Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarımızda da kullanılmaktadır.

Çalışmamızda *S.aureus* izolatlarının metisilin (oksasilin) duyarlılığının saptanmasında Vitek otomatize sistem sonuçlarıyla *mecA* gen analizi sonuçlarını karşılaştırarak duyarlılık sonuçlarında Vitek sisteminin güvenilirliğinin anlaşılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İzolatlar: Çalışmaya 1999 yılında klinik örneklerden izole edilen 100 *S.aureus* izolatı alınmıştır. Ayrıca kalite kontrol amacıyla çalışmaya dört *mecA* olumlu (bir homojen ve üç heterojen dirençli izolat; Doç. Dr. Sesin Kocagöz tarafından sağlanmıştır) ve bir de *mecA* olumsuz (*S.aureus* ATCC 25923) izolat dahil edilmiştir.

Vitek otomatize sistem duyarlılık testi: Bütün izolatlar ve kontrol suşlarına Vitek otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa; Versiyon -R06. 01) ve GPS 101 kartları kullanılarak duyarlılık testi uygulanmıştır. Uygulama sırasında üretici firma önerilerine uyulmuştur.

***mecA* gen analizi:** *mecA* gen varlığının saptanmasında Ünal ve ark. (16)'nın bildirdiği yöntem kullanılmıştır. Bakterilerden DNA eldesi amacıyla, tüm *S.aureus* izolatları, Mueller-Hinton sıvı besiyerinde 35°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra, 5000 rpm'de 20 dakika santrifügasyon uygulanmış ve tüpte çökelti ile birlikte bir mililitre kalacak şekilde üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Bakteri çökeltisi steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp, 14000 rpm'de 5 dakika olacak şekilde santrifügasyon yenilenmiştir. Daha sonra üst sıvı tamamen atılıp kalan bakteri çökeltisine 100 µg/ml'lik lizostafin solüsyonundan 50 µl eklenmiş ve 10 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 100 µg/ml'lik proteinaz K solüsyonundan 50 µl eklenmiş, 37°C'de 10 dakika bekletildikten sonra tüp 15 dakika kaynar su banyosunda tutulmuştur. Süre sonunda, 14000 rpm'de 10 dakika santrifügasyon işlemi sonrasında bakteri DNA'sı içeren üst sıvı steril mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.

mecA gen analizinde; 5' GTT GTA GTT GTC GGG TTT GG 3' ve 5' CCA CCC AAT TTG TCT GCC AGT TTC TCC 3' primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 5 µl (1/10 dilüsyon) bakteri DNA'sı, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM her dNTP'den, 1.25 ünite Taq polimeraz enzimi, 12 pmol her bir primerden ve 10x enzim tamponu konularak (toplam hacim 50 µl) hazırlanmış ve

Denatürasyon	94°C	30 saniye	} x30 siklus
Birleşme	55°C	30 saniye	
Uzama	72°C	2 dakika	
Son uzama basamağı	72°C	5 dakika	

olacak şekilde PZR uygulanmıştır.

PZR sonucunda agaroz jel elektroforezinde 1.8 kilobazlık ürün bandı görülen izolatlar *mecA* açısından olumlu olarak değerlendirilmiştir (16).

GPS 101 kartı ve *mecA* gen analizi sonucu uyumsuz çıkan izolatlar her iki yöntemle tekrar edilmiş, ayrıca bu izolatlara National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerilerine uyularak disk difüzyon yöntemi ile de duyarlılık testi uygulanmıştır (11).

İstatistiksel analizler: GPS 101 kartlarının duyarlılık ve özgüllük değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (14):

Duyarlılık: TP/TP+FN x100 (Toplam pozitiflik/Toplam pozitiflik + Hatalı negatiflik x 100)

Özgüllük: TN/TN+FP x100 (Toplam negatiflik/Toplam negatiflik + Hatalı pozitiflik x 100)

BULGULAR

Çalışmaya alınan 70 izolatta *mecA* geni varlığı belirlenirken, 30 izolatta ise *mecA* geni olumsuz olarak saptanmıştır. Vitek otomatize sisteminde ise 70 izolata ilave ola-

rak beş izolat daha metisiline dirençli bulunmuştur (Tablo 1). Kontrol izolatlarının her iki yöntemle de beklenen sonuçları verdiği görülmüştür.

Tablo 1. Vitek otomatize sistem ve *mecA* sonuçlarının karşılaştırılması.

	Vitek (+)	Vitek(-)
<i>mecA</i> (+)	70	0
<i>mecA</i> (-)	5	25

Vitek otomatize sisteminde metisiline dirençli olarak saptanan ancak *mecA* olumsuz olarak bulunan beş *S.aureus* izolatına NCCLS önerileri doğrultusunda disk difüzyon testi uygulandığında beşi de dirençli bulunmuştur. Bu izolatlar ikinci kez aynı yöntemle değerlendirildiğinde sonuçlarda değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre *mecA* gen analizi ile karşılaştırıldığında Vitek otomatize sisteminin duyarlılığı

% 100, özgüllüğü ise % 83 olarak bulunmuştur.

Ayrıca metisiline dirençli izolatların çoğul direnç göstermeleri nedeniyle tüm suşların duyarlılık paternleri incelenmiş ve uyumsuz sonuç elde edilen beş izolatın duyarlılık paterninin metisilin dirençli izolatlardaki duyarlılık paternine benzediği gözlenmiştir (Tablo 2). Bu nedenlerle *mecA* gen analizi sonuçlarının yanlış olabileceği de düşünülmüştür.

Tablo 2. Vitek ve disk difüzyon yöntemleri ile oksasiline dirençli ve duyarlı bulunan *S.aureus* izolatlarının diğer antibiyotiklere duyarlılığı.

% duyarlılık	E	CIP	OFX	GN	RIF	TE	CC	SXT	VA
MRSA (70)	13	0	1.4	0	0	0	70	87	100
MSSA (25)	100	92	96	100	96	88	96	96	100
Uyumsuz sonuçlar									
1	R	R	R	R	R	R	R	S	S
2	R	R	R	R	R	R	R	S	S
3	I	R	R	R	R	R	S	S	S
4	R	R	R	R	R	R	S	R	S
5	R	R	R	R	R	R	S	S	S

(E: eritromisin; CIP: siprofloksasin; OFX: ofloksasin; GN: gentamisin; RIF: rifampisin; TE: tetrasiklin; CC: klindamisin; SXT: trimetoprim- sulfametoksazol; VA: vankomisin) S: duyarlı; I: orta duyarlı; R: dirençli.

TARTIŞMA

Metisiline dirençli *S.aureus* nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında önemli bir yer tutmaktadır (18). Metisilin direncinin belirlenmesinde sıklıkla fenotipik duyarlılık testleri kullanılmakla beraber bu testler bazen heterojen direncin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Günümüzde *mecA* geninin varlığının gösterilmesine dayanan genotipik yöntemler metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir (6,9). Genotipik yöntemlerden PZR ise daha az DNA ile çalışılması ve uygulama kolaylığı açısından hibridizasyona göre tercih edilmektedir (16).

Son yıllarda rutin laboratuvarlarda, otomatize sistemler identifikasyon ve duyarlılık testlerinde hızlı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır. Ancak, bu yöntemlerle elde edilen sonuçların güvenilirliğinin araştırılması gerekmektedir.

Knapp ve ark. (7), 114 metisilin dirençli *S.aureus* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada Vitek GPS-SA duyarlılık

kartlarından elde ettikleri sonuçlarını standart yöntemler ve *mecA* gen hibridizasyon sonuçlarını karşılaştırdıklarında bütün izolatlarda uyumlu sonuçlar elde ettiklerini, ayrıca duyarlılık sonuçlarını 5-11 saat gibi kısa bir sürede aldıklarını bildirmişlerdir. Freebourg ve ark. (4), metisiline dirençli stafilkoklarda heterojen direnci saptama açısından farklı fenotipik yöntemler ve otomatize sistem ile elde ettikleri sonuçları, *mecA* gen sonuçlarıyla karşılaştırmışlar ve kullandıkları yöntemler içerisinde en başarılı sonuçları Vitek GPS-503 kartları ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yamazumi ve ark. (18) Vitek GPS 106 kartları ile elde ettikleri sonuçları *mecA* gen analizi ile karşılaştırmışlar GPS kartlarının duyarlılığını % 98, özgüllüğünü % 100 olarak belirlemişlerdir.

Skulnik ve ark. (13) ise, çeşitli ticari ve standart duyarlılık metodlarını *mecA* sonuçlarıyla karşılaştırdıkları çalışmalarında, Vitek sistemi ile % 14.2'sinde çok büyük hata, % 0.4'ünde büyük hata saptamışlar ve Vitek sisteminin

oksasilin duyarlılığının belirlenmesinde yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Ribiero ve ark. (12), Vitek GPS-101 kartları kullanarak oksasilin dirençli fakat beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna duyarlı buldukları sekiz izolata diğer duyarlılık yöntemlerini uygulamışlar ve bunların duyarlı olduğunu saptamışlardır. Çalışmalarında GPS-101 ile duyarlılık sonuçlarını tekrar ettiklerinde tüm izolatları duyarlı olarak saptadıklarını, problemin kullanılan karta bağlı olduğunu düşündüklerini söylemişlerdir. Bu araştırmacılar bir *S.aureus* izolatu oksasilin dirençli fakat eritromisin, klindamisin, gentamisin ve siprofloksasin duyarlı olarak bulunduğu zaman sonucun konfirme edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda Vitek GPS-101 kartlarıyla elde edilen duyarlılık sonuçlarının duyarlılık ve özgülüğünün yüksek olduğu görülmüş, ancak beş izolatta *mecA* varlığı saptanmazken, bu izolatlar GPS101 kartları ile metisiline dirençli bulunmuşlardır. *mecA* gen sonuçlarıyla uyumsuz çıkan izolatla-

ra NCCLS önerileri doğrultusunda yapılan disk difüzyon testi sonuçlarının da Vitek ile uyumlu olarak oksasiline direnç lehinde olduğu belirlenmiştir. Yine bu izolatların Vitek sisteminde beta-laktam dışı ajanlara duyarlılıkları incelendiğinde, duyarlılık paternlerinin MRSA izolatlarının duyarlılık paternlerine benzediği saptanmıştır.

Beş izolatta *mecA* geni saptanamamasının nedeni tam olarak açıklanamamakla birlikte büyük olasılıkla yetersiz DNA eldesinin neden olabileceği düşünülmektedir. Bu tip durumlarda *nucA* geninin de saptandığı multipleks PCR yöntemlerinin daha yararlı olduğu belirtilmektedir (1,8). Bunun yanı sıra, mevcut PBP'lerde nokta mutasyonları, başka bir PBP'nin aşırı yapımı gibi durumlarda da fenotipik testlerde direnç olmasına rağmen *mecA* negatifliği görülebilmektedir (5).

Sonuç olarak Vitek otomatize sisteminin metisilin direncinin belirlenmesinde rutin laboratuvarında kullanılabilecek güvenilir bir sistem olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- 1- Brakstad O G, Aasbakk K, Maeland J A: Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene, *J Clin Microbiol* 30:1654 (1992).
- 2- Chambers H F: Methicillin resistance in staphylococci; molecular and biochemical basis and implications, *Clin Microbiol Rev* 10:781 (1997).
- 3- Coudron P E, Jones D L, Dalton H P, Archer G L: Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis, *J Clin Microbiol* 24:764 (1986).
- 4- Freebourg N B, Nouet D, Lemee L, Martin E, Lemeland J F: Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staph, Vitek and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*, *J Clin Microbiol* 36:52 (1998).
- 5- Hackbarth C J, Kocagöz T, Kocagöz S, Chambers H F: Point mutations in Staphylococcus aureus PBP2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 39:103 (1995).
- 6- Jaffe R I, Lane J D, Alburg S V, Niemeyer D M: Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR, *J Clin Microbiol* 38:3407 (2000).
- 7- Knapp C C, Ludwig M D, Washington J A: Evaluation of differential inoculum disk diffusion method and Vitek GPS-SA card for detection of oxacillin resistant staphylococci, *J Clin Microbiol* 32:433 (1994).
- 8- Louie L, Matsumara S O, Choi E, Louie M, Simor A E: Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol* 38:2170 (2000).
- 9- Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Menard C, Roy P H, Ouellette M, Bergeron M G: Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis, *Antimicrob Agents Chemother* 44:231 (2000).
- 10- Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S: Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 29:2240 (1991).
- 11- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, M2-A6, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa (1997).
- 12- Ribiero J, Viera F D, King T, D'arezzo J B, Boyce J M: Misclassification of susceptible strains of Staphylococcus aureus by a rapid automated susceptibility testing system, *J Clin Microbiol* 37:1619 (1999).
- 13- Skulnick M, Simor A E, Gregson D, Patel M, Small G, Kreiswirth B, Hathoway D, Low D E: Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol* 30:1985 (1992).
- 14- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: *Biyoistatistik*, s. 125, Hatiboğlu Yayınevi, İstanbul (1989).
- 15- Ünal S: Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri, *Flora* 1:14 (1996).
- 16- Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch J E, Wu C Y E, Preston D, Skatrud P L: Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 30:1685 (1992).
- 17- Walvogel F A: Staphylococcus aureus, "Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds): *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s. 1754, Churchill-Livingstone, New York (1995).
- 18- Yamazumi T, Marshall S A, Wilke W W, Diekema D J, Pfaller M A, Jones R N: 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* 39:53 (2001).