

METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ SAPTANMASINDA MRSA ID KROMOJENİK BESİYERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Nevgün Sepin ÖZEN¹, Duygu DAĞLAR², Betil ÖZHAK BAYSAN³, Çiğdem YILDIRIM⁴, Hatice YAZISIZ⁵, Dilara ÖĞÜNÇ³, Gözde ÖNGÜT³, Dilek ÇOLAK³, Meral GÜLTEKİN³

¹Antalya Hıfzısıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANTALYA

²Serik Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANTALYA

³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTALYA

⁴Sorgun Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, YOZGAT

⁵Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANTALYA

ÖZET

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hem toplum hem de hastane kökenli infeksiyonlardan izole edilen önemli bir patojendir. *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesi, infeksiyon kontrol önlemlerinde ve hastanede yayılımın önlenmesi açısından anahtar rol oynamaktadır. Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen toplam 163 *S.aureus* suşunun tanımlanması Gram boyama, katalaz, lam ve tüp koagülaz yöntemleri ve BD Phoenix otomatize identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi kullanılarak yapılmıştır. Suşlarda *nuc* ve *mecA* genlerinin varlığı ve 16S RNA, özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle saptanmıştır. *S.aureus* olarak tanımlanan tüm suşların MRSA ID kromojenik agar besiyerine ekimi yapılarak plaklar 35°C'de aerobik ortamda inkübe edilmiş ve sonuçlar koloni renklerine göre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada MRSA ID besiyerinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. MRSA saptanmasında, MRSA ID besiyerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılığı % 85.4, özgüllüğü ise % 53.7 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak MRSA ID, 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda MRSA saptanmasında duyarlılığının yüksek olması nedeniyle kullanılabilir bir besiyeridir.

Anahtar sözcükler: kromojenik besiyeri, metisilin direnci, MRSA, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

Evaluation of MRSA ID Chromogenic Medium for Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen which is responsible for community-acquired and nosocomial infections. Rapid and accurate detection of methicillin resistance in *S.aureus* has become a key element on infection control measures and limiting the spread of this organism. In Akdeniz University Central Laboratory a total of 163 *S.aureus* strains which were isolated from various clinical specimens were identified by Gram staining, catalase test, slide coagulase test, tube coagulase test and BD Phoenix automated system. The presence of *nuc* and *mecA* genes and 16s RNA was detected using specific primers by PCR. The strains defined as *S.aureus* were inoculated on MRSA ID medium and incubated at 35°C aerobically. Results were evaluated according to colony colors. In this study we aimed to evaluate the performance of MRSA ID medium. The sensitivity and specificity of MRSA ID after 24 h incubation were found 85.4 % and 53.7 %, respectively. In summary, MRSA ID has been shown to be an applicable medium due to the high sensitivity for detection of MRSA after 18-24 h incubation.

Keywords: chromogenic medium, methicillin resistance, MRSA, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus nozokomiyal patojenler arasında ilk sıralarda yer alırken toplum-

dan kazanılmış sepsisin de önemli bir etkenidir⁽¹⁾. *S.aureus* nispeten benign deri infeksiyonuna yol açabileceği gibi ciddi, yaşamı tehdit eden sistemik infeksiyonlara da neden olabilmekte-

İletişim adresi: Meral Gültekin. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTALYA

GSM: (0506) 508 54 16

e-posta: mgultekin@akdeniz.edu.tr

Alındığı tarih: 25.11.2010, yayına kabul: 10.02.2011

*XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur. Poster No.66 (12-16 Eylül 2006, Antalya).

dir⁽¹⁵⁾. Klasik bilgilere göre *S.aureus* infeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotik penisilin iken bugün suşların % 80'den fazlasının penisilinlere dirençli hale geldiği görülmektedir. 1980'li yıllardan sonra ise metisilin direncinde artış görülmeye başlanmıştır. Metisilin direnci varlığı tüm beta-laktam antibiyotiklere direnci göstermektedir. Metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA)'larla oluşan infeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlanmakta ve mortalite, morbidite artmaktadır^(1,15). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S.aureus* izolatlarının doğru olarak tanımlanmasının yanında metisilin direncinin saptanması da büyük önem taşımaktadır. Metisilin direncinin saptanmasında fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Direncin saptanmasında *mecA* geni veya PBP2a'yı saptayan yöntemler referans yöntemlerdir⁽¹²⁾. Sefoksitin veya oksasilin duyarlılığının disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ya da oksasilin agar tarama testleri ile belirlenmesi, Clinical and Laboratory Standards Institute tarafından önerilen fenotipik yöntemlerdir⁽³⁾. Metisilin direncinin saptanmasında kullanılmak üzere çeşitli ticari kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Kromojenik besiyerleri hedef mikroorganizmanın enzimlerinin kromojenik substratlarını içeren, mikroorganizmanın bu substratı kullanması ile renkli koloniler oluşturmalarını sağlayan besiyerleridir. Yapılan çalışmalarda kromojenik besiyerlerinin konvansiyonel besiyerlerine göre etken patojenleri daha kısa sürede saptama ve karışık kültürlerden ayırmada daha etkili olduğu gösterilmiştir^(2,4,10). Kromojenik substrat içeren besiyerlerinin maliyeti daha fazla olmasına karşın, tanımlama için ek test gereksinimini azaltmakta, zamandan tasarruf sağlamaktadır. Bu faktörler nedeniyle kromojenik besiyerlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvar-

larında kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Çalışmamızda MRSA suşlarının tanımlanmasında MRSA ID (bioMérieux, Fransa) kromojenik besiyerinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden (96 kan, 41 cerahat, 13 trakeal aspirat, 5 idrar, 3 periton sıvısı, 2 nazal sürüntü, 2 kateter, 1 plevra sıvısı) izole edilen toplam 163 *S.aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların tanımlanması Gram boyama, katalaz, lam koagülaz ve tüp koagülaz yöntemleri ve BD Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD) otomatize identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi kullanılarak yapılmıştır. Stafilokoklara özgü 16S RNA, *S.aureus*'a özgü *nuc* geni ve metisilin direncinin saptanmasında altın standart olarak kabul edilen *mecA* geni varlığı özgül primerler (Tablo 1) kullanılarak PZR yöntemi ile araştırılmıştır⁽⁴⁾. *S.aureus* olarak tanımlanan tüm suşların kromojenik MRSA ID agar besiyerine ekimi yapılmış, plaklar 35°C'de aerobik ortamda inkübe edilerek, sonuçlar 24 ve 48 saat sonunda üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Yeşil renkli koloni oluşturan suşlar MRSA olarak tanımlanmış, renksiz koloni oluşması veya üreme olmaması metisilin duyarlı *S.aureus* (MSSA) varlığı olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

PZR yöntemi ile suşların 96'sında *mecA* geni pozitif, 67'sinde *mecA* geni negatif olarak

Tablo 1. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler^(4,9).

Primerler	Baz uzunluğu	Gen bölgesi
Forward-5'- AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' Reverse-5'-GGACTACCAAGGTATCTAAT-3'	798 bp	16SRNA
Forward-5'AAAATCGATGGTAAAGTTGGC-3' Reverse-5'AGTTCTGCAGTACCGGATTTC-3'	533 bp	<i>mecA</i>
Forward-5'GCGATTGATGGTGATACGGTT Reverse-5'AGCCAAGCCTTGACGAATAAA-3'	270 bp	<i>nuc</i>

bulunmuştur. *MecA* geni pozitif suşların 82'si 24 saatlik inkübasyon sonrasında, 90'ı 48 saatlik inkübasyon sonrasında MRSA ID besiyerinde yeşil koloni oluşturmuştur. *MecA* geni negatif izolatlar 24 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerinde üremezken, 48 saatlik inkübasyon sonrasında 40 MSSA izolatı besiyerinde yeşil koloni oluşturmuştur. MRSA saptanmasında; MRSA ID besiyerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında, duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 85.4 ve % 53.7 olarak bulunmuştur. Besiyerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılığı % 93.7'ye yükselirken, özgüllüğü % 40.3 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. MRSA ID besiyerinin değerlendirilmesi.

MRSA ID besiyeri	Mec A PZR	
	Pozitif (n)	Negatif (n)
MRSA ID 24 saat*	82	81
MRSA ID 48 saat**	90	27

* MRSA ID 24 saat: duyarlılık % 85.4, özgüllük % 53.7

** MRSA ID 48 saat: duyarlılık % 93.7, özgüllük % 40.3

TARTIŞMA

MRSA'nın ilk olarak 1961 yılında bildirilminden sonra, dirençli suşlar son altmış yılda giderek artan oranda, tüm dünyadan bildirilmeye başlanmıştır⁽⁵⁾. MRSA suşlarının tanımlanması ve doğrulanması için birden fazla metod bulunmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerle sonuç verme süresi 2-4 gün arasında değişmektedir. *MecA* geni saptanması, MRSA izolatlarında altın standart olarak kullanılsa da birçok laboratuvar da moleküler biyoloji tekniklerinin ve maddi olanakların yetersizliği nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Bundan dolayı MRSA'nın hızlı bir şekilde belirlenmesi, özellikle taşıyıcıların izolasyonunda direkt teması azaltması sebebiyle önemlidir. Kromojenik besiyerleri *S.aureus*'un hem tanımlanmasında hem de metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu besiyerleri MRSA tanımlamasını direkt olarak yapabildiğinden ek testlere olan ihtiyacı azaltarak zaman ve fiyat açısından önemli avantajlar sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalara göre kromojenik besi-

yerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri % 60 ile % 100 arasında değişmektedir^(6,8,14). Çalışmamızda MRSA ID besiyerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası duyarlılığı % 85.4 olarak bulunmuştur. Perry ve ark.⁽¹¹⁾'nin çalışmasında, MRSA suşlarını saptamada MRSA ID besiyerinin performansı, ilk 24 saatlik inkübasyonda CHROMagar MRSA ve ORSAB'a göre daha yüksek bulunmuş, MRSA ID'nin sefoksitin içermesi, CHROMagar MRSA ve ORSAB'a göre MRSA'ları saptamada daha avantajlı olarak belirlenmiştir.

Van Hal ve ark.⁽¹⁴⁾'nin, nazal sürüntü örneklerinde MRSA saptanmasında moleküler yöntemler ve selektif agarları karşılaştırdıkları çalışmalarında, ilk 24 saatte MRSA ID, MRSA Select ve CHROMagar MRSA'nın duyarlılıkları birbirine yakinken, sürenin 48 saate uzatılmasıyla MRSA ID'nin duyarlılığının arttığı ancak özgüllüğünün azaldığı saptanmıştır. Van Hal ve ark.⁽¹³⁾ tarafından yapılan, nazal sürüntü örneklerinden MRSA saptanması ile ilgili diğer bir çalışmada, 48 saatlik inkübasyon sonucunda özgüllüğün düşük bulunmasının sebebinin besiyerindeki kromojen maddeden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Klinik örneklerle yapılan başka bir çalışmada ise, *S.aureus* tanımlanmasında CHROMagar besiyerinin duyarlılığı % 95.5, konvansiyonel yöntemlerin duyarlılığı % 81.9 olarak saptanmış ve iki yöntem arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur⁽⁷⁾. Bu çalışmada CHROMagar besiyerinin, yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, konvansiyonel laboratuvar yöntemleri gibi ek tanımlayıcı test kullanımı gerektirmemesi nedeniyle, klinik örneklerden *S.aureus*'un izolasyonu ve ön tanısında, rutin ekim için önerilebilecek bir besiyeri olduğu belirtilmiştir.

Diederer ve ark.⁽⁶⁾'nın yaptıkları çalışmada, çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak, inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate uzatılmasıyla özgüllüğün azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmada koagülaz negatif stafilokokların 48 saatlik süre sonucunda yanlış pozitif sonuçlara yol açabildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, MRSA ID besiyeri kullanılarak *S.aureus*'un tanımlanması ve oksasiline direncinin belirlenmesi 18-24 saatte yapılabilmekte-

dir. Bu besiyerinin kullanımı ile ek test maliyetlerinin azalması, konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç alınabilmesi, değerlendirilmenin kolaylığı, duyarlılığının yüksek olması ve özellikle taramada direkt inokülasyon yapılabilmesi nedeniyle, MRSA ID tercih edilebilir bir besiyeridir.

KAYNAKLAR

1. Bannerman TL, Peacock SJ. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds): Manual of Clinical Microbiology, 9. baskı" kitabında s. 390-411, ASM Press, Washington (2007).
2. Cherkaoui A, Renzi G, François P, Schrenzel J. Comparison of four chromogenic media for culture-based screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *J Med Microbiol* 2007; 56(4):500-3.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46981-0>
PMid:17374891
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (Çeviri ed. D. Gür). Antibiyotik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onsekizinci Bilgi Eki, M100-S18, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2008).
4. Compennolle V, Verschraegen G, Claeys G. Combined use of Pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol* 2007;45(1):154-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01115-06>
PMid:17093032 PMCID:1828984
5. Çolakoglu S, Aliskan H, Senger SS, Turunc T, Demiroğlu YZ, Arslan H. Performance of MRSA ID chromogenic medium for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from blood cultures and clinical specimens, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(3):319-23.
6. Diederer BM, van Leest ML, van Duijn I, Willemse P, van Keulen PH, Kluytmans JA. Performance of MRSA ID, a new chromogenic medium for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol* 2006;44(2):586-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.2.586-588.2006>
PMid:16455917 PMCID:1392650
7. Gailliot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P. Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of Staphylococcus aureus from human clinical specimens, *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1587-91.
PMid:10747148 PMCID:86496
8. Hedin G, Fang H. Evaluation of two new chromogenic media, CHROMagar MRSA and S.aureus ID, for identifying Staphylococcus aureus and screening methicillin-resistant S.aureus, *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4242-4.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.4242-4244.2005>
PMid:16081989 PMCID:1233961
9. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, Gheldre Y De, Struelens J. Evaluation of a triplex assay to discriminate Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures, *J Clin Microbiol* 2002;40(4):1514-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.4.1514-1517.2002>
PMid:11923385 PMCID:140352
10. Nahimana I, Francioli P, Blanc DS. Evaluation of three chromogenic media (MRSA ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *Clin Microbiol Infect* 2006;12(12):1168-74.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01534.x>
PMid:17121622
11. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley AL, Nicholson A, Gould FK. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4519-23.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.10.4519-4523.2004>
PMid:15472303 PMCID:522333
12. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin ve enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesi, *ANKEM Derg* 2007;21(Ek 2):166-70.
13. Van Hal SJ, Jennings Z, Stark D, Marriott D, Harkness J. MRSA detection: comparison of two molecular methods (BD GeneOhm®PCR assay and Easy-Plex) with two selective MRSA agars (MRSA ID and Oxoid MRSA) for nasal swabs, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(1):47-53.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0593-4>
PMid:6756909
14. Van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and genotype MRSA direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs, *J Clin Microbiol* 2007;45(8):2486-90.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00139-07>
PMid:17537949 PMCID:1951204
15. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6. baskı, s.623-71, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (2006).