

STAPHYLOCOCCUS AUREUS'DA METİSİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA DİSK DİFÜZYON, OKSASİLİN AGAR TARAMA, MİKRODİLÜSYON VE PBP2a LATEKS AGLÜTİNASYON TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ahmet VURAL¹, İlhan AFŞAR², Nükhet KURULTAY², Mustafa DEMİRCİ²

¹Tokat Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, TOKAT

²İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İZMİR

ÖZET

Hastane ve toplum kökenli metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) infeksiyonları dünyada yaygındır. Metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi uygun antimikrobik ilacın kullanımını sağlamak için gereklidir. Metisiline dirençli heterojen olması nedeniyle fenotipik yöntemler ile tespitinde problemler olabilmektedir. Bu çalışmada MRSA tespitinde kullanılan çeşitli testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 117 *S.aureus* suşu alınmış, suşların metisilin direncini belirlemek için oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama, PBP2a lateks aglütinasyon, manuel oksasilin mikrodilüsyon ve otomatize sistem sefoksitin mikrodilüsyon testi uygulanmıştır. MRSA tanısında mikrodilüsyon testleri referans olarak alınmıştır. Oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin duyarlılıkları % 100 ve özgüllükleri sırasıyla % 100, % 100, % 100 ve % 97 olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: disk difüzyon, metisilin direnci, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

Comparison of Disk Diffusion, Oxacillin Agar Screening, Microdilution and PBP2a Latex Agglutination Tests for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*

Hospital and community acquired MRSA infections are common worldwide. Detection of methicillin resistance is essential for the use of appropriate antibiotics. The detection of methicillin resistance is complicated by the fact that its phenotypic expression in many strains is heterogeneous. We aimed to compare the sensitivity and specificity of several tests in detection of methicillin resistance.

In this study, 117 *S.aureus* strains were tested. Methicillin resistance was evaluated by oxacillin (1 µg) disk diffusion test, cefoxitin (30 µg) disk diffusion test, oxacillin agar screening, manual oxacillin microdilution, automated cefoxitin microdilution and PBP2a latex agglutination tests. Microdilution tests were taken as reference on MRSA diagnosis. The sensitivities of oxacillin disk diffusion, cefoxitin disk diffusion, oxacillin agar screening and PBP2a latex agglutination tests were found as 100 % and specificities as 100 %, 100 %, 100 % and 97 %, respectively.

Keywords: disk diffusion, methicillin resistance, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus ülkemizde ve tüm dünyada, toplumsal ve hastane kaynaklı en yaygın infeksiyon etkenlerinden biridir. Toplum kökenli MRSA'ya bağlı infeksiyonların görülme

sıklığı giderek artmakta, hatta bazı ülkelerde salgınlar bildirilmektedir. Hastane kökenli ve toplum kökenli MRSA'ların epidemi yapma potansiyeli olduğundan halk sağlığı yönünden büyük önem taşımaktadır⁽¹⁶⁾.

MRSA izolatlarının hemen hemen tümü

İletişim adresi: Ahmet Vural. Tokat Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, TOKAT

GSM: (0505) 814 56 28

e-posta: ahmetvural20@hotmail.com

Alındığı tarih: 24.06.2011, yayına kabul: 18.07.2011

mecA geni tarafından kodlanan penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a)'yı üretir. MRSA saptanmasında *mecA* veya *mecA*'nın kodladığı PBP2a'nın saptanması en kesin yöntemlerdir. *MecA* geni taşıyan veya *mecA* geni ürünü olan PBP2a'yı sentezleyen stafilokoklar oksasiline dirençli, *mecA* geni taşımayan veya PBP2a'yı sentezlemeyen stafilokoklar oksasiline duyarlı olarak verilmelidir. *mecA* geninin bulunması dışında diğer direnç mekanizmalarının da bulunması nedeniyle disk difüzyon testiyle birlikte minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testleri yapılmışsa, MİK değerleri ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bulunan suşların *mecA* veya PBP2a negatif olsalar bile oksasiline dirençli olarak bildirilmesi önerilmektedir. Bu suşların sefoksitin disk difüzyon testi ile de duyarlı çıkabileceği bildirilmiştir⁽⁴⁾.

Önceki yıllarda metisilin direnci için oksasilin disk difüzyon testinin önerilmesine karşın Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008'den beri sefoksitin disk difüzyon testini tarama testi olarak önermektedir. Buna rağmen oksasilin disk difüzyon testi yapılmış ve sonuç orta düzeyde duyarlı çıkmış ise, *mecA* veya PBP2a testi, sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin MİK testi veya oksasilin agar tarama testi yapılması önerilmektedir⁽⁴⁾.

Bu çalışmada MRSA tespitinde kullanılan, ticari PBP2a lateks aglütinasyon, oksasilin disk difüzyon, 2008 CLSI'de *mecA*'ya bağlı oksasilin direncini saptamada önerilen sefoksitin disk difüzyon testi ile oksasilin mikrodilüsyon, oksasilin agar tarama ve otomatize sistem sefoksitin mikrodilüsyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 117 *S.aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. Standart suş olarak MRSA için ATCC 43300 ve MSSA için ATCC 25923 suşları kullanılmıştır. Bakteri tanımlaması için koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi, manitol testi, DNaz ve koagülaz testleri yapılmıştır.

Metisilin direncini belirlemede 2006 CLSI ve 2008 CLSI önerileri doğrultusunda oksasilin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, oksasilin mikrodilüsyon, PBP2a lateks aglütinasyon, sefoksitin disk difüzyon ve sefoksitin mikrodilüsyon (Phoenix Cefoxitin MIC, Becton Dickinson) yöntemleri kullanılmıştır^(3,4). PBP2a lateks aglütinasyon testi, ticari firmanın (Oxoid-İngiltere) önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Testlerin karşılaştırılmaları için mikrodilüsyon testleri referans alınarak duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü hesaplanmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya aldığımız 117 *S.aureus* suşundan 53'ü (% 45) MRSA, 64'ü (% 55) MSSA olarak bulunmuştur. İki suş PBP2a lateks aglütinasyon testi ile metisiline dirençli, oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testi ile metisiline duyarlı, oksasilin mikrodilüsyon ile MİK değerleri 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak bulunmuş ve MSSA olarak değerlendirilmiştir. Tablo 1'de MRSA tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırması ve Tablo 2'de de MRSA tespitinde mikrodilüsyon testlerini referans olarak aldığımızda diğer yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri gösterilmiştir.

Tablo 1. MRSA tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırması [n(%)].

Yöntemler	MSSA	MRSA
Oksasilin disk difüzyon	64 (55)	53 (45)
Sefoksitin disk difüzyon	64 (55)	53 (45)
Oksasilin mikrodilüsyon	64 (55)	53 (45)
Sefoksitin mikrodilüsyon	64 (55)	53 (45)
Oksasilin agar tarama	64 (55)	53 (45)
PBP2a lateks aglütinasyon	62 (53)	55 (47)

TARTIŞMA

Metisiline dirençli *S.aureus* infeksiyonları ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olup, prevalansı ülkeler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA pre-

Tablo 2. MRSA tesbitinde kullanılan yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri.*

Yöntemler	Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif yorumlama gücü	Negatif yorumlama gücü
Oksasilin disk difüzyon	% 100	% 100	% 100	% 100
Sefoksitin disk difüzyon	% 100	% 100	% 100	% 100
Oksasilin agar tarama	% 100	% 100	% 100	% 100
PBP2a lateks aglütinasyon	% 100	% 97	% 96	% 100

*Mikrodilüsyon testleri referans olarak alınmıştır.

valansı % 1'in altındadır. Güney Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde % 5-40, Japonya'da % 60'lara çıkmıştır^(10,11). Ülkemizde bu oran değişmekle birlikte % 50'nin üzerindedir. Bölgemizde Sipahi ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada % 55 bulunan MRSA oranı, bu çalışmada % 45 olarak bulunmuştur. MRSA direnci genellikle heterojen olduğundan, fenotipik yöntemler ile metisilin direncinin belirlenmesinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Direnç tespitinin güvenilirliğini artırmak için laboratuvar test uygulama rehberlerinde bazı değişiklikler yapılmıştır. İnokulum miktarı artırılmış, besiyerinde NaCl konsantrasyonu artırılmış, inkübasyon süresi uzatılmış ve düşük ısıda inkübasyon yapılmıştır^(5,13).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında stafilkokların metisiline direncini saptamak için, oksasilin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon, agar dilüsyon, sefoksitin disk difüzyon, otomatize duyarlılık testleri, DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri kullanılmaktadır⁽¹⁵⁾. 2008 CLSI sefoksitin disk difüzyon, sefoksitin mikrodilüsyon ve oksasilin agar tarama testini MRSA tarama testi olarak önermektedir⁽⁴⁾. MRSA tespitinde altın standart *mecA* geninin PZR ile belirlenmesi olmasına rağmen rutin olarak laboratuvarlarda kullanımı mümkün değildir⁽¹³⁾. Özel laboratuvar ortamı gerektirmesi, deneyimli personel ihtiyacı ve pahalı olması gibi nedenlerle ancak büyük merkezlerde uygulanabilmektedir.

Bu çalışmada, sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif yorumlama gücü ve negatif yorumlama gücü % 100 olarak saptanmıştır. CLSI, *mecA* genine bağlı oksasilin direncini saptamada sefoksitin disk difüzyon testini tarama testi olarak önermektedir. Telli ve ark.⁽¹³⁾ *mecA* geni pozitif olan 181

suştan üçünü sefoksitin disk difüzyon testi ile negatif, *mecA* negatif 119 suştan birini sefoksitin disk difüzyon testi ile pozitif olarak belirlemişler, sefoksitin disk difüzyon için duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 99, pozitif yorumlama gücünü % 99, negatif yorumlama gücünü % 98 olarak belirtmişlerdir. Velasco ve ark.⁽¹⁵⁾ ise duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 98, pozitif yorumlama gücünü % 98, negatif yorumlama gücünü % 100 olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda oksasilin disk difüzyon testi ile duyarlılık, özgüllük, pozitif yorumlama gücü ve negatif yorumlama gücü % 100 olarak saptanmıştır. Velasco ve ark.⁽¹⁵⁾ bu testle duyarlılığı % 94, özgüllüğü % 100, pozitif yorumlama gücünü % 100, negatif yorumlama gücünü % 94 olarak belirlemişlerdir.

PBP2a lateks aglütinasyon testi kolay uygulanan, hızlı (15-20 dakikada sonuç veren) ve çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabildiği bir testtir. Bu çalışmada duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 97, pozitif yorumlama gücü % 96, negatif yorumlama gücü % 100 olarak saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda van Leeuwen ve ark.⁽¹⁶⁾ duyarlılığı % 97 ve özgüllüğü % 100; Atay ve Gülay⁽¹⁾ duyarlılığı % 100 ve özgüllüğü % 88; Sakoulas ve ark.⁽⁸⁾ duyarlılığı % 100 ve özgüllüğü % 99 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmadaki bulgular ile yapılan diğer çalışmalardaki bulguların uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu suşlarda *mecA* ürünü olan PBP2a dışındaki bugün için bilemediğimiz PBP'lerin aşırı üretimi PBP2a lateks aglütinasyon testinin daha fazla pozitif sonuç vermesinin nedeni olabilir. PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi kolay uygulanabilir ve hızlı olması sebebiyle hayati tehlikesi olan ve çabuk karar verilmesi gereken ciddi infeksiyonlarda tercih edilebilir. Bu çalışmada PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi ile pozitif ancak diğer

yöntemlerle negatif bulunan suşlar ileri araştırmalar ile bizlere PBP2a dışında dirençten sorumlu diğer penisilin bağlayan proteinler hakkında bilgi verebilir.

Oksasilin agar tarama yönteminde duyarlılık % 100, özgüllük % 100, pozitif yorumlama gücü % 100 ve negatif yorumlama gücü % 100 olarak saptanmıştır. Hasbek ve ark.⁽⁶⁾ oksasilin agar tarama testinin duyarlılık ve özgüllüğünü % 100 kabul ederek çalışmalarında referans test olarak kullanmışlardır. 2008 CLSI, oksasilin agar tarama yöntemini sefoksitin disk difüzyon testi ile birlikte MRSA tarama testi olarak önermektedir⁽⁴⁾.

Bu çalışmada otomatize sistem ile sefoksitin mikrodilüsyon testinin duyarlılığı ve özgüllüğü % 100 bulunmuştur. Salimnia ve Brown⁽⁹⁾, Ishii ve ark.⁽⁷⁾, Synder ve ark.⁽¹²⁾ yaptıkları çalışmalarda PZR ile *mecA* geni pozitif olan suşlarda otomatize sistem (BD Phoenix) ile yapılan sefoksitin mikrodilüsyon testinin % 100 uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmamızda manuel yapılan oksasilin mikrodilüsyon ile otomatize sefoksitin mikrodilüsyon yöntemlerini karşılaştırdığımızda bu iki yöntem arasında duyarlılık ve özgüllük olarak fark bulunmamıştır. Manuel yapılan mikrodilüsyon testinin uygulama zorluğu ve zaman alıcı olması nedeni ile otomatize mikrodilüsyon sistemleri tercih edilebilir.

Sonuç olarak CLSI, MRSA tarama testleri olarak sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve sefoksitin mikrodilüsyon testini önermektedir. 2008 CLSI oksasilin disk difüzyon yöntemi ile orta duyarlı bulunan suşların, *mecA* veya PBP2a testi, sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama veya mikrodilüsyon yöntemleri ile çalışılarak duyarlı veya dirençli verilmesi gerektiğini belirtmektedir⁽⁴⁾. Çalışmamızda sefoksitin (30 µg) disk difüzyon yöntemi ile oksasilin (1 µg) disk difüzyon yöntemi *S.aureus*'ta *mecA* kontrolündeki oksasilin direncini tespit etmede % 100 uyumlu bulunmuştur. CLSI, sefoksitin disk difüzyon testi *mecA*'ya bağlı oksasilin direncini verdiği için, *mecA* dışında ender görülen dirençlerin tespitinin atlanabileceğini söylemektedir^(3,4). Sefoksitin disk difüzyon yönteminin *mecA* dışı dirençleri atlama olasılığı göz önüne alınarak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sefoksitin ve oksasilin disk

difüzyon yöntemlerinden ikisinin de çalışılması MRSA direncini yakalamada daha faydalı olabilir. Ancak çalışmamızda *mecA* dışı direnç saptanmamıştır. Çünkü *mecA*'ya bağlı oksasilin direncini belirleyen sefoksitin disk difüzyon testi negatif, oksasilinle disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri pozitif olan suş bulunmamıştır. *MecA* dışı dirence sahip suşların tespiti için; daha geniş seriler ve bu serilerde saptanan suşların ileri araştırılması konunun aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Atay T, Gülay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *ANKEM Derg* 2004;18(4):205-8.
2. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(5):389-92.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-004-1130-8>
PMid:6756909
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement (M100-S16), CLSI, Pennsylvania, PA (2006).
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement (M100-S18), CLSI, Pennsylvania, PA (2008).
5. Felten A, Grandy B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test, *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2766-71.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2766-2771.2002>
PMid:12149327 PMCID:120619
6. Hasbek M, Hakgüden Y, Kaya S, Bakıcı MZ. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci, *Cumhuriyet Üniv Tıp Fak Derg* 2002;24(4):179-84.
7. Ishii Y, Alba J, Maehara C et al. Identification of

- biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems, *J Med Microbiol* 2006;55(4):387-92.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46231-0>
PMid:16533985
8. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing method and analysis of *mecA*-positive susceptible strain, *J Clin Microbiol* 2001;39(11):3946-51.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.11.3946-3951.2001>
PMid:11682512 PMCID:88469
 9. Salimnia H, Brown WJ. Detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Comparison of Phoenix oxacillin and cefoxitin MICs, MicroScan oxacillin MIC, oxacillin and cefoxitin disk diffusion, and *mecA* gene detection, Presented at the Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother (ICAAC), Detroit, MI (2005).
 10. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci, *Hacettepe Tıp Derg* 2007;38(3):127-34.
 11. Sipahi OR, Pullukçu H, Aydemir Ş, Taşbakan M, Tunger A. Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteremilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi, *ANKEM Derg* 2007;21(1):1-4.
 12. Snyder JW, Munier G, Johnson C. Direct comparison of the BD Phoenix™ Automated Microbiology System with the Microscan Walkaway for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci, enterococci, and antimicrobial susceptibility of streptococci, Presented at the 106th General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM), Orlando, FL (2006).
 13. Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Derg* 2006;20(2):93-6.
 14. Ünal S. Toplumdan kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *ANKEM Derg* 2006;(Ek 2):99-105.
 15. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Antimicrob Chemother* 2005;55(3):379-82.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki017>
PMid:15722394
 16. van Leeuwen WB, van Pelt C, Luijendijk A, Verbrugh HA, Goessens WH. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA screen latex agglutination test, *J Clin Microbiol* 1999;37(9):3029-30.
PMid:10449498 PMCID:85445