

KISA BİLDİRİ:
STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI VE ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN SAPTANMASI*

SHORT COMMUNICATION:
 DETERMINATION OF METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI
 WITH DIFFERENT METHODS AND DETECTION OF
 MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE

Yeliz ÇETİNKOL¹, Mustafa ALTINDIŞ¹
Zafer ÇETİNKAYA¹, O.Cem AKTEPE¹

ÖZET: Bu çalışmada, çeşitli klinik ve hastane çevresi örneklerinden izole edilen 213'ü *Staphylococcus aureus*, 43'ü koagülaz negatif stafilocok (KNS) olmak üzere toplam 256 suşta, oksasilin agar tarama (OAT), PBP2a lateks aglütinasyon (LA), oksasilin disk difüzyon (ODD), sefoksitin disk difüzyon (SDD) ve mikrodilüsyon yöntemleriyle metisilin direncinin belirlenmesi ve bu suşlarda çoklu antibiyotik direncinin saptanması amaçlanmıştır. İzolatların penisilin G, amoksisilin/clavulanat, sefalotin, tetrasiklin, eritromisin, fusidik asit, ofloksasin, vankomisin, ko-trimoksazol ve gentamisine direnç durumları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada OAT yöntemi ile *S.aureus* izolatlarının 152'si (%71.3); PBP2a LA testi ile de KNS'ların 30'u (%69.7) metisiline dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli ve duyarlı olarak saptanan stafilocok suş sayıları OAT ile sırasıyla 182 ve 74; ODD ile 183 ve 73; SDD ile 181 ve 75; PBP2a LA ile 180 ve 76 ve mikrodilüsyon yöntemiyle 183 ve 73 olarak belirlenmiştir. Uygulanan yöntemler ile alınan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış ($p>0.05$), ancak PBP2a LA testinin *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin tespitinde duyarlılığının diğerlerine göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca SDD testinin en az ODD testi kadar duyarlı olduğu görülmüş ve tercih edilebileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda metisiline duyarlı stafilocokların büyük oranda diğer antibiyotiklere de duyarlı, dirençli olanların ise diğer antibiyotiklere de dirençli oldukları izlenmiştir. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilocoklar karşılaştırıldığında, belirlenen direnç oranları farkı fusidik asidin dışında diğer antibiyotikler yönünden istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tüm stafilocoklarda fusidik aside karşı direnç oranları düşük bulunmuş, vankomisine dirençli suş saptanmamıştır. Sonuç olarak *S.aureus* izolatlarında metisilin direncinin daha iyi belirlenebilmesi için, CLSI'nin doğrulama testi olarak önerdiği agar tarama testinin ek olarak kullanılması uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Stafilocok, metisilin direnci, agar tarama, oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, PBP2a lateks aglütinasyon, mikrodilüsyon.

*7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri'nde (13-15 Nisan 2006, İstanbul) serbest bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar. (maltindis@gmail.com)

ABSTRACT: The aims of this study were to determine the methicillin resistance of a total of 256 staphylococcus strains [213 *Staphylococcus aureus* and 43 coagulase negative staphylococci (CNS)], isolated from different clinical samples and hospital environmental specimens by different methods and to detect multiple antibiotic resistance in these isolates. Methicillin resistance of staphylococci was investigated by using oxacillin agar screening (OAS), oxacillin disk diffusion (ODD), cefoxitin disk diffusion (CDD), PBP2a latex agglutination (LA) and microdilution tests. The resistance of the strains against penicillin G, amoxycillin/clavulanate, cephalothin, tetracycline, erythromycin, fusidic acid, ofloxacin, vancomycin, co-trimoxazole and gentamicin was investigated by standard disk diffusion method. As a result, 152 (71.3%) *S.aureus* and 30 (69.7%) CNS isolates were found to be methicillin-resistant with the use of OAS and PBP2a LA tests, respectively. The numbers of the isolates which were detected as methicillin-resistant and methicillin-susceptible were 182 and 74 by OAS; 183 and 73 by ODD; 181 and 75 by SDD; 180 and 76 by PBP2a LA; 183 and 73 by microdilution tests, respectively. There was no statistically significant differences between the results obtained by all of the methods ($p>0.05$), however the sensitivity of PBP2a LA test was lower in the detection of methicillin resistance in *S.aureus* strains. CDD test which was found to be as sensitive as ODD test, may be preferred in the detection of methicillin resistance in staphylococci. In our study staphylococci which were sensitive to methicillin, were also found generally sensitive to the other antibiotics, whereas staphylococci which were resistant to methicillin were also resistant to the other antibiotics. The difference between methicillin sensitive and resistant staphylococci in terms of the rates of resistance against other antibiotics was found statistically significant with the exception of fusidic acid ($p<0.05$). The resistance rates of isolates for fusidic acid were very low and all of the strains were susceptible to vancomycin. In conclusion, for better determination of methicillin resistance, agar screening test which is proposed as a confirmatory test by CLSI, should be used when necessary.

Key words: *Staphylococcus*, *methicillin resistance*, *agar screening*, *oxacillin disk diffusion*, *cefoxitin disk diffusion*, *PBP2a latex agglutination*, *microdilution*.

GİRİŞ

Stafilokoklar nozokomiyal ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonların en önemli etkenlerindendir. Ciddi stafilokok enfeksiyonları, yaşamı tehdit eden komplikasyonlara ve yüksek mortalite oranına yol açması nedeniyle halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir¹. Özellikle metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve/veya çoklu antibiyotik direnci gösteren suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde büyük sıkıntılar yaşanmaktadır². Stafilokok enfeksiyonlarının etkin tedavisinde, özellikle heterojen MRSA suşlarının doğru bir şekilde saptanması gerekmekte, ancak rutinde kullanılan oksasilin disk difüzyon testinin de bazen heterojen metisilin direncini saptamada yetersiz kaldığı ifade edilmektedir³⁻⁵. Bu çalışmada, çeşitli klinik ve hastane çevresi örneklerinden izole edilen stafilokok suşlarında, metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve bu suşlarda çoklu antibiyotik direncinin saptanması amaçlanmıştır.

GEREKÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Kocatepe Üniversite Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, hastalardan izole edilen 236 (144'ü toplum, 92'si hastane kökenli) ve hastane çevresi örneklerinden izole edilen 20 olmak üzere toplam 256 stafilokok suşu

dahil edildi. Klinik izolatların %34'ü kan, %28'i yara, %30'u ise diğer örneklerden elde edildi. Konvansiyonel yöntemlerle izolatların 213'ü *S.aureus*, 43'ü koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak tanımlandı. Metisilin direncinin saptanmasında, *S.aureus* için oksasilin agar tarama (OAT) testi [%4 NaCl ilaveli 6 µg/ml oksasilin içeren Mueller-Hinton (MH) agar; (duyarlılık %98-100)], KNS için de PBP2a lateks aglütinasyon (LA) testi [Oxoid, UK (duyarlılık %97-98.5)] referans yöntemler olarak kabul edildi⁶⁻⁸. CLSI kriterlerine göre; oksasilin (*S.aureus* ≤10 mm; KNS'lar için ≤17 mm dirençli) ve sefoksitin (zon çapı ≤19 mm ise dirençli) disk difüzyon testleri, LA testi ve mikrodilüsyon testleri (MİK değeri *S.aureus* için, ≥4 µg/ml; KNS için ≥0.5 µg/ml) çalışıldı⁹. Antibiyotik duyarlılık testleri, CLSI önerilerine⁹ göre disk difüzyon yöntemiyle çalışıldı. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 25923 ve *S.aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada, OAT yöntemi ile *S.aureus* suşlarının 152'si (%71.3), PBP2a LA ile de KNS'ların 30'u (%69.7) metisiline dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli (MRS) ve duyarlı (MSS) stafilokokların saptanmasında kullanılan testlerin sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo I). MRS izolatlarının diğer antibiyotiklere de dirençli oldukları izlenmiş; MRS ve MSS suşları karşılaştırıldığında, belirlenen direnç oranları farkı, fusidik asidin dışında diğer antibiyotikler yönünden istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo II).

Tablo I. Stafilokok Suşlarında Metisilin Direncinin Saptanmasında Farklı Yöntemlerle Alınan Sonuçlar (n=256)

Yöntem	Metisiline Dirençli Stafilokok (n)	Metisiline Duyarlı Stafilokok (n)
Oksasilin Tuz Agar	182	74
Oksasilin Disk Difüzyon Testi	183	73
Sefoksitin Disk Difüzyon Testi	181	75
PBP2a Lateks Aglütinasyon Testi	180	76
Mikrodilüsyon Testi	183	73

Tablo II. MRS ve MSS Suşlarında Test Edilen Antibiyotiklere Direnç Oranları (%)

Antibiyotik	MRSA (n:152)	MSSA (n:61)	MRKNS (n:30)	MSKNS (n:13)
Vankomisin	0	0	0	0
Ko-trimoksazol	56.4	24.3	27.9	18.7
Amoksisilin/klavulanat	—	6.3	—	7.6
Fusidik asit	15.4	5.7	27.4	10.3
Ofloksasin	60.7	17.1	67.3	7.6
Eritromisin	57.3	28.7	55.6	20.9
Gentamisin	70.8	14.5	68.8	18.5
Sefalotin	—	30.8	—	45.7
Tetrasiklin	72.7	50.1	78.6	38.6
Penisilin G	—	64.4	—	86.5

MRSA: Metisiline dirençli *S.aureus*; MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok; MSKNS: Metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok.

MSS'larda sefalotin, tetrasiklin ve penisilin G'ye yüksek düzeyde direnç gözlenirken, özellikle fusidik asit, amoksisilin/klavulanat, ofloksasin ve gentamisine direnç oldukça düşüktür. MRS'larda ise vankomisin ve fusidik asit hariç, çalışılan diğer antibiyotiklere karşı çok yüksek düzeyde direnç oranları tespit edilmiştir. MRS'ların hepsinde çoklu antibiyotik direnci gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Metisiline dirençli stafilokok (MRS) suşlarında görülen çoklu antibiyotik direnci, tedavide uygun antibiyotiğin seçimi için hızlı ve doğru tanımlamayı gerektirmektedir. Direncin belirlenmesi için seçilen yöntemin ise, rutin laboratuvarlarda kullanılabilir olması, güvenilir olması, kolay uygulanabilmesi ve çabuk sonuç vermesi beklenmektedir¹⁰. Ülkemizde MRSA oranı 1997 yılına kadar yapılan bildirimlerde %21-40 arasında değişmektedir¹¹⁻¹³. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise bu oran %38-71 arasındadır¹⁴⁻¹⁷.

Metisilin direncini belirlemek için CLSI'in önerdiği fenotipik yöntemler; sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, tuz agar tarama ve disk difüzyondur¹⁸. Agar tarama metodu referans olarak kabul edilmesine ve oksasilin direncini çok iyi belirlemesine rağmen duyarlılığı %100'e ulaşmamaktadır. Dilüsyon metodlarının da duyarlılığı %98-100 arasında değişmektedir^{19,20}. Heterojen suşların belirlenmesinde ise gerek dilüsyon gerekse difüzyon metotları yetersiz kalmaktadır. Disk difüzyon metodunun birçok heterojen suшта %61-96.4 gibi oldukça geniş bir aralıkta duyarlılığa sahip olduğu belirtilmektedir¹⁹⁻²¹. Bazı çalışmalar, oksasilin agar tarama metodunun heterojen suşlar ile yapılan çalışmalarda duyarlılığının düştüğünü (<%95) bildirirken, bazıları da yüksek (>%97) olduğunu ifade etmektedir¹⁹⁻²¹. Çalışmamızda, oksasilin disk difüzyon metodu ile, diğer yöntemlere benzer olarak 183 MRS ve 73 MSS suşu saptanmıştır.

Telli ve arkadaşlarının²² çalışmasında, sefoksitin disk difüzyon (SDD) testi, oksasilin disk difüzyon (ODD), agar tarama ve MRSA lateks aglütinasyon (LA) testleri ile karşılaştırılmış ve SDD testinin ODD testine yakın duyarlılık ve özgüllükte, agar tarama ve MRSA LA testlerinin daha düşük özgüllükte olduğu bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, ODD ve SDD yöntemleri arasında fark bulunmamış, rutin laboratuvarlarda bunlardan sadece birinin seçilebileceği belirtilmiştir²³. Bu yorum bizim sonuçlarımızla uyumludur. Yapılan diğer bazı çalışmalarda da, SDD testinin özgüllük ve duyarlılığı, ODD testinden daha yüksek bulunmuş ve MRSA saptama metotları arasında SDD testinin sonuçlarımızla da uyumlu olarak, kullanılabileceği gösterilmiştir^{24,25}.

PBP2a LA yöntemi, ticari bir kit olması nedeniyle maliyet ve etkinlik açısından dezavantaj sunarken, hızlı bir test olması nedeniyle tercih edilebilir. Bu yöntem, metisilin direncinin hızlı olarak belirlenmesi ile hasta ve tedavi maliyeti açısından fayda sağlanabilecek durumlarda kullanılabilir.

Çalışmamızda uygulanan dört yöntemin metisilin direncini saptamada birbirine çok yakın sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ancak PBP2a LA testinin duyarlılığı diğer testlere göre daha düşük bulunmuştur (Tablo I). Ayrıca yeni

bir yöntem olarak kullanılmaya başlanan SDD testinin en az ODD testi kadar duyarlı olduğu ve tercih edilebileceği belirlenmiştir. *S.aureus*'ta metisilin direncinin daha iyi belirlenebilmesi için CLSI'in de doğrulama testi olarak önerdiği agar tarama testinin, ek olarak kullanılmasının uygun olacağı düşünülmektedir. Çalışmamızda metisilin direncinin tespitinde altın standart olarak kabul edilen *mecA* geninin araştırılması mümkün olmadığından, yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanamamış, ancak karşılaştırma için oksasiline agar tarama ve PBP2a LA testi referans olarak alınmıştır^{6-8,10}. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da agar tarama yöntemi genellikle referans test olarak kabul edilmektedir. ODD yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü çalışmalar arasında farklılık göstermekle birlikte, rutin laboratuvarlarda kullanılabilir bulunmuş olup, çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur^{11-17,22,23}.

Çalışmamızda MSS'ların büyük oranda diğer antibiyotiklere duyarlı, MRS'ların ise diğer antibiyotiklere de dirençli oldukları görülmüştür. Bu suşların karşılaştırılmasında, belirlenen direnç oranları farkı fusidik asitin dışında diğer antibiyotikler yönünden istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tüm stafilokoklarda fusidik aside karşı direnç oranları düşük bulunmuş, vankomisine ise dirençli suş saptanmamıştır (Tablo II). Sonuç olarak, metisiline dirençli suşları tanımlarken heterojen dirençli olanları gözden kaçırmamak için duyarlılık testlerinde CLSI'in önerilerine titizlikle uyulması, buna rağmen tedavi sorunu çıkması halinde direncin saptanamadığının düşünülerek, moleküler yöntemlere başvurulması ve özellikle *mecA* varlığının araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically, pp: 384-404. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, ASM Press, Washington DC.
2. Maranan MC, Moreria B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Infect Dis Clin North Am 1997; 11: 813-49.
3. Archer GL. *Staphylococcus aureus*; a well-armed pathogen. Clin Infect Dis 1998; 26: 1179-81.
4. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin ve enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesi. ANKEM Derg. 2007; 21: 166-70.
5. Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1997; 24: 874-9.
6. Richard P, Meyran M, Carpentier E, Thabaut A, Drugeon HR. Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994; 32: 613-7.
7. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill F 3rd. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 1999; 37: 2952-61.
8. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2170-3.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2005, 15th Informational Supplement. CLSI Document M100-S15. CLSI, Pennsylvania.

10. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 781-91.
11. Razlıghı RA, Derebentli Ş. *S.aureus* suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodifüzyon, disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankem Derg 1994; 8: 62-8.
12. Çetinkaya Y, Ünal S. Metisilin dirençli *S.aureus* enfeksiyonları: epidemiyoloji ve kontrol. Flora Derg 1996; 1: 3-16.
13. Kocagöz S, Gür D, Uzun Ö, Akova M, Ünal S, Akalın HE ve TÜBİTAK Projesi Katılım Merkezleri. Türkiye'de stafilocoklardaki metisilin direnci. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 1997, Antalya. Program Özet Kitabı, s: 776.
14. Gündeş SG, Karadenizli A, Willke A. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında çoğul antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. İnfeksiyon Derg 2000; 15: 303-6.
15. Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik dirençleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 20-3.
16. Arıbaş ET, Özcan M, Altındış M. Klinik örneklerden izole edilen stafilocokların antibiyotik direnç oranları. İnfeksiyon Derg 2001; 15: 73-7.
17. Aygen B, Yörük A, Yıldız O, et al. Bloodstream infections caused by *Staphylococcus aureus* in a university hospital in Turkey: clinical and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 309-14.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2003, 9th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2-A8. NCCLS Wayne, Pa.
19. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. J Clin Microbiol 2001; 39: 3785-8.
20. Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Microbiol News 2002; 24:159-63.
21. Felten A, Grandry 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: 2766-71.
22. 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: 93-6.
23. Vilken T, Öktem MA, Gülay Z. Stafilocok suşlarının metisilin direncinin saptanmasında farklı yöntemlerin uygulanması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 2004, Kuşadası, Aydın. Kongre Kitabı, s: 341.
24. Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 762-5.
25. Urbaskova P, Melter O, Mackova B, Jakubu V, Wünschova M. Detection of MRSA in a group of 752 strains of *S.aureus* using a cefoxitin disk. Epidemiol Microbiol Immunol 2004; 53: 62-5.