

STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASINDA OKSASİLİN DİRENCİ TARAMA AGAR VE KROMOJENİK MRSA AGAR BESİYERLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF OXACILLIN RESISTANCE SCREENING AGAR AND CHROMOGENIC MRSA AGAR MEDIA FOR THE DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS CLINICAL ISOLATES

Salih CESUR¹, Eda YILDIZ², Hasan IRMAK¹, Züleyha AYGÜN³, Esra KARAKOÇ²,
Sami KINIKLI¹, Ali Pekcan DEMİRÖZ¹

¹ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.
(scesur89@yahoo.com)

² Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Gazi Üniversitesi, Nanotıp ve İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ankara.

ÖZET

Hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık görülen ve en önemli etkeni olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlarda da karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle MRSA suşlarının hızlı ve doğru tanımlanması, hem enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması hem de bu mikroorganizmanın nozokomiyal yayılımının önlenmesi için önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, MRSA suşlarının tanımlanmasında kullanılan ticari besiyerlerinden oksasilin direnci tarama agar (Oxacillin Resistance Screening Agar Base; ORSAB; Oxoid, İngiltere) ve kromojenik MRSA agar (BBL CHROMagar MRSA; BD, Paris, Fransa) besiyerlerinin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin belirlenmesidir. Çalışmaya, Mueller-Hinton agar besiyerinde oksasilin ve sefoksitin diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle metisilin duyarlılığı belirlenen 45 MRSA ile 130 metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olmak üzere toplam 175 klinik izolat dahil edilmiştir. Besiyerlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri, oksasilin disk difüzyon yöntemi referans alınarak hesaplanmış ve bu değerler ORSAB için sırasıyla %97.7, %40, %36.5 ve %98.1; CHROMagar MRSA için ise sırasıyla %95.5, %37.6, %35.7 ve %96.1 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak her iki besiyerinin de, iş yükünün yoğun ve personel sayısının yetersiz olduğu laboratuvarlarda özellikle tarama amaçlı olarak birlikte ya da ek bir besiyeri ile (mannitol tuz agar) beraber kullanılabileceği; ancak özgüllüğün düşük olması nedeniyle, yanlış pozitiflik olasılığına karşı pozitif saptanan suşların diğer yöntemlerle (disk difüzyon, mikrodilüsyon) doğrulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, kromojenik besiyeri, disk difüzyon yöntemi.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains which are the most frequent causes of hospital acquired infections, are also currently encountered with increasing frequency in community acquired infections. Therefore rapid and accurate identification of MRSA strains is essential in both implementation of infection control measures and prevention of the nosocomial spread of this microorganism. The aim of this study was to determine the specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of two commercial media, one was Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB; Oxoid, England) and the other was chromogenic MRSA agar (BBL CHROMagar MRSA; BD, Paris, France), for the identification of MRSA strains. A total of 175 clinical *S. aureus* isolates, of which 45 were MRSA, and 130 were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), whose susceptibility to methicillin were determined by disk diffusion method using oxacillin and cefoxitin disks in Mueller-Hinton agar medium, were included in the study. When oxacillin disk diffusion test was accepted as the reference method, the specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of ORSAB were found as 97.7%, 40%, 36.5% and 98.1%, respectively; while these values were detected as 95.5%, 37.6%, 35.7% and 96.1% for CHROMagar MRSA, respectively. These results indicated that both media may be used in laboratories where work load is high and the number of personnel is inadequate especially in screening studies together or in addition to another medium (mannitol-salt agar). However, since these methods exhibit low specificity (high false positive results), positive results should be confirmed using other methods such as disk diffusion, E-test or microdilution susceptibility testing.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, chromogenic media, disk diffusion method.

GİRİŞ

Tüm dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkeni olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının, son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlara da yol açtığı bilinmektedir¹⁻³. Bu nedenle MRSA ile enfekte ya da kolonize olan hastaların ve hastane personelinin erkenden belirlenmesi, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından önem taşımaktadır^{1,3,4}.

Klinik laboratuvarlarda MRSA izolasyonu amacıyla kullanılan seçici besiyerleri, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının MRSA suşlarından ayırımına olanak sağlamaktadır¹⁻¹⁰. Bu amaçla, oksasilin veya metisilin içeren mannitol tuz agar (MTA) ya da Mueller-Hinton agar (MHA) gibi besiyerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, oksasilin içeren MTA için duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla %61-80 ve %79; metisilin içeren MTA için %66 ve %84; oksasilin içeren MHA için ise %65 ve %88 olarak verilmektedir^{1,4,6,9,11}. MRSA suşlarının tanımlanması için geliştirilen kromojenik enzim substratları içeren besiyerleri ise konvansiyonel yöntemlere göre daha yüksek duyarlılığa sahiptir ve daha hızlı sonuç vermektedir^{1,3,4}. Bunlardan birisi olan "oksasilin direnci tarama agar besiyeri" (oxacillin resistance screening agar base; ORSAB) için duyarlılık ve özgüllük oranları değişik çalışmalarda %74-100 ve %48-92 arasında^{8,13}; bir diğeri olan CHROMagar MRSA için ise sırasıyla %59-83 ve %92-99 arasında^{2,11,12} bildirilmektedir.

Bu çalışmada, MRSA suşlarının tanımlanmasında ORSAB ve kromojenik MRSA agar besiyerlerinin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif belirleyicilik değerlerinin, oksasilin disk difüzyon yöntemi referans alınarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, metisilin duyarlılıkları VITEK 2 Compact sistemi (bioMerieux, Fransa) ile saptanmış olan 45 MRSA ile 130 MSSA suşu olmak üzere toplam 175 klinik *S.aureus* suşu dahil edildi. Suşların metisilin direnci ek olarak, Mueller-Hinton agar (MHA; Oxoid, İngiltere) besiyerinde oksasilin diski (1 µg, Oxoid, İngiltere) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile de belirlendi. Metisilin direncini belirlemede oksasilin ve sefoksitin diskleri arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için, çalışmada sefoksitin (30 µg, Oxoid, İngiltere) diski de kullanıldı. Oksasilin diski ile zon çapı < 11 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm arası olanlar orta duyarlı, ≥ 13 mm olanlar ise dirençli olarak kabul edildi¹⁴.

İzolatların taze ve saf kolonilerinden 0.5 McFarland standardında süspansiyon hazırlandıktan sonra ORSAB (Oxoid, İngiltere) ve BBL CHROMagar MRSA (BD, Paris, Fransa) besiyerine ekilerek 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. ORSAB besiyerinde koyu mavi renkte, CHROMagar MRSA besiyerinde ise pembe renkte üreyen koloniler MRSA yönünden değerlendirmeye alındı. ODD testi ile metisiline duyarlı olmasına rağmen, ORSAB ve CHROMagar MRSA besiyerinde üreme olması yalancı pozitiflik olarak kabul edildi. Standart suş olarak ATCC 43300 (MRSA) ve ATCC 25923 (MSSA) kullanıldı.

ORSAB ve CHROMagar MRSA besiyerlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin hesaplanmasında, 48. saatteki üremeler göz önüne alındı ve oksasilin disk difüzyon (ODD) yöntemi referans kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin diskinin, oksasilin diskiyle %100 uyum gösterdiği görülmüştür. Metisiline duyarlılık durumları ODD yöntemi ile doğrulanan 45 MRSA ve 130 MSSA suşunda kromojenik besiyerleri ile alınan sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre; duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler ORSAB besiyeri için sırasıyla %97.8, %40, %36.5 ve %98.1; CHROMagar MRSA besiyeri için ise sırasıyla %95.5, %37.6, %35.7 ve %96.1 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. Metisilin Direncinin Saptanmasında ORSAB ve CHROMagar MRSA Besiyerlerinin Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi (ODD) ile Karşılaştırılması

ODDY	ORSAB		
	Dirençli	Duyarlı	Toplam
Dirençli	44	1	45
Duyarlı	78	52	130
Toplam	122	53	175
ODDY	CHROMagar MRSA		
	Dirençli	Duyarlı	Toplam
Dirençli	43	2	45
Duyarlı	81	49	130
Toplam	124	51	175

TARTIŞMA

Günümüzde, MRSA suşlarının hızlı bir şekilde tanımlanması amacıyla geliştirilmiş çok sayıda ticari besiyerleri ve tanımlama kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁻¹⁷. Ancak bulunduğu gibi metisilin direncini belirlemede altın standart, *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesidir^{15,16}.

MRSA suşlarının tanımlanmasında kromojenik besiyerlerinin kullanımı, pratik, görece olarak hızlı ve duyarlılık ve özgüllükleri kabul edilebilir yöntemlerdir. Lagacé-Wiens ve arkadaşları³ MRSA taranmasında seçici kromojenik besiyerlerinin iş yoğunluğunu toplamda %63.7, her bir örnek için ise %12.6 oranında azalttığını ifade etmişler ve MRSA pozitif örnekler için raporlama süresinin ortalama 1.33 gün, MRSA negatif örnekler için ise 1.97 gün olduğunu bildirmişlerdir.

Ticari besiyerlerinde inokulum miktarı, indikatör sistem, eşlik eden bakteriyel floranın inhibisyonu ve inkübasyon süresi, izole edilen MRSA oranını artıran faktörlerdendir^{1,2,4-10}. MRSA-ID, CHROMagar MRSA ve ORSAB gibi kromojenik besiyerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, bu besiyerlerinin MRSA izolatlarını belirlemedeki duyarlılıkları 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla, %80 ve %89; %59 ve %72; %62 ve %78 olarak belirlenmiştir². Özgüllük oranları ise 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla, %95.5 ve %85.6; %99.3 ve %92.1; %97.9 ve %93.1 olarak saptanmıştır². Bu araştırmacılar, CHROMagar MRSA besiyerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonlardan sonra ORSAB besiyerinden daha az duyarlı olduğunu vurgulamışlardır².

Nahimana ve arkadaşları⁷, CHROMagar MRSA ve ORSAB besiyerlerinin duyarlılığını, örnekler besiyerine ekildikten 18 saat sonra sırasıyla %59 ve %47; 42 saat sonra %75 ve %67; sıvı besiyeri ile zenginleştirme işleminden sonra ise %95 ve %79 olarak vermektedirler. Yapılan diğer çalışmalarda da, kromojenik besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün, inkübasyon süresinin 48 saate uzatılması ile ve sıvı besiyerinde zenginleştirme sonrasında arttığı bildirilmektedir^{8,18}. Velasco ve arkadaşları¹³ 51 MRSA ve 51 MSSA suşu ile yaptıkları çalışmada, ORSAB besiyerinin 24. saatteki duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif prediktif değerlerini sırasıyla %100, %92.6, %100, %92.7 olarak belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca; sefoksitin diskinin duyarlılık ve özgüllüğünün hem 24. hem de 48. saatte %100 ve %98; oksasilin diskinin duyarlılık ve özgüllüğünün ise 24. saatte %94.1 ve %100, 48. saatte ise %98 ve %98 olduğunu belirlemişlerdir¹³. Bizim çalışmamızda, disk difüzyon testi ile metisilin direncinin belirlenmesinde, 24 saatlik inkübasyonda sefoksitin diskinin, oksasilin diskiyle tam uyum gösterdiği izlenmiştir.

Ülkemizden Çiragil ve arkadaşları²¹, kromojenik MRSA ID agar besiyerinin, MRSA suşlarını, %5 koyun kanı içeren Columbia agar (CBA) besiyerinden daha hızlı ve kolay saptadığını; her iki besiyeri arasında mükemmel uyum olduğunu ve bu nedenle MRSA ID besiyerinin CBA yerine kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Kuzucu ve arkadaşları¹⁵ da çalışmalarında, 112 *S.aureus* suşunda metisilin direncini mikrodilüsyon, oksasilin tuz tarama testi ve disk difüzyon testi ile araştırmışlar, uyumsuz sonuçların doğrulanmasında PCR ile *mecA* geni saptama yöntemini uygulamışlar ve metisilin direncinin saptanmasında her üç yöntemin de uygun olduğunu ve MRSA suşları için yöntemler arasındaki uyu-

mun %100 olduğunu rapor etmişlerdir. PCR ile *mecA* gen tayininin referans yöntem olarak alındığı diğer bazı çalışmalarda da, CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğü %82.9-87.7 ve %99.1-100 oranları arasında tespit edilmiştir^{11,19,20}.

Bizim çalışmamızda, ORSAB ve CHROMagar MRSA besiyerlerinin 24. ve 48. saatlerdeki performansı değerlendirilmiş, ancak duyarlılık ve özgüllüklerin hesaplanmasında 48. saatteki değerlendirme esas alınmıştır. Buna göre, her iki besiyerinin de duyarlılık ve özgüllüğü birbirine yakın bulunmuş, ancak bu değerlerin ORSAB besiyeri için (duyarlılık %97.7, özgüllük %40), CHROMagar MRSA besiyerinden (duyarlılık %95.5, özgüllük %37.6) biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın en önemli sınırlaması, sonuçların doğrulanmasında *mecA* geni varlığının PCR ile araştırılamamış olmasıdır. Sonuç olarak her iki besiyerinin de, iş yükünün yoğun ve personel sayısının yetersiz olduğu laboratuvar koşullarında özellikle tarama amaçlı olarak birlikte ya da ek bir besiyeri ile (mannitol tuz agar) beraber kullanılabileceği; ancak özgüllüğün düşük olması nedeniyle, yalancı pozitiflik olasılığına karşı pozitif saptanan suşların diğer yöntemlerle (disk difüzyon, mikrodilüsyon) doğrulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-18.
2. Perry JD, Davies A, Butterworth A, et al. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4519-23.
3. Lagacé-Wiens PR, Alfa MJ, Manickam K, Harding GK. Reductions in workload and reporting time by use of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening with MRSA Select. J Clin Microbiol 2008; 46: 1174-7.
4. Safdar N, Narans, L, Gordon B, et al. Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods. J Clin Microbiol 2003; 41: 3163-6.
5. Apfalter P, Assadian O, Kalczyk A, et al. Performance of a new chromogenic oxacillin resistance screen medium (Oxoid) in the detection and presumptive identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 209-11.
6. Davies S, Zadik PM, Mason C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation of five selective media. Br J Biomed Sci 2000; 57: 269-72.
7. 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: 1168-74.
8. Blanc DS, Wenger A, Bile J. Evaluation of a novel medium for screening specimens from hospitalized patients to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41: 3499-502.
9. Davies S, Zadik PM. Comparison of methods for the isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol 1997; 50: 257-8.
10. Louie L, Soares D, Meaney H, et al. Evaluation of a new chromogenic medium, MRSA Select, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006; 44: 4561-3.
11. Stoakes L, Reyes R, Daniel J, et al. Prospective comparison of a new chromogenic medium, MRSA Select, to CHROMagar MRSA and mannitol-salt medium supplemented with oxacillin or cefoxitin for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006; 44: 637-9.
12. Loulergue J, de Giallully C, Morange V, et al. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006; 25: 407-9.

13. 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: 379-82.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları. Gür D (Çeviri Ed). M100-S15. 2005, Wayne, Pa.
15. Kuzucu C, Dalgalar M, Durmaz R, Dikerel S. Comparison of methods used to detect methicillin resistance in staphylococci. Mikrobiyol Bul 2002; 36: 253-7.
16. 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.
17. Kampf G, Lecke C, Cimbal AK, Weist K, Rüden H. Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. J Clin Microbiol 1998; 36: 2254-7.
18. Nonhoff C, Denis O, Brenner A, et al. Comparison of three chromogenic media and enrichment broth media for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mucocutaneous screening specimens: comparison of MRSA chromogenic media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 363-9.
19. Paule SM, Mehta M, Hacek DM, et al. Chromogenic media vs Real-time PCR for nasal surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* impact on detection of MRSA-positive persons. Am J Clin Pathol 2009; 131: 532-9.
20. Han Z, Lautenbach E, Fishman N, Nachamkin I. Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal specimens. J Med Microbiol 2007; 56 (Pt 1): 43-6.
21. Çıragil P, Gul M, Aral M, Alkis S. Detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in general population with a new chromogenic medium: MRSA ID agar. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2006. Nice-France. Abstract Book, p: 1427.