

Kan Kültürlerinde Üreyen Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Gerçek Zamanlı PCR ile Erken Tanısı*

Early Detection of Methicillin Resistance by Real-Time PCR in Staphylococci Isolated from Blood Cultures

Ayşe WILLKE¹, Murat SAYAN², Meliha MERİÇ¹, Birsen MUTLU¹

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Kocaeli.

² Kocaeli University Medical School Hospital, Central Laboratory, Kocaeli, Turkey.

* Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Birimi (2005/30) tarafından desteklenmiş ve 26. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (18-22 Mayıs 2011, Manavgat-Antalya)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 28.03.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.04.2012

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a bağlı sepsisler günümüzde önemli bir morbidite ve mortaliteye sahiptir. Bu çalışmada, MRSA'nın kan kültürü sonucuna göre daha erken tanımlanması amacıyla, kültür vasatından elde edilen ekstraktlarda *mec* ve *nuc* genleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmaya, 2009-2010 yıllarında BACTEC 9000 MB (BD, ABD) sisteminde üreme sinyali saptanan kan kültürlerinden Gram boyama yapılan ve stafilokok bakterisi görülen 48 örnek alınmıştır. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları VITEC 2 (bioMérieux, Fransa) sisteminde yapılmıştır. Kültür sonuçlarına göre 48 stafilokok suşundan 15'i metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS), dördü MRSA, 14'ü metisiline duyarlı koagülaz-negatif stafilokok (MSKNS) ve 15'i metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) olarak tanımlanmıştır. PCR sonuçlarına göre ise suşların 17'si MRKNS, sekizi MRSA, 10'u MSKNS ve 13'ü MSSA olarak belirlenmiştir. Kültür ve PCR sonuçları arasında uyumluluk saptanmamıştır. Kültür sonuçları referans olarak alındığında, metisilin direncini belirlemede PCR yönteminin duyarlılığı %73, özgüllüğü %62, pozitif prediktif değeri %56 ve negatif prediktif değeri %78 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, Rt-PCR yöntemi kültürle karşılaştırıldığında, PCR lehine beklenen olumlu sonuç alınamamış ve rutin açıdan PCR, uygun bir yöntem olarak değerlendirilmemiştir.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus*; kan kültürü; metisilin direnci; gerçek zamanlı PCR.

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ayşe Willke, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe Merkez Yerleşkesi, 41380 Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 303 7562, **E-posta (E-mail):** aysewillke2002@gmail.com

ABSTRACT

Bacteremia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has a significant morbidity and mortality. The aim of this study was to evaluate the efficiency of real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) targeting *nuc* and *mec* genes in the culture extracts of blood culture systems for the early diagnosis of MRSA. A total of 48 samples that gave positive growth signal in BACTEC 9000 MB (BD, USA) and stained as gram-positive cocci, were included in the study. The samples were collected between 2009 and 2010. VITEC 2 (bioMerieux, France) system was used for the identification and antibiotic susceptibility testing of the isolates. According to the culture results, 15 of the isolates were methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS), four were MRSA, 14 were methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci (MSCNS) and 15 were methicillin-susceptible *S.aureus* (MSSA). However, Rt-PCR yielded 17 MRCNS, eight MRSA, 10 MSCNS and 13 MSSA results. Our findings indicated lack of concordance between blood culture and PCR technique. When the blood culture results were accepted as the gold standard for the determination of methicillin resistance, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of Rt-PCR were found as 73%, 62%, 56% and 78%, respectively. In conclusion, in contrast to the expectations, Rt-PCR was not considered as an appropriate method for the detection of MRSA in routine diagnosis.

Key words: *Staphylococci; blood culture; methicillin resistance; real-time PCR.*

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a bağlı sepsisler günümüzde önemli morbidite ve yüksek mortaliteye (%15-30) sahiptir¹. Mevcut bakteriyoloji laboratuvarı koşullarında kan kùltür sistemlerinde etkenin izole edilmesi ve antibiyotik duyarlılığının bildirilmesi için yaklaşık 24-48 saat gibi bir süre geçmekte, bazen bu süre 72 saate çıkmaktadır².

Metisilin direnci, *mecA* geni tarafından kodlanır ve kromozomaldır. *mecA* geni *S.aureus* ve tüm metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) suşlarında bulunmaktadır. Bu geni taşıyan izolatlar yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) yapımı nedeniyle tüm beta-laktam ajanlara dirençlidir. Ancak metisilin direnci, çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle her zaman rutin testlerle saptanamamakta ve dolayısıyla metisiline dirençli bir stafilokok, duyarlı olarak tanımlanabilmektedir^{3,4}. Bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde duyarlılık ve özgülüğü yüksek bir yöntemdir⁴.

Bu çalışmada amaç, kan kùltürü şişelerinde üreme sinyali alındığında besiyerinden yapılan boyamalarda gram-pozitif kok varlığında, kan kùltür vasatından elde edilen ekstraktlarda *mec* ve *nuc* genlerinin PCR yöntemi ile araştırılmasıyla metisiline dirençli stafilokokların kùltür sonucuna göre daha erken tanımlanması; böylece bu bakterilere bağlı bakteremili hastalara uygun tedavinin daha erken başlanmasını sağlamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, rutin işlemlerle tanımlanan stafilokok suşlarıyla, üreme sinyalinden sonra kùltür sonuçları çıkmadan, kùltür vasatından elde edilen ekstraktlarda gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) yöntemi ile *mec* ve *nuc* genleri araştırıldı. Çalışmaya, 2009-2010 yıllarında

tıp fakültesi hastanesi merkez laboratuvarında, BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, ABD) otomasyon sisteminde üreme sinyali saptanan kan kültürlerinden Gram boyama yapılmış ve stafilokok bakterisi görülen 48 örnek alındı. İzolatların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları VITEC 2 (bioMerieux, Fransa) sisteminde gerçekleştirildi. Üreme sinyali saptanan örnekler, -20°C'de çalışma süresine kadar saklandı. Her hastanın sadece bir klinik örneğine ait izolat değerlendirmeye alındı.

Kan kültür vasatı ve kültür plaklarından bakteriyel DNA, ticari bir kit (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, Almanya) ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda izole edildi. DNA örnekleri çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

Rt-PCR yönteminde; 16S rRNA, *mecA* ve *nuc* genlerine özgül F (forward) ve R (reverse) primerler [*S.aureus* için 16S-F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') ve 16S-R (5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3'); MRSA için *mecA*-F (5'AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') ve *mecA*-R (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'); MSSA için *nuc*-F (5'-GCC ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3') ve *nuc*-R (5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3')] kullanıldı. Primer çiftleri (her biri 0.5 mM), SYBR *green supermix* (BioRad Laboratuvarları, ABD) ve elde edilen bakteri DNA'sı ile çalışma reaksiyonu hazırlandı; 94°C'de 2 dakika, 30 siklus (94°C'de 1 saniye, 55°C'de 15 saniye) ve 72°C'de 10 dakika final uzama olacak şekilde PCR uygulandı^{1,2,5,6}. Etken, Rt-PCR ile *mec* ve *nuc* genleri pozitif ise MRSA, *nuc* negatif ve *mec* pozitif ise MRKNS, *nuc* pozitif ve *mec* negatif ise metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), *nuc* ve *mec* negatif ise metisiline duyarlı koagülaz-negatif stafilokok (MSKNS) olduğu kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirmede SPSS 13.0 (IBM, Somers, ABD) programı kullanıldı. PCR sonuçlarının duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin hesaplanmasında; duyarlılık: gerçek pozitif/gerçek pozitif + yanlış negatif, özgüllük: gerçek negatif/gerçek negatif + yanlış pozitif, pozitif prediktif değeri: gerçek pozitif/gerçek pozitif + yanlış pozitif, negatif prediktif değeri: gerçek negatif/gerçek negatif + yanlış negatif formülleri kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 48 stafilokok suşunun kültür üremelerine ve PCR sonuçlarına göre değerlendirme verileri Tablo I'de görülmektedir. Kültür ve PCR sonuçları arasında uyum-

Tablo I. Kültür ve PCR ile Tanımlanan Metisiline Dirençli ve Duyarlı Stafilokokların Dağılımı

Suş	Kültür (n)	PCR (n)
Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS)	15	17
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	4	8
Metisiline duyarlı koagülaz-negatif stafilokok (MSKNS)	14	10
Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	15	13
Toplam	48	48

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

luluk saptanmamıştır. Kültür sonuçları referans olarak alındığında, metisilin direncini belirlemede PCR yönteminin duyarlılığı %73, özgüllüğü %62, pozitif prediktif değeri %56 ve negatif öngörü değeri %78 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin doğrulanması ya da kan kültürlerinden MRSA saptanması için PCR testleri rutin olarak kullanılabilir. Bunlar genellikle PBP-2a'yı kodlayan *mecA* ile *S.aureus*'a özgü bir başka geni (*nuc*, *coa*) saptayan PCR testleridir⁷⁻⁹. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kan kültürlerinden direkt MRSA tanımlama amaçlı çeşitli moleküler test teknikleri de bildirilmektedir¹⁰⁻¹². Bu tanı testleri, hızlı sonuç vermesiyle antibiyotik tedavisine erken başlamada, gereksiz antibiyotik kullanımının oranını azaltmada ve hastanede yatış süresini kısaltmada avantaj sağlarken, test maliyetlerinin geleneksel kültür yöntemlerine göre yüksek olması, deneyimli personel ve üst seviyede donanım gerektirmesi nedeniyle dezavantajlı bulunmaktadır¹³⁻¹⁵.

Kan kültürlerinde üreyen stafilokoklarda metisilin direncinin PCR ile tanısında, test örneğindeki inhibitörler önemli bir sorun olabilir^{6,10,16}. Heparin, hem, lökosit DNA'sı, laktoferrin, IgG ve hedef olmayan DNA gibi unsurlar kan örneklerinde bulunabilen PCR inhibitörleridir¹⁷. Klinik örneklerde bulunabilen PCR inhibitörleri, yalancı negatif sonuçlara, test maliyetinde artışlara ve sonuçların gecikmesine neden olabilmekte, dolayısıyla inhibitörlerin giderilmesi gerekmektedir¹⁶. Kan örneklerinde inhibitör unsurları gidermede kullanılabilecek, çalışma süresi ve birim maliyeti yönünden farklılıklar gösteren çeşitli teknikler bulunmaktadır. Bu amaçla silika absorpsiyonu, afinite pürifikasyonu, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyonu, manyetik cam partikül izolasyonu, dielektroforez, fenolkloroform tekniği ve manyetik partikül teknolojisi farklı hasta örneği akışı olan laboratuvarlar için örnek olarak verilebilir¹⁶. Çalışmamızda kan kültür örneklerinde bulunabilecek olan PCR inhibitörlerinin etkisi öznel koşullar nedeniyle denetlenememiştir. Ancak bu unsurun başka çalışmalarla araştırılması gerektiği önerilebilir.

Bu çalışmanın sonucunda Rt-PCR yöntemi kültürle karşılaştırıldığında, PCR lehine beklenen olumlu sonuç alınamamıştır. Bunun nedenleri; PCR inhibitörleri, bakteri sayısının az olması, ekonomik nedenlerle test performans analizlerinin yapılamaması gibi faktörler olabilir. Ayrıca, kültür maliyetine PCR yönteminin masrafının eklenmesi, gece alınan sinyallerde PCR yapmanın imkansızlığı, tek tek çalışmanın (kontroller nedeniyle) maliyeti artırması nedeniyle rutin açıdan PCR, uygun bir yöntem olarak değerlendirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Jeong J, Chang CL, Park TS, Lee SH, Kim SR, Jeong SH. Early screening of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from blood culture. J Korean Med Sci 2002; 17(2): 168-72.
2. Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4529-31.
3. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogenous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29(1): 85-92.

4. Haddadin AS, Fappiano SA, Lipsett PA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad Med J* 2002; 78(921): 385-92.
5. Lem P, Spiegelman J, Toye B, Ramotar K. Direct detection of *mecA*, *nuc* and 16S rRNA genes in BacT/Alert blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(3): 165-8.
6. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor E. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8): 2786-90.
7. Akoğlu H, Zarakolu P, Altun B, Unal S. Epidemiological and molecular characteristics of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Hacettepe University Adult Hospital in 2004-2005. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(3): 343-55.
8. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı I, Akan OA, Karahan ZC. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures between 2002-2005 in Ankara University Hospital. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(1): 1-10.
9. Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Michiels M, et al. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococcus species. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1577-87.
10. Gülhan B, Atmaca S, Özekinci T, Suay A. Evaluation of rapid genotype assay for the identification of gram-positive cocci from blood cultures and detection of *mecA* and *van* genes. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 592-601.
11. Ruimy R, Dos-Santos M, Raskine L, et al. Accuracy and potential usefulness of triplex real-time PCR for improving antibiotic treatment of patients with blood cultures showing clustered gram-positive cocci on direct smears. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6): 2045-51.
12. Güler I, Kılıç H, Atalay MA, Perçin D, Erçal BD. Genotyping of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens by rep-PCR. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 581-91.
13. Sancak B, Ercis S, Haşcelik G. Comparison of the value of disk diffusion methods and polymerase chain reaction for fixation of methicillin-resistant staphylococcus. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37(2-3): 109-15.
14. Carver PL, Lin SW, DePestel DD, Newton DW. Impact of *mecA* gene testing and intervention by infectious disease clinical pharmacists on time to optimal antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia at a University Hospital. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2381-3.
15. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2): 428-35.
16. Sayan M, Meriç M, Celebi S, Willke A. Elimination of PCR inhibitors in routine diagnostic real-time PCR assay and results of internal amplification control. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(1): 179-81.
17. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26(2): 133-46.