

## STAPHYLOCOCCUS AUREUS'TA METİSİLİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE SEFOKSİTİN DİSK, OKSASİLİN DİSK, OKSASİLİN AGAR TARAMA VE PBP2a LATEKS TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF CEFOXITIN DISK, OXACILLIN DISK, OXACILLIN AGAR SCREEN AND PBP2a LATEX TESTS FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Murat TELLİ      Bülent SÜMERKAN      Duygu EŞEL

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

**Anahtar Sözcükler:** *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, yöntemler

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, methods

Geliş: 11 Mayıs 2006

Kabul: 18 Mayıs 2006

### ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının doğru olarak belirlenmesi, bu direncin heterojen olması nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Bu çalışmada sefoksitinle yapılan disk difüzyon testinin MRSA belirleme yeteneği açısından halen kullanılmakta olan diğer yöntemlerle karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmaya 300 *S. aureus* suşu alındı. Metisilin direncinin belirlenmesinde; oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) disk difüzyon testi, MRSA lateks aglütinasyon (Denka-Seiken, Japonya), oksasilin agar tarama testi uygulandı. MRSA tanısında altın standart olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geni araştırıldı. Oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, lateks aglütinasyon ve oksasilin agar tarama testlerinin duyarlılıkları sırasıyla, %98.8, %98.3, %97.7 ve %98.8; özgüllükleri sırasıyla, %99.1, %99.1, %97.4 ve %98.3 olarak bulundu. Sonuç olarak, sefoksitin disk difüzyon testi metisiline direnci belirlemede güvenilir yöntem olarak bulundu.

### SUMMARY

Accurate detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is not feasible evermore because of heterogeneous resistance in *Staphylococcus aureus*. The aim of this study was to compare cefoxitin disk diffusion test and presently used other tests for detection of MRSA. For this purpose, 300 *Staphylococcus aureus* strains were tested. Methicillin resistance was evaluated using oxacillin (1 µg) disk diffusion test, cefoxitin (30 µg) disk diffusion test, oxacillin-agar screening and MRSA-screen latex agglutination test (Denka-Seiken, Japan). The presence of *mecA* as the "gold standard" was investigated by PCR. The sensitivities of oxacillin (1 µg) disk diffusion test, cefoxitin (30 µg) disk diffusion test, oxacillin-agar screening and MRSA-screen latex agglutination tests were found as %98.8, %98.3, %97.7 and %98.8, respectively, and specificities as %99.1, %99.1, %97.4 and %98.3, respectively. In conclusion, cefoxitin (30 µg) disk diffusion test was found as a reliable test for the detection of MRSA.

### GİRİŞ

*Staphylococcus aureus*, toplumda ya da hastanede kazanılmış ciddi infeksiyonlara neden olur. Benzilpenisilin kullanıma sunulmasıyla *S. aureus*'a bağlı invazif infeksiyonların mortalite oranlarında önemli bir düşüş olmuştur. Ancak hızla, önce benzilpenisilinlere sonra da yarı sentetik penisilinlere direnç gelişmiştir. Bunu takiben

metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları ortaya çıkarak ve önemli bir klinik problem oluşturmuşlardır (1, 2).

Hemen hemen tüm MRSA izolatları PBP2a denilen ek bir penisilin bağlayan protein üretir. PBP2a beta-laktamlara PBP2'den daha düşük afinitelidir ve metisilin asıl fizyolojik hedefidir. PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanır (3).

Metisilin direncinin doğru bir şekilde belirlenmesi uygun antimikrobik ilacın kullanımını sağlamak için gereklidir. Oksasilin, metisilin direncinin belirlenmesinde diğer penisilinaze dirençli penisilinlere göre daha stabil bir molekül olması ve özgülüğü yüksek sonuç vermesi nedeniyle *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, önceden NCCLS olarak adlandırılıyordu) tarafından fenotipik testlerde önerilmektedir (4). Fakat direncin heterojen olması, oksasilin kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, dirençli ve duyarlı sonuçların ayırımında zorluklara neden olmaktadır (1, 5-7). Bundan dolayı sonuçların güvenilirliğini artırmak için inokulum miktarını artırmak, daha düşük sıcaklıkta inkübasyon, sodyum klorür içeren oksasilin tarama testi veya inkübasyonu uzatma gibi önerilerde bulunulmuştur (1, 6, 8). CLSI oksasilin agar tarama testini ek bir test olarak önermektedir (4, 9). Fakat agar tarama sadece *S. aureus* için önerilmekte ve heterojen suşlarda değerlendirme zor olmaktadır (8, 10).

Bir sefamisin türevi olan sefoksitin *mecA* genini diğer penisilinlere göre daha iyi eksprese ettirdiği gösterilmiştir (5). Bazı araştırmacılar sefoksitin disk difüzyon testinin oksasilin disk difüzyon testinden daha yararlı olduğunu, *mecA* gen varlığı ile uyumun daha iyi olduğunu bildirmiştir (1, 11-13). CLSI antibiyotik duyarlılık testleri alt komitesi CLSI yayını M100-S15'te hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda (Tablo 2C) sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak ilave etmiştir (14).

Bu çalışmada, özellikle sefoksitinle yapılan disk difüzyon testinin MRSA belirleme yeteneğini halen kullanılmakta olan diğer yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ YÖNTEM

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarı'nda klinik örneklerden izole edilen 300 *S.*

*aureus* suşu alındı. Kalite kontrol suşları olarak *S. aureus* 27R ve ATCC 25923 kullanıldı

**Bakteri tanınması:** Koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz reaksiyonu, trehaloz- mannitol testi, DNase testi, koagülaz ve kümeleşme faktörü testlerinden yararlanılarak yapıldı.

**Metisilin direncinin belirlenmesi:** Oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama testi CLSI standartlarına göre yapıldı. MRSA lateks aglütinasyon (Denka-Seiken, Japonya) ticari firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Çalışmaya alınan tüm *S. aureus* kökenlerinde altın standart olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geni araştırıldı (15). Sefoksitin için dirençli ve duyarlı zon çapları sırasıyla ≤ 19 mm ve ≥20 mm olarak kabul edildi (4). Oksasilin için ise bu çaplar ≤10 mm ve ≥13 olarak yorumlandı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 300 *S. aureus* kökeninin 181'inin *mecA* geni taşıdığı, 119 kökenin ise *mecA* negatif olduğu bulundu. *mecA* pozitif olan 181 kökenin 179'u oksasilin disk difüzyon testi ile, 178'i sefoksitin disk difüzyon testi ile, 179'u oksasilin agar tarama yöntemi ile ve 177'si MRSA lateks aglütinasyon testi ile metisilin direnci açısından doğru olarak tanımlandı. Buna karşılık *mecA* negatif olan 119 kökenden birer tanesi oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleri ile metisiline dirençli (yalancı direnç) bulunurken, iki köken oksasilin agar tarama yöntemi ile, üç köken ise MRSA lateks aglütinasyon yöntemi ile metisiline dirençli (yalancı direnç) olarak belirlendi (Tablo 1).

Altın standart olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geni araştırması sonuçlarına göre metisilin direncini saptamada kullanılan diğer testlerin duyarlılık, özgülük, pozitif

**Tablo 1.** Suşların *mecA* geni varlığına göre dağılımı ve kullanılan yöntemlerin MRSA, MSSA olarak belirledikleri suş sayıları

Yöntemler	<i>mecA</i> (+)		<i>mecA</i> (-)	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
Oksasilin disk difüzyon	2	179	118	1
Sefoksitin disk difüzyon	3	178	118	1
Agar tarama	2	179	117	2
MRSA lateks aglütinasyon	4	177	116	3

**Tablo 2.** *mecA* geni varlığı altın standart olarak alındığında yöntemlerin duyarlılık, özgülük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri

Yöntemler	Duyarlılık	Özgülük	Pozitif yorumlama gücü	Negatif yorumlama gücü
Oksasilin disk difüzyon	%98.8	%99.1	%99.4	%98.3
Sefoksitin disk difüzyon	%98.3	%99.1	%99.4	%97.5
Oksasilin agar tarama	%98.8	%98.3	%98.8	%98.3
MRSA lateks aglütinasyon	%97.7	%97.4	%98.3	%96.6

yorumlama gücü ve negatif yorumlama gücü değerleri Tablo 2'de gösterildi.

## TARTIŞMA

*Staphylococcus aureus* kökenlerindeki metisilin direnci, *mecA* gen kompleksi tarafından kodlanan değişmiş bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a ile ilişkilidir (12, 16, 17). Bu direncin heterojen olması fenotipik yöntemlerin MRSA suşlarını belirlemede problem oluşturmuştur. Direnç görünümünü artırmak için yeni laboratuvar yöntemleri geliştirilmiş (sodyum klorür ilavesi, uzatılmış inkübasyon süresi, düşük sıcaklıkta inkübasyon gibi), fakat direnç tanımlama her zaman doğru olmamıştır (10, 16, 18, 19).

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptitlerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyetle sonuçlanmaktadır (16). Bu nedenle *S. aureus* kökenlerinde metisilin direncinin doğru tanımlanması gereklidir.

*mecA* geninin belirlenmesi MRSA suşlarının ortaya çıkarılmasında en kesin yöntemdir, ancak rutin laboratuvarlarda kullanımı uygun değildir ve özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir (16).

MRSA lateks aglütinasyon testi kolay uygulanır, hızlı sonuç verir (15-20 dakika) ve çok sayıda örneğin aynı anda incelenmesini sağlar. Çeşitli çalışmalarda bu testin duyarlılığı % 93.5 - % 100, özgüllüğü % 96.5- %100 arasında bulunmuştur (10, 18). Bu çalışmada testin duyarlılığı % 97.7 özgüllüğü %97.4 olarak belirlenmiştir.

Bazı çalışmalarda düşük düzeyde metisilin direnci gösteren suşlarda sefoksitin PBP2a üretimini indüklediği ve lateks aglütinasyon testinin duyarlılığını artırdığı vurgulanmıştır. Rohrer ve ark. (20) MRSA lateks tarama testinin sefoksitin indüksiyonu öncesi duyarlılığını %93.5, özgüllüğünü %97.7, indüksiyon sonrası duyarlılığını %100, özgüllüğünü %95.5 bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise böyle bir indüksiyon yöntemi kullanılmamıştır.

Oksasilin agar tarama yönteminin heterojen suşlar ile yapılan çalışmalarda duyarlılığının düştüğü gösterilmiştir (<%95) (1, 10, 21). Diğer yandan, duyarlılığın %97'den

yukarda olduğunu belirten çalışmalar da vardır (18, 22, 23). Çalışmada bu testin duyarlılığı %98.8, özgüllüğü ise %98.3 bulunmuştur. İnokülasyon yöntemlerinde bazı farklılıklar ile direnç belirleme oranının artacağını belirten çalışmalara da rastlanmaktadır (19, 21).

Oksasilin disk difüzyon yönteminin birçok heterojen suşta %61-%96.4 arasında duyarlılık gösterdiğini belirten çalışmalar vardır (1, 19). Bazı çalışmalarda ise oksasilin disk difüzyonu ile ilgili çok iyi duyarlılık sonuçları bildirilmiştir (10, 21, 22). Disk difüzyon yönteminde görülen diğer bir problem, özgüllüğünün duyarlılığından daha yüksek oluşudur (%89-100). Bir başka deyişle, yanlış pozitif sonuç olasılığı, yanlış negatif sonuç olasılığından daha yüksektir. Çalışmada da disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %98.8, özgüllüğü ise %99.1 bulunmuştur.

Felten ve ark. (1) 83 MRSA klinik izolatu ile sefoksitin, moksolaktam disk difüzyon testlerini, oksasilin için farklı konsantrasyon, inokulum ve sıcaklıklarda disk difüzyon testini, agar tarama ve MRSA-Screen testlerini yapmışlar, sefoksitin için inhibisyon zon çapını <27 mm, moksolaktam için <24 mm kabul etmişlerdir. Çalışmalarında sefoksitin testi için duyarlılığı ve özgüllüğü % 100 olarak bulmuşlardır.

Cauwelier ve ark. (12) çalışmalarında sefoksitin ve oksasilinin değişik sıcaklıklardaki duyarlılık ve özgüllüklerini, oksasilin agar tarama ve MRSA lateks aglütinasyon testinin duyarlılık ve özgüllüklerini, PZR ile *mecA* geni belirlenmesini altın standart olarak karşılaştırmışlardır. Sefoksitin inhibisyon zon çaplarını <20 mm ise MRSA, ≥24 mm ise MSSA olarak kabul etmişlerdir. Sefoksitin duyarlılığını ve özgüllüğünü hem 30° C, hem 35° C için % 100 bulmuşlardır. Ancak CLSI'nin son kılavuzunda MRSA'lar için sefoksitin duyarlı ve dirençli zon çapları ≥20 mm ve ≤19 mm olarak belirtilmiştir (14).

Sonuç olarak, *mecA* pozitif ve negatif *S.aureus* kökenlerini belirlemede, oksasilin 1 µg disk yöntemi ile sefoksitin 30 µg disk yöntemi birbirine yakın duyarlılık ve özgüllükte, oksasilin agar tarama yöntemi ve MRSA lateks aglütinasyon testleri ise daha düşük özgüllükte bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, sefoksitin disk difüzyon yöntemi, rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilebilecek bir yöntemdir.

## KAYNAKLAR

1. 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: 2766–71.
2. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* **1961**; 14: 385-93.
3. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **1997**; 10: 781-91.
4. NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*. 6th ed. NCCLS Document M7–A6 (ISBN 1-56238-486-4). Wayne, Pennsylvania: NCCLS, **2003**.
5. Swenson JM, Fred CT, and the Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 3818-23.
6. Mackenzie AM, Richardson RH, Lannigan R, Wood D. Evidence that the National Committee for Clinical Laboratory Standards disk test is less sensitive than the screen plate for detection of low-expression- class methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 190-11.
7. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora* **1996**; 1: 14-7.
8. Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve *mecA* gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül* **2002**; 36: 133-40.
9. NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. 8th ed. NCCLS document M2–A8. Pennsylvania: NCCLS, **2003**.
10. 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.
11. Boutiba-Ben Boubaker I, Abbes RB, Abdallah HB, 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.
12. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2004**; 23: 867-8.
13. Skov R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson- Liljequist B, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disk on iso-sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **2003**; 52: 204–7.
14. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI Document M100-S15 Pennsylvania: CLSI, **2005**.
15. Ünal S, Hoskins J, Flokowsch JE, et al. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 1685-91.
16. Cavassini MA, Wenger K, Jatton D, Blanc S, Bile J. Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 1591–4.
17. Gerberding JL, Miick C, Liu HH, Chambers HF. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**; 35: 2574–9.
18. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA* positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3946–51.
19. Swenson JA, Spargon J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3781–4.
20. Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, Berger-Bächli B. Improved methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2001**; 20: 267-70.
21. Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol News* **2002**; 24: 159-63.
22. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, et al. 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: 2952-62.
23. Skov RL, Pallesen LV, Poulsen RL, Espersen F. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 43: 467-75.

## İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ  
 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
 09100 AYDIN  
 e-posta: mtelli@adu.edu.tr