

Staphylococcus aureus Su larında Sodyum Klorürlü Mueller Hinton Agar Kullanımının Metisilin Direncini Saptamadaki Etkinli i

Emel ÇALI KAN¹, Cihadiye Elif ÖZTÜRK², dris AH N²

ÖZET

Staphylococcus aureus su larındaki artan metisilin direnci nedeniyle bu su ların saptanması çok önemlidir. Bu çalı mada %4 NaCl içeren Mueller Hinton agar (MHA)'ın metisilin direncini saptamadaki etkinli i ara tırılmı tır. Mart-Ekim 2011 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, servis ve poliklinik hastalarından gönderilen örneklerde üreyen 100 S. aureus su u çalı maya dahil edilmi tir. Metisilin direncini saptamak için laboratuvarımızda, MHA'a besiyerini hazırlama a masında %4 oranında NaCl eklenerek ve NaCl ekmeden hazırlanmı besiyerleri steril petri kaplarına 4 mm kalınlı nda dökülmü tür. Bakteri süspansiyonları plaklara ekildikten sonra 1 µg'lık oksasilin diski yerle tirilerek inkübe edilmi tir. Su lardan iki tanesi NaCl'li MHA'da metisiline duyarlı olarak saptanırken, NaCl içermeyen MHA'da metisiline orta düzeyde duyarlı olarak bulunmu tur. S. aureus su larında metisilin direncini fenotipik olarak tespit etmede %4 NaCl'li MHA kullanımının NaCl içermeyen MHA'dan daha etkin oldu u sonucuna varılmı tır.

Anahtar Kelimeler: Metisilin direnci; Mueller Hinton agar, oksasilin; Staphylococcus aureus.

The Effectiveness of Using Mueller Hinton Agar Containing Sodium Chloride in Staphylococcus aureus Strains on the Detection of Methicillin-Resistance

ABSTRACT

Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains is very important. In this study,he effectiveness of Mueller-Hinton agar containing 4% NaCl (MHA) on the detection of methicillin resistance has been investigated. 100 S. aureus strains isolated between March-October 2011 were tested in Laboratory of Medical Microbiology, Düzce University Faculty of Medicine from samples of service and polyclinic patients. To detect the methicillin-resistance, MHA both prepared by adding 4% NaCl and NaCl-free poured into the plates of 4 mm thickness. Bacteria suspensions were inoculated plates and 1 mcg oxacillin disk placed. Two strains were found to be methicillin-susceptible in Mueller-Hinton agar containing 4% NaCl, but found to be intermediate susceptible to methicillin in NaCl-free MHA. It is concluded that detection of methicillin resistance in S. aureus strains by using Mueller-Hinton agar containing 4% NaCl is more effective than NaCl-free MHA phenotypically.

Keywords: Methicillin resistance; Mueller Hinton agar; oxacillin; Staphylococcus aureus.

G R

Stafilokoklar genellikle deri ve mukozaların normal flora bakterileri olup fırsatçı infeksiyonlara neden olabilmektedir (1). Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA), 1961 yılında ilk olarak saptandıktan sonra hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların önemli bir etkeni olarak kar ımıza çıkmaktadır (2). Bu nedenle dirençli su ların do ru bir ekilde tespit edilmesi, tedaviyi belirlemede önem arz etmektedir. Metisilin direncini saptamak için mikrobiyoloji laboratuvarlarında %4 NaCl içeren Mueller Hinton agar (MHA) ve NaCl içermeyen MHA'da yapılan oksasilin disk difüzyon yöntemlerinin yanısıra oksasilin-tuz agar tarama, oksasilin mikrodilüsyon, sefoksitin disk difüzyon ve sefoksitin mikrodilüsyon, PBP2a lateks aglütinasyon yöntemleri kullanılabilir (3-6). Bu çalı mada, oksasilin disk difüzyon yönteminin, %4 oranında NaCl eklenerek hazırlanmı MHA'da uygulanmasının, S. aureus su larındaki metisilin direncinin saptanması üzerine etkisi ara tırılmı tır.

¹ Keçiören E itim ve Ara tırma Hastanesi, Ankara - TURKEY

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce - TURKEY

Correspondence: Dr. Emel ÇALI KAN e-posta: emelcaliskan81@yahoo.com.tr

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalı maya, Mart-Ekim 2011 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, servis ve poliklinik hastalarından gönderilen örneklerde üreyen 100 *S. aureus* su u dahil edilmi tir. %5 kanlı agar (HiMedia, India)'da, normal atmosfer ko ullarında ve 37°C'de inkübe edildikten sonra üreyen bakteriler konvansiyonel yöntemlerle (Gram boyama, katalaz, tüpte koagülaz) tiplendirilmi tir. Metisilin direncini saptamak için MHA'a (HiMedia, India), hazırlama a masındayken %4 oranında NaCl eklenerek ve NaCl eklemeyen iki ayrı ekilde hazırlanan besiyerleri petri kaplarına 4 mm kalınlı nda dökülmü tür. 0.5 McFarland yo unlu unda bakteri süspansiyonu plaklara ekildikten sonra 1 µg'lık oksasilin (Bioanalyse, Türkiye) diski yerle tirilip, 35°C'de 24 saat inkübe edilmi tir. *S. aureus* su larında 10 mm, duyarlılık zonu olu ması metisilin direnci olarak de erlendirilmi tir (7). Zon çapına göre yöntemler arasında duyarlılık farkı saptanan su lar VITEK 2 Compact sistemi (bioMerieux, Fransa) ile de erlendirilmi tir.

statistiksel Analiz

Veriler sayı ve yüzde olarak belirtilmi olup, yöntemler arasındaki farkın istatistiksel analizi ki-kare testi kullanılarak yapılmı tir.

BULGULAR

Çalı maya çe itli klinik örneklerden elde edilen 100 *S. aureus* su u dâhil edilmi tir. Su lardan iki tanesi NaCl'lü MHA'da metisiline duyarlı olarak saptanırken, NaCl içermeyen MHA'da metisiline orta düzeyde duyarlı olarak (11 mm) bulunmu tur. Yöntemlerden birisi duyarlı iken di erinin dirençli oldu u su tespit edilmemi tir. VITEK 2 Compact sistemi ile yapılan antibiyogramda ise disk difüzyon yöntemi ile metisiline orta düzeyde duyarlı saptanan su ların duyarlı oldu u görülmü tür. Bakterilerin farklı besiyerlerindeki metisiline direnç durumları Tablo 1'de gösterilmi tir.

Tablo 1. *Staphylococcus aureus* su larının farklı besiyerlerindeki metisiline duyarlılık durumları (n=100) (MHA=Mueller Hinton Agar)

NaCl'lü MHA	NaCl'süz MHA		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Duyarlı	67	2	-
Orta duyarlı	1	-	-
Dirençli	-	-	30

TARTI MA

Son yıllarda, bakterilerde antibiyotiklere kar ı artan direnç oranları nedeniyle, direnci saptamak ve yeni antibiyotikler geli tirmek önemli bir sorun haline gelmi tir. *S. aureus* su larındaki penisilin direnci nedeniyle beta-laktamazlara dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin) geli tirilmi ancak kısa süre sonra MRSA su ları görülmeye ba lanmı tir (8). Arıdo an ve ark., 2002 yılında yaptıkları çalı mada izole edilen 144 *S. aureus* su unun

59'unu (%41) metisiline dirençli olarak bulmu lardır (9). Dündar ve ark., 2005-2007 yılları arasında izole edilen 936 su un 215'ini (%23) metisiline dirençli olarak saptamı lardır (10). Yine Türkdâ ı ve ark., 2007-2009 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen 287 *S. aureus* su unun 122'sini (%42.5) metisiline dirençli olarak belirlemi lerdir (11). Çalı mamızda ise *S. aureus* su larının %30'u, her iki besiyeri ile yapılan disk difüzyon yönteminde metisiline dirençli olarak bulunmu tur. Yıllara göre de i mekle birlikte metisiline direnç oranlarındaki yükseklik nedeniyle direncin do ru tespit edilmesi ve yeni antibiyotiklerin kullanımı önem ta ımaktadır. Laboratuvarlarda çe itli yöntemler uygulanarak, stafilokoklardaki metisilin direnci do ru olarak saptanmaya çalı ılmaktadır. Shariati ve ark, *S. aureus* su larındaki metisilin direncini saptamada kullanılan yöntemlerden, oksasilin E-test yönteminin duyarlılı ını %100, oksasilin agar taramanın %98, oksasilin disk difüzyon yönteminin %95 olarak bulmu lardır (12). Bu sonuçlara göre, metisilin direncini saptamada en iyi fenotipik yöntem oksasilin E-test olmakla birlikte, dü ük maliyeti nedeniyle, oksasilin agar taramanın uygulanabilir bir yöntem oldu unu bildirmi lerdir. Vural ve ark çalı malarında MRSA tanısında, oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin duyarlılıklarını %100 ve özgüllükleri sırasıyla %100, %100, %100 ve %97 olarak bulmu lardır (13). Sevgican ve ark., 100 *S. aureus* ve 100 koagülaz negatif stafilokok (KNS) su uyla yaptıkları yöntem kar ıla tırmasında *S. aureus* su larında, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon ve E-test sonuçlarının mecA ile uyumlu oldu unu KNS su larında ise sefoksitin E-testi dı ndaki testlerinin mecA ile uyumlu oldu unu görmü lerdir (14). Tüm bu çalı malarda oksasilin disk difüzyon yönteminin duyarlılı ının yüksek oldu u görülmü tür. Çalı mamızda ise metisilin direncini saptamak için laboratuvarlarda rutin antibiyogramlarda kullanıldı ı için uygulama kolaylı ı olan besiyerleri de erlendirilmi ve NaCl'lü MHA'da bir, NaCl içermeyen MHA'da iki *S. aureus* su u metisiline duyarlı oldu u halde orta derecede duyarlı olarak bulunmu tur. statistiksel olarak iki besiyeri de metisilin direncini benzer oranda saptamakla birlikte NaCl'lü MHA'nın metisilin duyarlılı ını daha do ru bir ekilde gösterdi i tespit edilmi tir. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)'de metisilin direncini göstermede *S. aureus* ve KNS su ları için disk difüzyon yönteminde sefoksitin diskinin kullanılması önerilmektedir (15). Ancak laboratuvarlarda BORSA (sınırdaki oksasilin direnci) tanısını fenotipik olarak belirlemek için oksasilin ve sefoksitin diskleri birlikte de erlendirilmekte ve oksasiline orta derecede duyarlı iken sefoksitine duyarlı olması su un BORSA olabilece ini dü ündürmektedir. Çalı mamızda iki su VITEK 2 Compact sistemi ile metisiline duyarlı olarak saptandı ı halde NaCl içermeyen besiyerinde oksasilin diski ile yapılan disk difüzyon yönteminde orta derecede duyarlı olarak bulunmu tur. Laboratuvarımızda rutin olarak iki disk birlikte kullanılıyor olsaydı bu su ların yanlı lıkla BORSA oldu u dü ünülebilece inden tedavide kullanılacak antibiyotikleri etkileyebilecek ya da tanıyı

do rulamak için maliyeti yüksek testlerin yapılmasına sebep olabilecekti. Bu nedenle CLSI'nın önerilerinde olmamasına rağmen BORSA su larını da saptamak isteyen laboratuvarlarda NaCl'li MHA'da oksasilin ve sefoksitin diskinin birlikte kullanılmasının uygulanması kolay bir yöntem oldu ü ünülmü tür.

Sonuç olarak, stafilokoklarda saptanan yüksek metisilin direnci nedeniyle, tedavinin belirlenmesi için uygun tarama testlerinin yapılması gerekti i, *S. aureus* su larında metisilin direncini fenotipik olarak tespit etmede rutin uygulamalarda kolaylıkla kullanılabilen NaCl'li MHA'nın etkinli inin yüksek oldu u ve bu konuda daha fazla sayıda su la yapılabilecek çalı maların önemli olabilece i dü ünülmü tür.

KAYNAKLAR

1. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 623-71.
2. Sancak B. Staphylococcus aureus ve antibiyotik direnci. Mikrobiyol Bul. 2011; 45(3): 565-76.
3. Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, Bakıcı MZ. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve ço ul antibiyotik direnci. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 24(4): 179-84.
4. Ergün Arabacı F, Oldacay M. Sa lık çalı anlarının burun kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slime yapımı pozitifli i. nfeksiyon Derg. 2008; 22(3): 165-8.
5. Çiftçi H, Altundi M, Çetinkaya Z, A ık G, Aktepe OC. Klinik Örneklerden zole Edilen Stafilokoklarda mecA Varlı mın Ara tırılması. Kocatepe Tıp Derg. 2009; 10: 17-20.
6. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. On sekizinci bilgi eki, M100-S18. In: Gür D, çeviri editörü. Clinical and Laboratory Standards Institute. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2008.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, M100-S21. Wayne, PA: CLSI; 2011.
8. Dündar V, Dündar Öztürk D. Stafilokok nfeksiyonları. Wilke Topçu A, Söyletir G, Do anay M, editör. nfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, cilt 2, stanbul: Nobel Tıp; 2002, s.1307-16.
9. Ardo an A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus su larının antibiyotiklere dirençleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2004; 34: 20-3.
10. Dündar D, Sönmez Tamer G. Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus su larının antimikrobiyal duyarlılıkları: Üç yıllık de erlendirme. ANKEM Derg. 2009; 23(1): 8-12.
11. Türk Da ı H, Arslan U, Tuncer . Kan kültürlerinden izole edilen Staphylococcus aureus su larının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2011; 25(2): 84-8.
12. Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar MA, Karimi A, Nafisi MR. Comparison of real-time PCR with disk diffusion, agar screen and E-test methods for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol. 2010; 61(6): 520-4.
13. Vural A, Af ar , Kurultay N, Demirci M. Staphylococcus aureus'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon ve PBP 2a lateks aglütinasyon testlerinin kar ıla tırılması. ANKEM Derg. 2011; 25(3): 145-9.
14. Sevgican E, Sırta M, Özakin C, Gediko lu S. Staphylococcus türlerinde metisilin direncinin farklı yöntemlerle saptanması. nfeksiyon Derg. 2009; 23(2): 63-8.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Three Informational Supplement, M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.