

## Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilocoklarda *mecA* Varlığının Araştırılması

### *Investigation of mecA Genes in Staphylococcus Strains Isolated From Clinical Samples*

İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Mustafa ALTINDİŞ,  
Zafer ÇETİNKAYA, Gülşah AŞIK, Orhan Cem AKTEPE

AKÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar

**ÖZET:** **Amaç:** *Staphylococcus aureus* geniş bir spekt-  
rumda enfeksiyonlara neden olan, özellikle metisiline di-  
rençli suşları ile ciddi hastane enfeksiyonları oluşturan bir  
etkendir. Uzun süreli antibiyotik kullanımı direnç gelişimi  
için önemli olup bu direnci (metisilin ve diğer beta-laktam  
antibiyotiklere) *mecA* geni oluşturur. Tedavisi oldukça zor  
ve maliyetlidir. Bu yüzden metisiline dirençli *S. aureus*  
(MRSA) suşlarının doğru tanısı çok önemlidir.

**Gereç ve yöntem:** Bu çalışmaya 2004-2005 yılları arasın-  
da çeşitli klinik örneklerden izole edilen 193 stafilocok  
izolatı dahil edilmiş olup (*S.aureus* %79.3, koagülaz negati-  
f stafilocok %20.7) suşlarda metisilin direnci Clinical  
and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre  
oksasilin disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.  
Örneklerde *mecA* gen varlığı PCR ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmada toplam 193 Stafilocok incelenmiştir  
(*Staphylococcus aureus* %79.3, koagülaz negatif stafilo-  
kok %20.7). Oksasilin disk difüzyon yöntemiyle 141  
izolat metisiline dirençli bulunurken PCR metoduyla 144  
izolatta *mecA* gen varlığı saptanmıştır. İki metod arasında  
anlamli istatistiksel fark görülmemiştir. PCR çalışmaları-  
yla ortaya konan *mecA* gen varlığı temel alınarak yapılan  
karşılaştırmada disk difüzyon yönteminin MRSA tespiti  
için sensitivitesinin %96.5, spesifitesinin %96.0 olduğu  
gözlenmiştir.

**Sonuç:** Stafilocoklarda metisilin direncinin saptanmasında  
en güvenli yöntemin PCR yardımıyla *mecA* gen varlığının  
araştırılması olduğu, bunun yanı sıra disk difüzyon yön-  
teminin de ucuz, kolay ve spesifik bir alternatif olabileceği  
kanıısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA),  
*mecA*, PCR

**ABSTRACT:** **Aim:** *Staphylococcus aureus* is a potentially  
pathogenic that causes a board spectrum of infections. Me-  
thicillin resistant *S. aureus* (MRSA) is also one of the im-  
portant pathogens causing hospital infections, which is a  
global problem. The long time use of antibiotics this mi-  
croorganism developed important resistance mechanisms.  
Resistance to methicillin and other beta-lactam antibiotics  
is caused by *mecA* gene. Treatment is fairly difficult and  
costly. Therefore it is very important to correctly diagnose  
these MRSA.

**Material and methods:** In this study, samples were isolated  
from various clinical materials collected between 2004-2005.  
Staphylococci isolated from clinic specimens were screened  
for methicillin resistance by oxacillin disc diffusion method  
according to the Clinical and Laboratory Standards Insitute  
(CLSI) guidelines. Afterwards all strains were tested for the  
presence of the *mecA* gene by PCR.

**Results:** A total of 193 Staphylococci were analyzed  
(*Staphylococcus aureus* 79.3%, coagulase negative  
Staphylococci 20.7%). One hundred forty one isolates  
were found oxacillin-resistant by disc diffusion method.  
One hundred forty four isolates were found *mecA* positive  
by PCR. There were no significant differences for two  
methods. Compared with, *mecA* gene PCR assay's the  
sensitivity and specificity of disk diffusion for detecting  
MRSA were found 96.5% and 96.0% respectively.

**Conclusion:** The detection of *mecA* gene by PCR is most  
reliable approach for MRSA, nevertheless disc diffusion is  
quite useful and specific method which can be used as a  
method in clinical microbiological laboratory.

**Key Words:** Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA),  
*mecA* gene, PCR

### GİRİŞ VE AMAÇ

Metisiline dirençli stafilocok suşları tüm dünyada  
hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri-

si olarak bildirilmektedir. Bu önemin yalnızca hastane  
enfeksiyonlarına yol açması değil, aynı zamanda epi-  
demilere yol açabilmesi ve tedavi seçeneklerinin “çok-  
lu antibiyotik direnci” nedeniyle kısıtlı olmasından  
kaynaklandığı bildirilmektedir (1).

*S. aureus* suşları akut ve piyojenik enfeksiyon-  
lar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları,  
postoperatif yara enfeksiyonları ve bakteriyeminin

de yer aldığı geniş bir yelpazede enfeksiyonu oluşturabilmektedir (2).

*S. aureus* suşları önceden beta-laktamaz üretimi ile sadece penisilin ve türevlerine dirençli iken, penisilin bağlayan protein 2 (PBP2) değişimi sonucunda tüm beta-laktam antibiyotikler karşı direnç geliştirmiştir (3,4). Beta-laktamlara dayanıklı penisilin türevlerine de direnç geliştirmiş olan suşlar metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılmaktadır (3).

Metisilin direnç geni ekspresyonu her zaman rutin testlerle saptanamamakta ve bu yüzden metisiline dirençli bir bakteri duyarlı olarak tanımlanabilmektedir (5). Metisiline direncin heterojenite göstermesi, düşük seviyede dirençli suşların ayırımının zorluğu, konvansiyonel duyarlılık testlerinin direnci belirlemede yetersiz kalması tedaviyi olumsuz etkilemektedir (6,7). MRSA tespitinde "altın standart" düşük affiniteli penisilin bağlayan proteini kodlayan (PBP2a) *mecA* geninin gösterilmesidir (8,9).

Çalışmamızda agar tarama testi referans test kabul edilerek, stafilocok suşlarında metisilin direncinin oksasilin disk difüzyon ve *mecA* gen varlığının saptanması ile iki yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METHOD

Çalışmamızda Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli klinik örneklerden izole edilen 193 stafilocok suşu incelenmiştir. Bakteri identifikasyonu koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz reaksiyonu yanısıra mannitol ve koagülaz testleri değerlendirilerek suşlar *S. aureus* ve KNS olarak tanımlanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri için Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyerleri kullanılmıştır. Disk difüzyon testi, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, oksasilin (1µg) diskleri (Oxoid) kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları CLSI kılavuzunda belirtilen duyarlılık sınırlarına göre yorumlanmıştır. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923, dirençli suşlar için ise 27-R izolatu kullanılmıştır.

Moleküler çalışmaların başlangıcında her bakteri suşu DNA ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. PCR ile yaklaşık 533bp'lik *mecA* bölgesinin çalışılan suşlarda varlığı araştırılmıştır. Bunun için araştırılacak gen bölgesine uygun *mecA1* ve *mecA2* olmak üzere 2 adet primer kullanılmıştır. Primerlerin nükleotid dizilimi: *mecA1* (5'AAA ATC GAT GGT

AAA GGT TGG C 3') ve *mecA2* (5'AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3') şeklindedir.

PCR işlemi sonucunda oluşması beklenen 533bp büyüklüğündeki ürünün varlığı %1'lik agaroz kullanılarak jel elektroforezinde incelenmiştir. Bantların büyüklüklerinin belirlenmesinde 1kb ladder marker (Fermentas) olarak kullanılmıştır. PCR sonucu *mecA* negatif çıkan suşlar için PCR işlemi ikici kez tekrarlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 193 stafilocok suşunun 153'ü *S. aureus*, 40'ü KNS olarak belirlenmiştir. Suşların her iki yöntemle elde edilen direnç ve direnç gen varlığı ile ilgili sonuçlar Tablo 1'da verilmiştir.

*mecA* gen varlığı ile disk difüzyon metodu karşılaştırıldığında; disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %96.0, özgüllüğünü %96.5 olarak hesaplanmıştır. Moleküler çalışmalarla elde edilen sonuçlar disk difüzyon metoduyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan fark tespit edilmiştir.

**Tablo:** Oksasilin disk difüzyon ve *mecA* gen varlığının araştırıldığı PCR metodlarının karşılaştırılması

		<i>mecA</i> varlığının PCR ile araştırılması		Toplam
		<i>mecA</i> negatif	<i>mecA</i> pozitif	
Oksasilin Disk Difüzyon	R	2	139	141
	S	47	5	52
<b>Toplam</b>		<b>49</b>	<b>144</b>	<b>193</b>

## TARTIŞMA

Stafilocokların neden olduğu enfeksiyonların kontrol ve tedavisinde uygun antibiyotiğin seçilmesi hayli önemlidir. Çoklu direnç ile öne çıkan MRSA'larda doğru antibiyotik tercihi için öncelikle metisilin dirençli suşlarının hızlı ve doğru olarak tanımlanması gereklidir. Direnç belirleme amaçlı tercih edilen yöntemin rutin laboratuvarlarda kolay uygulanabilir olması, güvenilir olması ve çabuk sonuç vermesi son derece önemlidir (15,16).

Stafilocoklarda metisilin direnci kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Sadece metisiline dirençli izolatlarda bu gen bulunmaktadı (14,17). Bu genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı suşlara transdüksiyonla aktarılabilir. Metisilin direnci homojen ve heterojen direnç olarak

iki gruba ayrılmaktadır. Heterojen dirençli *S. aureus* suşlarında *mecA* geni eksprese olmamakta ve dirençli olması gereken bakteri rutin duyarlılık testlerinde duyarlı olarak saptanıp yanlış tedavi uygulanmaktadır. Bu direnç ortam koşullarında çeşitli değişiklikler yapılarak ortaya çıkarılabilmektedir (14). Ancak, en güvenilir sonuç PCR ile *mecA* geninin varlığının gösterilmesidir.

Çalışmalarda *mecA* gen probe yöntemi ile paralel olarak uygulanan oksasilin agar tarama yöntemi arasında uyumlu sonuçlar alınmış ve çok örnekle çalışılan büyük merkezlerde metisilin direncinin bu yöntem ile araştırılmanın uygun ve ekonomik olduğu vurgulanmıştır (18-20).

Çalışmamızda metisilin direncinin tespiti için oksasilin disk difüzyon ve PCR yöntemleri değerlendirilmeye alınmıştır. Çalışmanın sonucunda bu testlerin metisilin direncini saptama oranları yönünden birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Testlerin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırıldığında da benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Direnç çalışmalarında hatalı sonuçları etkili olmayan tedaviye ya da gereksiz glikopeptid kullanımına neden olmaktadır ki bu da glikopeptid direncinin gelişimi indüklemektedir (21,22). Vankomisine dirençli *S.aureus*'lar (VISA-VRSA) ile oluşan enfeksiyonlarda tedavide mevcut birçok bakterisidal antibiyotige direnç gösterdikleri için güçlüklerle karşılaşmaktadır. (23).

Çalışmalarda inokülasyon miktarının fenotipik direnç belirleme oranlarına etki ettiği bildirilmektedir (24). Fidan ve ark.(25) benzer bir çalışmada broth mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemlerini %100 uyumlu bulurken, disk difüzyon testinde direnç oranını % 0.9 oranında daha düşük saptadıklarını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda oksasilin disk difüzyon yöntemi ile duyarlı bulunan 5 suşta *mecA* gen varlığının gösterilmesi bu suşların heterojen olma ihtimallerini, *mecA* geni taşımadığı halde 2 suşun oksasilin disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunması yanlış pozitifliğin inokülasyona bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sebebi her ne olursa olsun fenotipik karakterlere bağlı direnç çalışmalarında yanlış negatiflikler ya da pozitiflikler söz konusu olabilmektedir. Bu yüzden fenotipik görünüm önemli olmadığı aynı zamanda heterojen suşlarda da sorun oluşturmayan PCR tabanlı çalışmalar yaygınlaştırılmalıdır.

Bir real-time PCR sistemi olan Roche Light-Cycler (Roche Diagnostics, Switzerland), fenotipik olarak direncin belirlenemediği heterojen suşları da

içeren çok sayıdaki izolatta aynı anda çalışabilmektedir. Altın standart olan *mecA* belirleme yöntemi olarak kullanılmaktadır (10).

PCR ile *mecA* genin belirlenmesini altın standart olarak kabul edilerek yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %89 bulunmuştur (10). Atay ve ark. (26) disk difüzyon testini *mecA* gen analizi sonuçları ile karşılaştırmışlar, duyarlılığını %100 özgüllüğünü %91 bulmuş ve disk difüzyon yönteminin rutin laboratuvarında güvenle kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Öğünç ve ark. (27) agar tarama testini referans test kabul etmişler ve disk difüzyon testinin duyarlılığı %95,5, özgüllüğünü %93,4 olarak bulmuşlardır.

Oğuz ve ark. (28) agar dilüsyon testine göre, disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğünü %92.6, agar tarama yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğünü %95 bulmuşlardır. Agar tarama yöntemini önermişlerdir.

Çalışmamızda disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %96, özgüllüğü %96.5 olarak bulunmuştur. Değişik merkezlerde yapılan çalışmaların sonucu ile bizim çalışmamızın sonucu arasında, oksasilin agar tarama yöntemi açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Disk difüzyon testinin duyarlılık ve özgüllüğü, çalışmalar arasında farklılık göstermekte, bu da testin kullanılabilirliği tartışılmasına yol açmaktadır.

Sonuç olarak dirençli suşları tanımlarken heterojen dirençli olanları gözden kaçırmamak için duyarlılık testlerinde CLSI'nın önerilerine özenle uyulmalı, buna karşın tedavi sorunu yaşanması halinde direncin saptanamadığı düşüncesiyle, genotipik yöntemlerin kullanılması özellikle *mecA* gen varlığı bakılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram-positive cocci. The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co. 1997:539-576.
2. Bannerman TL. Staphylococcus, micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
3. Maranan MC, Moreria B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Infect Dis Clin North Am 1997;11:813-849.
4. Archer GL. Staphylococcus aureus; a well-armed pathogen. Clin Infect Dis 1998;26:1 179-1181.

5. Coudron PE, Jones DL, Dalton HP, Archer GL. Evaluation of laboratory tests for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 1986;24: 764-769.
6. Deplano A, Struelens MJ. Nosocomial infections caused by staphylococci. In: Woodford N, Johnson AP, Molecular Bacteriology. HP, New Jersey 1988, pp 431-468.
7. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin direnci. In: Gür D, Söyletir G, Bal Ç ve ark. (ed'ler). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 1997;33;72-76.
8. Ünal S, Werner K, DeGirolami P, Barsanti F, Eliopoulos G. Comparison of detection of methicillin-resistant *S.aureus* in a clinical microbiology laboratory. *Antimicrobial Agent Chemother* 1994; 38: 345-347.
9. Leeuwen WB, Pelt C, Luijendijk AD, Verbrungh HA, Goessens HF. Rapid detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3029-3030.
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; 39:3785-3788.
11. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3946-3951.
12. 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: 2766-2771.
13. Francois P, Pittet D, bento M, et al. Rapid detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical sample by a new molecular assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:254-260.
14. Chambers HF. Methicillin-resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:781-791.
15. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. İstanbul. Hatiboğlu Yayınevi. 1989:125-135.
16. Hackbarth CJ, Chambers HF: Methicillin-resistant *Staphylococci*: Detection methods and treatment of infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33 (7): 995-999.
17. Boyce MJ: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection, epidemiology and control measures. *Infectious Diseases Clinics of North America* 1989;3: 901-913.
18. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Menard C, Roy PH, Ouelette M, Bergeron MG. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44: 231-238.
19. Richard P, Meyran M, Carpenter E: Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 613-617.
20. York MK, Gibbs L, Chehab F: Comparison of PCR detection of *mec A* with standart susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:249-253.
21. Skulnick M, Simor AE, Gregson D: Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1996;30: 1985-1988.
22. Chambers HF, Detection of methicillin-resistant staphylococci. *Infec Dis Clin North Am* 1993; 7: 425-433.
23. Yamazumi T, Marshall A, Wilke WW et al. Comparison of vitek gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination tests for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001;39:53-56.
24. Bozdogan B, Esel D, Whitener C et al. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the hershey medical center. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:864-868.
25. Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol News* 2002;24:159-163.
26. Fidan I, Akyar I, Türet S, Rota S: Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin üç ayrı yöntemle saptanması ve metisiline dirençli suşların in vitro mupirosin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 1997; 31:345-350.
27. Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve *mecA* gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2002; 36:133-140.
28. Ögünç D, Çolak D, Saygan MB ve ark. *Staphylococcus aureus* suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem* 2001;15:84-87.



