

Staphylococcus aureus'un İdentifikasyonunda Kullanılan Üç Metodun Değerlendirilmesi (*)

Banu BAYRAKTAR(**), Dilek YILDIZ (***), Emin BULUT(**)
Şeyda ÖCALMAZ(***), Engin SEBER(***)

(*) *Microbiologia Balcanica 2003, 3rd Balkan Conference of Microbiology 'de sunulmuştur (Eylül 4-6, 2003 İstanbul)*

(**) *Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul*

(***) *Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul*

ÖZET

Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* identifikasyonunda kullanılan DNase, Staphaurex ve ID32 Staph metodları karşılaştırılmıştır. 80 stafilokok izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Sitratlı tavşan plazması ile yapılan tüp koagülaz testi referans metod olarak kullanılmıştır. Genel olarak tüm metodlar birbirile uyumlu sonuçlar vermiştir. Yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla DNaz için %96,7 ve %94,7; Staphaurex için %95 ve %84,2; ID32 Staph için %94,6 ve %100 olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, identifikasyon, tüp koagülaz, DNaz, Staphaurex, ID32 Staph.

SUMMARY

Evaluation of Three Methods for Identification of *Staphylococcus aureus*

In this study DNase, Staphaurex, ID32 Staph methods were compared for identification of staphylococci. A total of 80 staphylococcal isolates were included. A tube coagulase test using citrated rabbit plasma was used as a reference method. In general all methods gave concordant results. The sensitivities and specificities, respectively, were 96,7% and 94,7% for DNase, 95% and 84,2% for Staphaurex, 94,9% and 100% for ID32 Staph.

Key words: *Staphylococcus aureus*, identification, tube coagulase, DNase, Staphaurex, ID32 Staph.

GİRİŞ

Staphylococcus cinsi içinde en önemli insan patojeni *S.aureus*'tur. *S.aureus* burun ön kanatlarında, koltuk altlarında sıklıkla kolonize olarak bulunur ve uygun koşullar altında ciddi fırsatçı enfeksiyonlara yol açar. *S.aureus*'un daha az virulan olan stafilokok türlerinden ayrımı klinik açıdan önem taşımaktadır (1). Tüp koagülaz testi *S.aureus*'un identifikasyonunda en güvenilir yöntemdir. Test, koagülaz enziminin protrombine bağlanarak trombin oluşumuna, bunun da fibrinojenin fibrin pıhtısına dönüşmesine yol açmasına dayanır (2,3). *S.aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırılması için araştırılan bir özelliği de deoksiribonükleaz (DNaz) aktivitesidir; bazı laboratuvarlarda *S.aureus*'un rutin tanımlaması için kullanılmaktadır (3,4). Son yıllarda hızlı aglütinasyon testleri kullanıma girmiştir. Bu testler *S.aureus*'un farklı yüzey

yapılarına bağlanarak reaksiyon verebilen moleküllerle kaplı lateks partikülleri içermektedirler. Bunlardan Staphaurex (Murex) ProteinA ve Clumping faktörü saptayabilen bir kitlerdir (2,5). Stafilokok türlerinin ayırımında kullanılmak üzere geliştirilmiş, biyokimyasal testlere dayanan ticari kitler de mevcuttur. Bu kitler *S.aureus* ayrımını yapmanın yanında, koagülaz negatif stafilokokların tür düzeyinde tanısını da olanaklı kılmaktadır (6,7).

Bu çalışmada tavşan plazması ile yapılan tüp koagülaz metodu referans metod seçilerek, DNaz, aglütinasyon kitlerinden Staphaurex ve ticari identifikasyon kitlerinden ID 32 Staph'ın (BioMerieux) *S.aureus* tanımlamasındaki duyarlılık ve özgüllüğünün karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca ID32 Staph kiti ile etken koagülaz negatif stafilokokların tür dağılımı değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden so-yutlanan toplam 80 stafilokok izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Tüp koagülaz testi ile izolatların 61 tane-si *S.aureus*, 19 tanesi koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak tanımlanmıştır.

Tüp koagülaz için serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış sitrathı tavşan plazması kullanılmıştır. Bir gecelik saf stafilokok kültüründen öze ile bir ko-loni alınarak plazma içinde süspanse edilmiş, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ekimi takiben ilk dört saat ve 24'üncü saatte tüpler koagülasyon varlığı açısın-dan incelenmiştir. 24 saatlik süre içinde koagülasyon oluşturmayan suşlar koagülaz negatif kabul edilmiş-tir(8).

DNaz testi için tüm kökenlerden DNaz agara yoğun nokta ekimleri yapılmış, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün 1 N HCl ile tüm agar yüzeyi göllendirilmiştir. Nokta ekimler çevresinde şeffaf zon oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiş-tir (3,9).

Staphaurex (Murex) aynı anda hem protein A hem de clumping faktörü saptayabilen bir aglütinasyon kitidir. Üretici firma önerilerine göre aglütinasyon kartları üzerinde bakteri kolonileri reaktifle karıştırılmış, aglütinasyon değerlendirilmiştir(2,5).

ID32 Staph striplerine önerildiği üzere ekim yapılmış ve sonuçlar 35 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir. İdentifikasyon bilgisayar yazılı-mı aracılığı ile yapılmıştır (6).

BULGULAR

Tablo 1'de *S.aureus* tanımlamasında kullanılan üç metodun sonuçları özetlenmiştir (Tablo1). Stafilokok suşlarının 72'sinde uygulanan testlerde korelasyon, 8'inde uyumsuzluk gözlenmiştir (Tablo2).

ID 32 Staph ile KNS suşlarının tür düzeyinde identi-fikasyonları Tablo 3'de gösterilmiştir(Tablo3).

TARTIŞMA

S.aureus tanımlamasında tüp koagülaz testi hala referans metoddur. Ancak,tüp koagülaz metoduyla, bazı *S.aureus* suşlarının koagülaz enzimi olmadığı-

Tablo1. S.aureus tanımlamasında kullanılan üç metodun sonuçları

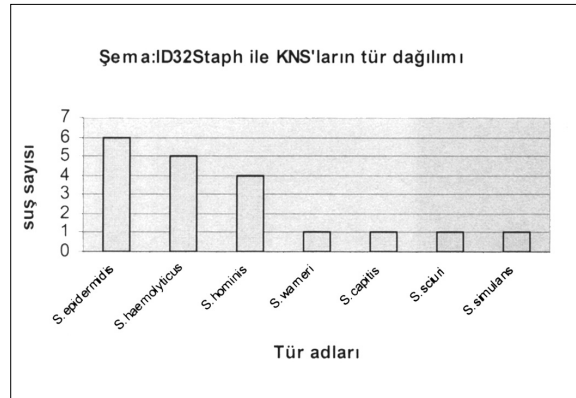
Test	DNaz	Staphaurex	ID32 Staph
Gerçek pozitif	59	58	56
Yalancı pozitif	1	3	-
Gerçek negatif	18	16	19
Yalancı negatif	2	3	3
Uninterpretable	-	-	2*
Duyarlılık (%)	96.7	95	94.9
Özgüllük (%)	94.7	84.2	100

*ID 32 Staph ile *S. chromogenes* olarak tanımlanan 2 suşun identifi-kasyonu %65 altındadır. Bilgisayar yazılımı ile 'kabul edilemez' olarak tanımlanmıştır.

Tablo 2. Uyumsuz sonuç veren suşlar

No	Tüp koagülaz	DNaz	Staphaurex	ID32Staph
1	S.aureus	+	+	S.chromogenes
2	S.aureus	+	+	S.chromogenes
3	S.aureus	-	-	S.hominis
4	S.aureus	-	-	S.epidermidis
5	S.aureus	+	-	S.epidermidis
6	KNS	-	+	S.sciuri
7	KNS	-	+	S.haemolyticus
8	KNS	+	+	S.hominis

Tablo 3. ID32 Staph ile koagülaz negatif stafilokokların tür dağılımı



dan yalancı negatif, bazı koagülaz negatif stafilo-kokların ise proteaz üretimine bağlı yalancı pozitif reaksiyon verebildiği bilinmektedir. (5,9). Ayrıca *S.intermedius*, *S.hycus*, *S.delphini* gibi bazı koagülaz negatif stafilokok türlerinde de koagülaz etkinliği mevcuttur. Uzamış inkübasyonda ise bazı

suşların oluşturduğu stafilokinazlar fibrini lizis ederek pıhtıyı çözerler ve yalancı negatif sonuç oluşabilir(4,9).

S.aureus dışında bazı bakteriler örneğin *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve *Enterococcus faecalis* gibi bazı enterokoklar sitratı metabolize ederek yalancı pozitif sonuç verebilirler. Bu nedenle tüp koagülaz testlerinde sitrat yerine EDTA kullanılması önerilmektedir(4).

Kolay hazırlanması ve ucuz olmasıyla DNaz testi *S. aureus* tanımlamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle arasra DNaz negatif *S.aureus* suşlarına rastlandığı gibi, DNaz pozitif koagülaz negatif stafilokok suşlarıyla da karşılaşılmaktadır(3). Morton ve Cohn (10) koagülaz pozitif *S.aureus* suşlarının %98'ı ve koagülaz negatif *S.epidermidis* suşlarının %13.5'inin DNaz yaptıklarını bildirmişlerdir. Jack ve ark'nın (3) çalışmasında 450 *S.aureus* suşundan üç tanesinde DNaz saptanmazken, 70 *S.epidermidis* suşundan üçünde DNaz aktivitesi saptanmıştır. Ülkemizde DNaz testi ile bildiriler sınırlıdır. Ulutürk ve ark (4) çalışmalarında DNaz ve tüp koagülaz arasında çok iyi uyumluluk saptanmıştır. Çalışmamızda DNaz yüksek duyarlılık (96.7) ve yüksek özgüllükte (%94.7) bulunmuştur.

Son yıllarda *S.aureus*'un hızlı identifikasyonunu sağlayan ticari aglütinasyon kitleri geliştirilmiştir. Bu testler başlangıçta clumping faktörü tespit ederken, 2.kuşak testler hem clumping faktör hem de protein A'yı aynı anda tespit etmektedirler(6,11) Smole ve ark (5) yeterli serbest koagülaz aktivitesi olmayan *S.aureus* suşlarının hızlı aglütinasyon kitleleri ile tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Griethuysen ve Bes (6) *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* ve *S haemolyticus* suşlarının clumping factor üretebileceğini ve yalancı pozitif sonuca neden olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca özellikle MRSA suşları arasında yalancı negatif sonuçlar elde edilmiştir(6,11). Lujendick ve ark (2) çalışmalarında *S. aureus* identifikasyonunda kullanılan üç hızlı testi karşılaştırmışlar, Staphaurex plus için %100, Staphaurex için %95.3 ve Pastorex Staphplus için %100 duyarlılık bulmuşlardır. Smole ve arkadaşları (5) Staphaurexi %99 duyarlılık ve %97.1 özgüllükte saptamışlar. Personne ve ark (12) %99.7 duyarlılık ve %72.7 özgüllükte

saptamışlardır. Bu yöntemle *S.aureus* ayırımının yapılmasının, bir miktar yanlış identifikasyona yol açabileceğini, bu nedenle sonuçların tüp koagülaz gibi ikinci bir testle doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda Staphaurex %95 duyarlılık ve %84.2 özgüllükte bulunmuştur.

ID32 Staph koagülaz negatif stafilokokların tür düzeyinde isimlendirilmesinde kullanılmaktadır. Koagülaz negative stafilokokların patojenik rollerini açıklamak güçtür. Koagülaz negatif stafilokokların isimlendirilmesi patojenik rollerini anlamamızı sağlamakta ve epidemiyolojik çalışmalara yardımcı olmaktadır(7). Çalışmamızda ID32 Staph *S. aureus*'un tanımlanmasında en yüksek özgüllüğü göstermiştir. İki suş ise cins düzeyinde tanımlanamamıştır. Sonuç olarak tüp koagülaz, DNaz, Staphaurex, ID32 Staph metodlarıyla genel olarak birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1. Cengiz T:** Staphylococcus, 'Ustaçelebi Ş(eds): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji' S.339. 1. baskı Güneş Kitabevi, Ankara (1999)
- 2. Lujendick AD, Belkum AV:** Comparison of five tests for identification of Staphylococcus aureus from clinical samples. J Clin Microbiol 34: 2267 (1996)
- 3. Zarzour JY, Belle EA:** Evaluation of three tests for identification of Staphylococcus aureus from clinical sources. J Clin Microbiol 7: 133 (1978)
- 4. Ulutürk R, Eren G:** Stafilokokların ayırımında kullanılan tüpte koagülaz, lamda koagülaz, lateks aglütinasyon ve deoksiribonükleaz testlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 32: 13 (2002)
- 5. Smole SC, Aronson E:** Sensitivity and specificity of an improved rapid latex agglutination test for identification of methicillin-sensitive and resistant Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol 36: 1109 (1998)
- 6. Griethuysen AV, Bes M:** International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 39: 86 (2001)
- 7. Rhoden DL, Miller JM:** Four Year prospective study of STAPH-IDENT system and conventional method for reference identification of Staphylococcus, Stomatococ-

cus and Micrococcus spp. J.Clin.Microbiol.33:96(1995).

8. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Gram Olumlu Koklar. S.498. 2.baskı Barış Yayınları, İzmir (1995)

9. Koneman EW,Allen SD,Janda WM,Scheckenberger PC,Winn WC Jr: Color atlas and textbook of diagnostic Microbiology, p.405 4th Edition.JB Lippincott Company, Phyladelphia (1992).

10. Morton HE, Cohn J: Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. Appl Microbiol 23: 723 (1972)

11. Carricajo A, Treny A: Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staph aureus and Staphycrom coagulase test in the detection and identification of Staphylococcus aureus in clinical specimens. J Clin Microbiol 39: 2581 (2001)

12. Personne P, Bes M: Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of Staphylococcus aureus . J Clin Microbiol 35: 1138 (1997)