



***Staphylococcus aureus*'da metisilin direncinin hızlı tespitinde kolorimetrik *Ast Fast ES*® agar besiyerinin kullanılabilirliği**

***Nilgün Kansak*¹, *Neslihan Arıcı*¹, *Sebahat Aksaray*²**

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul

GİRİŞ ve AMAÇ:

- Antibiyotik direncindeki hızlı artış insan sağlığını tehdit eden küresel bir problemdir.
- Özellikle direnç oranlarının yüksek olduğu ülkelerde; geniş spektrumlu ilaçların gereksiz kullanımının önlenmesi için klinik uzmana en kısa sürede doğru duyarlılık sonucunun bildirilmesi önemlidir.
- Sepsis gibi bazı bakteriyel enfeksiyonlarda tedaviye başlayıncaya kadar geçen birkaç saatlik gecikmenin dahi çok ciddi sonuçları olabileceği düşünüldüğünde konunun önemi daha çok ortaya çıkmaktadır.
- Uzun inkübasyon süresi gerektiren geleneksel (disk diffüzyon, agar dilusyon, sıvı mikrodilusyon gibi) yöntemler yerine kullanılacak, hızlı antibiyotik duyarlılık sonucu almaya yönelik yöntem arayışları devam etmektedir.

- Bu amaçla geliştirilen Ast Fast ES® (Diagnostis, Türkiye) agar, Enterobacteriaceae ve Stafilokoklarda hızlı antibiyotik duyarlılık testi için Mueller-Hinton agar yerine kullanılmak üzere tasarlanmış kolorimetrik bir besiyeridir.
- Ast Fast ES® besiyeri kırmızı renktedir, agar yüzeyinde çoğalan bakterilerin metabolik aktivitesi ile renk sarıya dönüşür. İnhibisyon bölgeleri bakteri tabakası oluşmadan önce belirir ve böylece inokulasyondan 4-6 saat sonra duyarlılık sonuçlarının saptanmasına olanak tanır.



- *Staphylococcus aureus* (SA) özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), dünya çapında toplum ve sağlık hizmetleri ile ilgili enfeksiyonlara sebep olan önemli bakterilerden biridir.
- Çalışmamızda Ast Fast ES ile *S.aureus* izolatlarında saptanan metisilin duyarlılık sonuçları disk difüzyon yöntemi ile kıyaslanarak; hızlı yöntemin uyum ve hata oranları hesaplanmış, yöntemin rutin çalışmalar için kullanılıp kullanılmayacağı irdelenmiştir.

Antibiyotiklere Duyarlılık Testleri

DIAGNOTİS **AST FAST ES®**



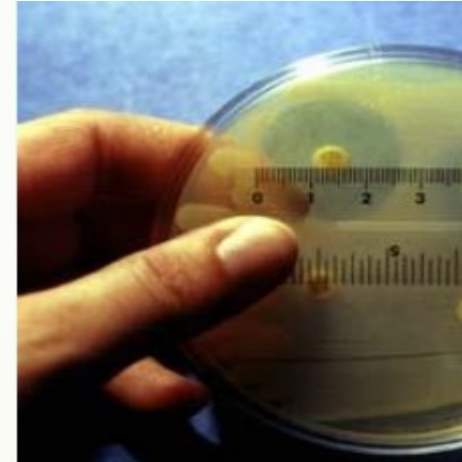
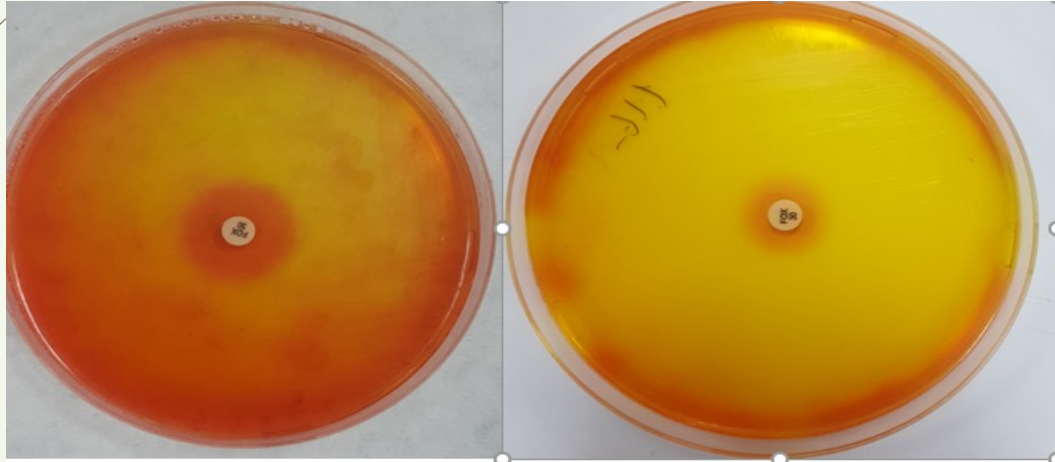
- > HIZLI ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ
- > GRADİENT ÇUBUK İLE MİK BELİRLEME
- > ESBL, MRSA SAPTAMA

Antibiyotiklere duyarlılık test sonuçlarını
24 saat yerine 4-6 saatte alın!

YÖNTEM

- **Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan 55 metisilin dirençli ve 54 metisilin duyarlı toplam 109 S.aureus izolatı çalışmaya dahil edilmiştir.**
- **İdentifikasyonları MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa), antibiyotik duyarlılıkları Vitek-2 (bioMérieux) ile yapılan Koyun kanlı agara (bioMérieux) pasajlanmış taze kültürden bakteri kolonileri alınarak doğrudan koloni süspansiyon yöntemi ile standart disk difüzyon (DD) için 0.5 McFarland ($1,5-2 \times 10^8$ koloni oluşturan birim; KOB/mL) , Ast Fast ES® için firma önerileri doğrultusunda 0.5-1 McFarland arası bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.**
- **McFarland ayarı optik okuyucu DENSICHEK(bioMérieux) ile otomatik olarak yapılmıştır.**
- **Metisilin direnci her iki test için Sefoksitin (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diski kullanılarak eş zamanlı olarak çalışılmıştır.**
- **Kalite kontrol suşu olarak Staphylococcus aureus ATCC 25923 kullanılmıştır.**

- **Zon apları Disk difüzyon için 18-20 saat inkübasyon sonrası ölçülerek: EUCAST V.12.0 ($S \geq 22$ mm, $R < 22$ mm)**
- **Ast Fast ES® için firma önerileri doğrultusunda 4-6 saat inkübasyon sonrası ölçülerek: ($S \geq 19$ mm, $R < 19$ mm) değerlendirilmiştir.**



Resim-1 Ast Fast ES ile metisiline duyarlı (20 mm) (solda) ve metisiline dirençli (14 mm) (sağda) saptanan *S. aureus* duyarlılık sonucu

- *Standart Disk difüzyon yöntemi referans kabul edilerek hızlı yöntemin kategorik uyumu (KU), büyük (BH) ve çok büyük hata (ÇBH) oranları hesaplanmıştır.*

- **Kategorik uyum** (KU) : Referans yöntemle örtüşen (S,R) sonuç sayısı
- **Büyük hata** (BH): Referans yöntemle duyarlı olup, yanlış dirençli saptanan sonuçlar
- **Çok büyük hata** (ÇBH): Referans yöntemle dirençli olup, yanlış duyarlı saptanan sonuçlar
- Uyum ve hata oranları ISO 20776-1 (International Organization for Standardization) kriterlerine göre değerlendirilmiştir:
- **KU \geq %90**
- **BH $<$ %3**
- **ÇBH $<$ %3**

BULGULAR:

- Metisiline dirençli 55 izolatin tümü hızlı yöntemle de dirençli bulunmuştur.
- Metisilin duyarlı 54 duyarlı izolatin biri hariç tümü referans yöntemle kategorik olarak uyumlu bulunmuştur.
- MRSA tespitinde hızlı yöntemin duyarlılığı %100, özgüllüğü %98,1 olarak saptanmıştır.
- Uyum ve hata oranları ISO kriterlerine göre kabul edilebilir değerde bulunmuştur.

| Tablo 1. Ast Fast ES ve SDD yöntemlerinin karşılaştırılması | | Disk difüzyon | | Kategorik uyum | Büyük hata | Çok büyük hata |
|---|----------|---------------|----------|----------------|------------|----------------|
| | | Duyarlı | Dirençli | | | |
| Ast Fast ES | Duyarlı | 53 | 0 | %99,08 | %1,85 | %0 |
| | Dirençli | 1 | 55 | | | |

TARTIŞMA ve SONUÇ

- Metisilin dirençli *S. aureus* tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir.
- Ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar sörveyans ağı 2021 verilerine göre ülkemizde MRSA oranı %48,2 olarak bildirilmiştir.
- Yine ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) ve WHO Regional Office for Europe 2022 raporuna göre ülkemizde invaziv izolatlar için MRSA oranımız >%25 üzerindedir (2016-2020- %22.7-33.4).
- MRSA enfeksiyonlarında mortalite oranı MSSA enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 3 kat daha yüksektir.
- Yaşamı tehdit eden ciddi bakteriyel enfeksiyonlarda uygun antibiyotiğin hızlı verilmesi etkin tedavi, mortalite ve tedavi maliyetinin azaltılması için önemlidir.
- Bu nedenle metisilin direncinin Ast Fast ES ile geleneksel yöntemle göre 14-16 saat önce klinisyene bildirilmesi erken dönemde MRSA etkili antibiyotiklerin başlanması için kritik önem taşır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

- Çoban ve ark 2011 yılında 114 izolatta (51 MSSA ve 63 MRSA) oksasilin diski kullanarak kolorimetrik Quicolor (QC) ES agar (Salubris A.S.,Türkiye) ve geleneksel DD yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada, metisilin duyarlılık sonuçlarını birbiri ile tamamen uyumlu bulmuşlardır.
- Çiftci ve ark 2014 yılında 100 SA izolatında metisilin direncinin saptanması için yaptıkları karşılaştırma çalışmasında QC ES agar ile hem 5. hem de 6. saatler için kabul edilebilir değerin altında (<%90) sonuçlar almışlar ve oksasilin için korelasyonun iyi olmadığını bildirmişlerdir.
- TMC 2022 Uluslararası Mikrobiyoloji Kongresi'nde Kömeç ve ark. tarafından sunulan çalışmada Ast Fast ES® besiyerinin MRSA izolatları saptamada duyarlılığı %94,7, özgüllüğü %89,4 ve kategorik uyumu % 92,1 olarak bildirilmiştir.
- Aynı kongrede Eroğlu ve ark. tarafından sunulan çalışmada Ast Fast ES® besiyeri ile hızlı metisilin duyarlılık taraması yapıldığında büyük ve çok büyük hata saptanmadığı, yöntemin kategorik uyumunun % 100 olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak Ast Fast ES® besiyerinin:

- ❖ **uygulanması ve değerlendirilmesi kolay olması,**
- ❖ **Kabul edilebilir uyum ve hata oranları ile rutinde MRSA'ların hızlı olarak (4-6 saat) saptanmasında kullanılabileceği düşüncesindeyiz.**



Kaynaklar

- 1-Kandavalli V, Karempudi P, Larsson J, Elf J. Rapid antibiotic susceptibility testing and species identification for mixed samples. Nat Commun. 2022;13(1):6215. doi: 10.1038/s41467-022-33659-1.
- 2-Srisrattakarn A, Panpru P, Tippayawat P, Chanawong A, et al. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in positive blood-cultures by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip. PLoS ONE 2022;17(6): e0270686. doi:10.1371/journal.pone.0270686
- 3-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC and zone diameter distributions and ECOFFs. V.12.0. 2022. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf
- 4-ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test de-vices - Part 1: Brothmicro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly grow-ing aerobic bacteria involved in infectious diseases. <https://www.iso.org/standard>
- 5-Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) Özet Raporu 2021 https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHİESA_OZET_RAPOR_2021.pdf
- 6-WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2022-2020-data>
- 7-Coban AY, Demirpek U, Yıldırım T, Caycı YT, et al. Rapid detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates; evaluation of colorimetric Quicolor ES agar and determination of breakpoint inhibition zone diameters of cefoxitin. World J Microbiol Biotechnol 2011; 27 : 1901–1904 (2011). doi:10.1007/s11274-011-0649-y
- 8-Çiftçi İH, Aşık G, Er H, Karakeçe E. Rapid detection of resistance in Staphylococcus aureus by using Quicolor ES. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(2):715-8. doi: 10.1007/s11274-013-1474-2.
- 9-Kömeç S, Öncel B, Ceylan AN, Gülmez A . Staphylococcus Aureus İzolatlarında Hızlı Antibiyogram Besiyeri ile 6 Saatte Duyarlılık Test Sonucu Vermek Mümkün mü? Uluslar arası XL. TÜRK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ (16-20 Kasım 2022, Antalya) Kongre kitabı
- 10-Eroğlu AA, Yakut S, Ulaba A, Zeyrek FY. Staphylococcus Aureus Türüne Ait Bakterilerde Antibiyotik Duyarlılığının Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi ve AST Fast ES® Yönteminin Karşılaştırılması Uluslar arası XL. TÜRK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ (16-20 Kasım 2022, Antalya) Kongre kitabı