

Koagülaz-Negatif Stafilokoklarda Slime Üretimini Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması#

Dr. A. Esin AKTAŞ*, **Dr. Nimet YİĞİT***,
Dr. Funda DOĞRUMAN AL*,
Dr. Ülkü ALTOPARLAK ŞAHİN*,
Dr. Ahmet AYYILDIZ*

* *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.*

ÖZET

Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden soyutlanan koagülaz-negatif stafilokoklarda (KNS) kongo kırmızılı agar (KKA), standart tüp (ST) ve Christensen (C) yöntemleri kullanılarak slime üretimi araştırıldı. Toplam 71 suşun 42 (%59.2)'sinin KKA yöntemiyle, 37 (%52.1)'sinin ST yöntemiyle, 30 (%42.3)'ünün de C yöntemiyle slime pozitif olduğu saptandı. Bulgularımızın istatistiksel analizi Mc Nemar testi ile yapıldı. Sonuçta, KKA yönteminin ST yöntemine ($p < 0.05$) ve C yöntemine ($p < 0.01$) göre; aynı şekilde ST yönteminin de C yöntemine ($p < 0.01$) göre daha duyarlı olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Koagülaz-Negatif Stafilokok, Slime Faktör.

SUMMARY

Investigation of Slime Production by Three Different Method in Coagulase Negative Staphylococci

In this study, slime production was investigated by using congo red agar (CRA), standard tube (ST) and Christensen (C) methods in 71 strains of coagulase negative staphylococci isolated from several clinical samples. Of the strains, the 42 (59.2%) were positive

with CRA method, the 37 (52.1%) with ST and the 30 (42.3%) with C. The data obtained were statistically analysed by Mc Nemar test. Results indicate that the CRA method is more effective than the ST ($p < 0.05$) and the C methods ($p < 0.01$) in determining the slime production. Similarly, the ST method is more effective than the C method ($p < 0.01$).

Key Words: Coagulase Negative Staphylococci, Slime Factor.

XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Deri florasının dominant üyesi ve kültürlerde kontaminasyon olarak kabul edilen koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS), son zamanlarda, özellikle hastane infeksiyonlarında gittikçe önem kazanmaktadır (1-3). KNS'ler üzerinde yapılan çalışmalarda, bu mikroorganizmaların bir kısmının slime adı verilen %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşan viskoz, ekstraselüler bir madde oluşturdukları saptanmıştır. Slime faktör, KNS'lerin düz yüzeylere ve kateterlere tutunarak kolonize olmalarını kolaylaştıran bir etkiye sahiptir. Slime faktör ayrıca, KNS'leri fagositöz ve degranülasyondan korur, kemotaksisi ve opsonositofajiyi önler, nötrofil etkisini inhibe eder, lenfosit aktivitesini azaltır ve bakteriye virülans kazandırır (1-4).

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen KNS kökenlerinde slime üretiminin 3 farklı yöntemle araştırılması ve yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bakteri Suşları

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen 71 KNS üzerinde çalışıldı. Stafilokok-mikrokok ayrımı lizostafin duyarlılık testi ile yapıldı (1). Koagülaz aktivitesinin belirlenmesi için tüp koagülaz testi uygulandı. Slime pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve slime negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

Slime Faktör Üretiminin Araştırılması

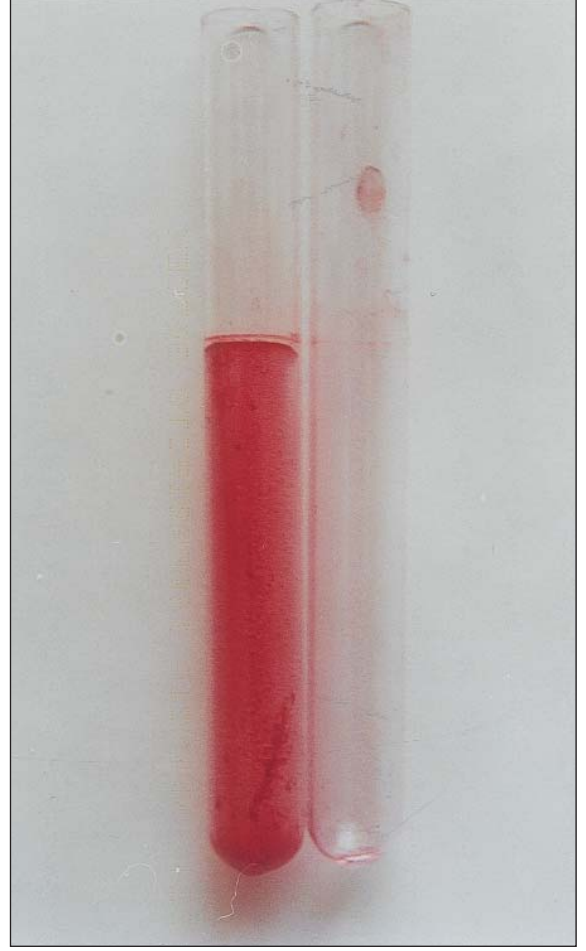
Bu amaçla; standart tüp (ST), Christensen (C) ve kongo kırmızılı agar (KKA) yöntemleri uygulandı.

Standart tüp yöntemi (5): Triptik soy buyyon (TSB) 37 g/L olacak şekilde hazırlandı ve tüplere 5'er mL dağıtılarak steril edildi. Test edilecek suşlar bu besiyerlerine ekildi ve 37°C'de 48 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda tüplerin içindeki sıvı dökülüp steril su ile yıkandıktan sonra her tüpe 2 mL %0.25'lik safranin konularak çalkalandı. Beş dakika sonra boya döküldü ve tüpler kurutuldu. Tüp duvarında kırmızı renkte film tabakasının varlığı (+, ++, +++) pozitif, tüp çeperi renksiz ise negatif olarak değerlendirildi (Resim 1).

Christensen yöntemi (3): ST yöntemine benzer şekilde uygulandı. Besiyeri tüplere 2'şer mL dağıtıldı ve boya olarak %0.04'lük trypan blue kullanıldı. Sonuçlar tüp çeperinde oluşan mavi rengin koyuluk ve kalınlığına göre ST yönteminde olduğu gibi değerlendirildi (Resim 2).

Kongo kırmızılı agar yöntemi (6): Besiyeri 10 g/L agar, 50 g/L sukroz, 37 g/L beyin kalp infüzyon Broth ve 0.8 g/L kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlandı, steril edildikten sonra plaklara döküldü. KNS suşları tek koloni yöntemi ile plaklara ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Siyah koloni oluşturanlar slime pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise slime negatif olarak değerlendirildi (Resim 3).

İstatistiksel değerlendirme: Bulgularımızın istatistiksel analizi Mc Nemar testi ile yapıldı.



Resim 1. Standart Tüp Yöntemi ile Slime Oluşumu.

BULGULAR

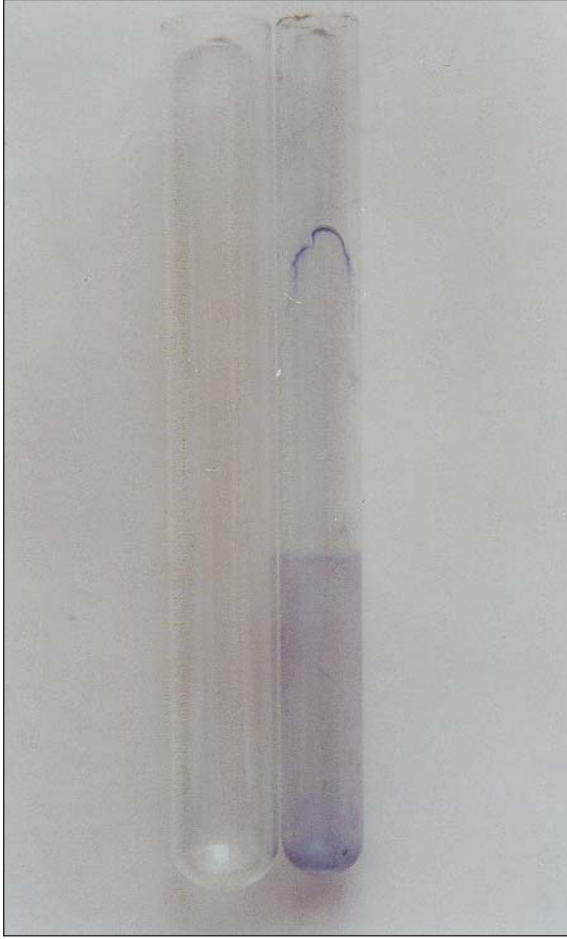
Çalışmaya alınan 71 KNS suşunun 29'u yarıdan, 14'ü kandan, 13'ü idrardan, 5'i trakeostomi kanülünden ve 10'u diğer örneklerden izole edildi. Suşların 42 (%59.2)'si KKA yöntemiyle, 37 (%52.1)'si ST yöntemiyle, 30 (%42.3)'ü ise C yöntemi ile pozitif bulunmuştur.

Yetmişbir KNS suşunun 29'u her üç yöntemle de negatif, 30'u her üç yöntemle de pozitif; 7'si KKA ve ST ile pozitif, C ile negatif; 5'i KKA ile pozitif, ST ve C ile negatif olarak saptandı.

KNS'lerin soyutlandıkları klinik örneklerle uygulanan yöntemlere göre slime üretim sonuçları Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'te görülmektedir.

TARTIŞMA

KNS'ler son zamanlarda önemli fırsatçı patojenler olarak dikkati çekmektedir. Bununla birlikte klinik materyalden izole edilen KNS'lerin



Resim 2. Christensen Yöntemi ile Slime Oluşumu.

tümü önemli hastalıkların sorumlusu değildir. Derinin normal florasında ve hastane şartlarında hemen her yerde bulunan bu mikroorganizma izole edildiğinde, infeksiyonlarla ilişkisi iyi ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu ayırmda diğer patojenite kriterleri ile birlikte slime olu-



Resim 3. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi ile Slime Oluşumu.

şumu önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (2,3,7).

Bu çalışmada ST, C ve KKA yöntemleri kullanılarak KNS kökenlerinde slime faktör üretimi araştırılmıştır. İncelemeye alınan 71 KNS suşunun 42 (%59.2)'sinde KKA yöntemiyle, 37 (%52.1)'sinde ST yöntemiyle, 30 (%42.3)'ünde ise C yöntemiyle slime faktör üretimi olduğu saptanmıştır.

Örneklerden 29 (%40.9)'u her üç yöntemle de negatif iken, 30 (%42.3)'ü her üç yöntemle pozitif bulunmuştur. KKA ve ST yöntemi ile pozitif bulunan 7 suş, C ile negatif sonuç vermiştir. Beş suş ise sadece KKA ile pozitif, diğer iki yöntem ile negatif olarak saptanmıştır.

Yapılan diğer çalışmalarda, pozitiflik oranı KKA yöntemi ile %13-58, ST yöntemi ile %29.6-60, C yöntemi ile %21.3-61 arasında değişmektedir (8-18).

Birçok araştırmacı, KKA yönteminin pratik, ucuz ve diğer yöntemlerle uyumlu olması nede-

Tablo 1. KKA Yöntemi ile Saptanan Slime Üretimini Örneklerle Göre Dağılımı.

Örnekler	Slime pozitif		Slime negatif	
	Sayı	%	Sayı	%
Yara (n= 29)	22	75.9	7	24.1
İdrar (n= 13)	7	53.8	6	46.2
Kan (n= 14)	6	42.9	8	57.1
Trakeostomi kanülü (n= 5)	3	60.0	2	40.0
Diğer (n= 10)	4	40.0	6	60.0
Toplam (n= 71)	42	59.2	29	40.8

Tablo 2. ST Yöntemi ile Saptanan Slime Üretiminin Örnekler Göre Dağılımı.

Örnekler	Slime pozitif		Slime negatif	
	Sayı	%	Sayı	%
Yara (n= 29)	20	68.9	9	31.1
İdrar (n= 13)	6	46.2	7	53.8
Kan (n= 14)	5	35.7	9	64.3
Trakeostomi kanülü (n= 5)	2	40.0	3	60.0
Diğer (n= 10)	4	40.0	6	60.0
Toplam (n= 71)	37	52.1	34	47.9

Tablo 3. C Yöntemi ile Saptanan Slime Üretiminin Örnekler Göre Dağılımı.

Örnekler	Slime pozitif		Slime negatif	
	Sayı	%	Sayı	%
Yara (n= 29)	16	55.2	13	44.8
İdrar (n= 13)	4	30.8	9	69.2
Kan (n= 14)	4	28.6	10	71.4
Trakeostomi kanülü (n= 5)	2	40.0	3	60.0
Diğer (n= 10)	4	40.0	6	60.0
Toplam (n= 71)	30	42.3	41	57.8

niyle tercih edilebileceğini bildirmektedir (9-12). Bazı araştırmacılar ise özellikle zayıf pozitifliklerde mikro yöntemleri tavsiye etmektedir (18,19).

Yöntemler uygulama ve değerlendirme açısından birbirleriyle kıyaslandığında; ST ve C yöntemleri tüpte çalışılmakta, örneklerin tek tek test edilmesi ekonomik ve pratik olmamakta, bu nedenle biriktirilerek toplu halde çalışılması yeğlenmektedir. Bu durum sonuçların alınmasını geciktirmektedir. KKA yönteminde ise kullanılan besiyeri plaklarda hazırlandığı için örneklerin tek tek çalışılması mümkün olmaktadır.

Diğer taraftan ST ve C yöntemlerinde 48 saatlik bir inkübasyon gerektiği halde KKA yönteminde sonuç 24 saat sonra alınabilmektedir. Ayrıca, tüpte yapılan ST ve C yöntemlerinde sonuçların okunması ve yorumlanması kişiden kişiye değişmekte ve farklı değerlendirmeler ortaya çıkabilmektedir. KKA yönteminin değerlendirilmesi koloni rengine göre yapıldığı için daha objektif ve

net bir değerlendirme yapılabilmekte, sonuçlar kişiden kişiye çok fazla değişmemektedir.

Bulgularımızın istatistiksel analizi Mc Nemar testi ile yapıldı. Sonuçta, KKA yönteminin ST yöntemine ($p < 0.05$) ve C yöntemine göre ($p < 0.01$); aynı şekilde ST yönteminin de C yöntemine göre ($p < 0.01$) daha duyarlı olduğu görüldü.

Çalışmamızın sonucunda, KNS'lerin oluşturduğu infeksiyonlarda diğer kriterlerle birlikte slime oluşumunun belirlenmesinin yararlı olacağı, bunun için de rutin laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek ve duyarlı bir yöntem olan KKA yönteminin kullanılabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WN, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997:539-76.
2. Davenport DS, Masanari KM, Pfaller MA, Bae MJ, Streed SA, Hierholzer WS. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically signifi-

- cant infections with coagulase negative staphylococci. J Infect Dis 1986;153:332.
3. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 1982;37:318-26.
 4. Noble MA, Grant SK, Hasen E. Characterization of a neutrophil inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. J Infect Dis 1990;162:909.
 5. Barcs I, Valyi-Nagy T, Panovics J. Clinical occurrence and virulence testing of coagulase negative staphylococci. Acta Microbiol Hung 1989;36:415-24.
 6. Freeman DJ, Falkiner FR, Reese CF. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42:472-8.
 7. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 9. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, 1995.
 8. Woznicova V, Votava M, Skalka B. Comparison of methods of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Cesk Epidemiol Microbiol Immunol 1993;42:51-3.
 9. Hilmioğlu S, İlkit M, Tünger A, Tümbay E. Koagülaz-negatif stafilokoklarda slime üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slime üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeks Derg 1999;13:203-7.
 10. Aydınlı A, Durmaz G, Akgün Y. Koagülaz-negatif stafilokoklarda slime faktör yapımının kongo kırmızılı agar yöntemi ile araştırılması. Flora 1997;1:41-4.
 11. Nourizadeh E, Sultan N. Koagülaz-negatif stafilokoklarda slime faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi. İnfeks Derg 1993;7:31-4.
 12. Gürdoğan K, Dizbay M, Aktaş F. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz-negatif stafilokoklarda slime üretiminin dört farklı yöntemle araştırılması ve slime yapımı ile antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi. Flora 1999;4:195-9.
 13. Aygen B, Sekman E, Sümerkan B, Doğanay M. Koagülaz-negatif stafilokoklarda slime yapımı ve adherens. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Program ve Özet Kitabı. Antalya, 1996:131.
 14. Kısa Ö, Baysallar M, Haznedaroğlu T ve ark. İdrardan izole edilen koagülaz-negatif stafilokokların tiplendirilmesi patojeniteleri ve antibiyotik duyarlılıkları. XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı 1994:8.
 15. Yazgı H, Ayyıldız A, Aktaş AE, Aktaş O, Yiğit N, Görgün S. Bölgemizde çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus* suşlarının "slime faktör" ve "protein A" yönünden incelenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1997;27:10-3.
 16. Fındık D, Tuncer İ, Kaloğlu G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve slime faktör üretiminin araştırılması. Mikrobiyol Bült 1996;30:19-24.
 17. Jones JW, Scott RJ, Morgan J. A Study of coagulase negative staphylococci with reference to slime production adherence antibiotic resistance patterns and clinical significance. J Hosp Infect 1992;22:217-27.
 18. Elçi S, Gül K, Özel F, Suay A, Mete Ö. Koagülaz-negatif stafilokoklarda makro ve mikro yöntemle slime oluşumunun saptanması ve antibiyotik direncinin araştırılması. İnfeks Derg 1996;10:203-6.
 19. Pfaller MA, Davenport DS, Bale M, et al. Development of the quantitative micro test for slime production by coagulase negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;7:30.

YAZIŞMA ADRESİ

Yrd. Doç. Dr. A. Esin AKTAŞ

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı

ERZURUM

Makalenin Geliş Tarihi: 08.05.2001 Kabul Tarihi: 11.06.2001