
Kan Kùltürlerinden İzole Edilen Koagùlaz Negatif Stafilokoklarda Slime Üretimini Dört Farklı Yöntemle Araştırılması ve Slime Yapımı ile Antimikrobiyal Duyarlılık İlişkisi

Kezban GÜRDOĞAN*, Murat DİZBAY*, Firdevs AKTAŞ*

* Gazi Üniversitesi Tıp Fakùltesi, Klinik Bakteriyojoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Kan kùltürlerinden izole edilen 100 koagùlaz negatif stafilokok (KNS) suşunda standart tüp, mikrodilüsyon plak, Christensen ve Kongo kırmızı agar yöntemi olmak üzere 4 ayrı yöntemle slime yapımı araştırılmıştır. Tüm yöntemlerin özgülüğü %100 iken, duyarlılıkları sırası ile Christensen yönteminde %96.8, standart tüp yönteminde %95, Kongo kırmızı agar yönteminde %92 bulunmuştur. Yöntemler arasında özgülük ve duyarlılık bakımından anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). 100 izolatin 63'ünde (%63) slime pozitifliği saptanmıştır. Slime pozitifliği ve antibiyotik direnci ilişkisini araştırmak üzere "slime" pozitif ve "slime" negatif suşlarda her antibiyotik için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyleri belirlenerek karşılaştırılmıştır. "Slime" pozitif grupta direnç oranları, "slime" negatif gruba göre yüksek saptanmış ancak, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Koagùlaz negatif stafilokok, Slime faktör, Antibiyotik direnci

SUMMARY

The Relationship Between Slime Positivity and Antimicrobial Sensitivity in Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures

In this study, the presence of slime factor in 100 coagulase negative staphylococci (CNS) isolated from blood cultures, was investigated by using standart tube, microdilution plate, Christensen and Congo red agar methods. Specificity of all the methods were 100% while sensitivity were as follows: Christensen method 96.8%, standart tube method 95% and Congo red agar method 92%. No statistically significant difference in sensitivity and specificity has been found between the methods ($p > 0.05$). In 63 of 100 isolates slime positivity was found. To investigate the relationship between the slime positivity and the antibiotic resistance, minimal inhibitory concentration (MIC) values of each antibiotic for slime positive and negative groups have been compared. Higher resistance rates were observed in slime positive group than that of slime negative group ($p > 0.05$).

Key Words: Coagulase negative staphylococci, Slime factor, Antimicrobial resistance

Deri ve mukozaların normal flora bakterileri olmaları nedeniyle kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokok (KNS)'ların hastalıkla ilişkisi ancak çeşitli klinik ve mikrobiyolojik kriterler dikkate alınarak doğrulanabilir. Mikroorganizmanın yabancı cisim yüzeylerine yapışmasında önemli rolü olan "slime" faktör yapımı ve antibiyotiklere dirençlilik mikrobiyolojik özelliklerden bazılarıdır^[1-3]. Bakteriler yabancı cisim üzerine yapıştıktan sonra bir virülans faktörü olduğu düşünülen "slime" maddesini üretmeye başlamaktadır^[4,5] ve bir süre sonra bol miktarda üretilen "slime" tabakası içine gömülmektedir^[5]. Bu durumda bu biyolojik ince tabaka, bakteriyi konağın hücrel ve humoral savunma mekanizmalarına karşı korumaktadır. Aynı zamanda bu biyolojik tabaka, içine gömülen KNS'leri bir diffüzyon bariyeri olarak antibiyotiklerin etkisinden korumaktadır^[4-6]. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarında "slime" faktörünün bulunma sıklığı ve bu faktörün gösterilmesinde çeşitli yöntemlerin kullanım kolaylığı ve duyarlılıkları incelenmiş, "slime" faktör oluşturma, metisilin direnci ve antimikrobiyal duyarlılık ile hastalık etkeni olma arasındaki ilişki araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda 1995-1996 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı'na gönderilen 100 hastanın kan kültürlerinden izole edilen 100 adet KNS izolatu kullanıldı. Mikroorganizmalar yatık agarda -20°C'de üç ayda bir seri pasajları yapılarak saklandı.

Kan kültürlerinde KNS üreyen hastalardan sepsis tanımına uygun klinik ve laboratuvar kriterleri taşıyanlar belirlendi. Bu amaçla Tablo 1'de belirtilen sınıflama parametreleri kullanıldı.

Tablo 1'de verilen kriterlerden en az ikisine sahip olan hastalar sepsis olarak tanımlandı (49 hasta). Bu

hastalardan izole edilen stafilokok suşları hastalık etkeni olan stafilokok grubu olarak değerlendirildi.

Bakterilerin "slime" faktör üretimi dört ayrı yöntemle araştırıldı.

1. Standart tüp yöntemi^[1]: Tüplere 5 mL Tryptic soy broth (TSB) (37g/L) konularak steril edildi. Bu besiyerlerine test bakterilerinden 2-3 koloni ekilerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Tüpler boşaltılarak %0.25'lik safranin her tüpe 2 mL konulup çalkalandı. Tüpler tekrar boşaltılıp, kurutularak okundu. Tüp çeperinde oluşan mor pembe halka koyuluk ve kalınlığına göre +, ++, +++ veya - olarak değerlendirildi.

2. Christensen metodu^[9]: Test tüplerine besiyeri ikiye 2 mL dağıtıldı ve boya olarak Trypan Blue kullanıldı. Sonuçlar tüp çeperinde oluşan mavi rengin koyuluk ve kalınlığına göre standart tüp yönteminde olduğu gibi değerlendirildi.

3. Mikrodilüsyon plak yöntemi^[1]: 30 g/L agarda hazırlanan triptik soy broth (TSB) tüplere dağıtılıp steril edildi ve bunlara test bakterileri ekildi. Bir gece inkübe edildikten sonra her tüp taze TSB ile 100 kere sulandırıldı ve her sulandırımından mikroplyet çukurcuklarına 0.2'şer mL dağıtıldı. 37°C'de 18 saat inkübasyondan sonra çukurcuklar boşaltılıp fosfat tamponu ile yıkandı, havada kurutularak fikse edildikten sonra %2'lik kristal viyole ile yıkandı. Çukurcukların optik dansiteleri (OD) 492 nm dalga boyunda okundu. OD₄₉₂ < 0.06 ise slime (-), OD₄₉₂ 0.06-0.02 ise slime zayıf pozitif (+), OD₄₉₂ > 0.2 ise slime faktör kuvvetli pozitif olarak değerlendirildi.

4. Kongo kırmızılı agar yöntemi^[10]: 10 g/L agar, 50 g/L sukroz, 37 g/L beyin kalp infüzyon broth ve 0.8 g/L Kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlanan besiyeri steril edildi ve plaklara döküldü. Stafilokok suşları tek koloni yöntemi ile plaklara eki-

Tablo 1. Sepsis kriterleri^[7,8]

	Bebek 0-1 yaş	Çocuk > 1 yaş-16 yaş	Yetişkin > 16 yaş
• Vücut ısı (rektal) °C	> 38 veya < 36	> 38 veya < 36	> 38 veya < 36
• Nabız hızı (N/dak)	> 160	> 150	> 90
• Solunum sayısı (SS/dak)	> 60	> 50	> 20
• Beyaz küre (mm ³)	> 12 000 veya < 4000, > %10 bant form	> 12 000 veya < 4000, > %10 bant form	> 12 000 veya < 4000, > %10 bant form

Tablo 2. Dört ayrı yöntem ile KNS suşlarında belirlenen slime oluşturma sıklığı

Yöntemler	Slime negatif		Slime pozitif			Toplam pozitif	% Pozitif
	(-)	(+)	(++)	(+++)			
• Standart tüp yöntemi	40	27	24	9		60	60
• Christensen yöntemi	39	31	22	8		61	61
• Mikrodilüsyon plak yöntemi	37	32	20	11		63	63
• Kongo kırmızılı agar yöntemi	42	58*				58	58
(+) Slime zayıf pozitif, (++) Slime orta kuvvetli pozitif, (+++) Slime kuvvetli pozitif.							
(*) Kongo kırmızılı agar yönteminde değerlendirme kalitatif olarak yapılmıştır.							

lip 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Siyah koloniler slime pozitif, pembe koloniler slime negatif olarak değerlendirildi.

Metisilin duyarlılığı disk diffüzyon yöntemi ile araştırıldı^[11]. Sefepim, imipenem, meropenem, sefuroksim, vankomisin, teikoplanin, ofloksasin, siprofloksasin, amikasin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) ve rifampini içeren 11 antibiyotik'in in vitro etkinliği NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) standartlarına uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile araştırılarak minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) saptandı^[12]. Kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

İstatistiksel yöntem: Analizler için EPI, INFO VERSION 6. 0 bilgisayar programından yararlanıldı. İstatistiksel değerlendirme için ki kare ve Fisher'in kesin ki kare testleri kullanıldı.

BULGULAR

Literatürde mikrodilüsyon plak yöntemi sonuçları (+), (++) olarak değerlendirilmektedir. Standart tüp ve Christensen yönteminde (+++) olarak değerlendirilen suşlar mikrodilüsyon plak yönteminde OD₄₉₂ > 0.5 olarak okundu. Bu nedenle mikrodilüsyon plak yönteminde de bu değerlere uygun olarak sonuçlar (+), (++) , (+++) olarak değerlendirildi.

Mikrodilüsyon plak yöntemi referans test olarak kullanılarak^[13] diğer üç yöntemin özgüllük ve duyarlılıkları hesaplandı. Tüm yöntemlerin özgüllüğü %100 iken, duyarlılıkları sırası ile; Christensen yönteminin %96.8, standart tüp yönteminin %95, Kongo kırmızılı agar yönteminin %92 bulundu. Ki kare yöntemi ile özgüllük ve duyarlılıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p > 0.05).

Bu çalışmada mikrodilüsyon yöntemiyle tesbit edilen zayıf pozitifliklerden ikisi Christensen yöntemi ile, üçü de standart tüp yöntemi ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Kongo kırmızılı agar yöntemi ile ise

mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan on pozitiflik saptanmamıştır.

Antimikrobiyal Duyarlılık

"Slime" pozitifliği ve antibiyotik direnci ilişkisini araştırmak üzere "slime" (+) ve "slime" (-) suşlarda her antibiyotik için MİK düzeyleri belirlenerek karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 2'de sunuldu.

Onbir antibiyotik için "slime" (+) grupta direnç oranları "slime" (-) gruba göre hafif yüksek saptanırken, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p > 0.05).

TARTIŞMA

Bu çalışmada standart tüp, Christensen, mikrodilüsyon plak ve Kongo kırmızılı agar yöntemleri kullanılarak KNS izolatlarında "slime" faktör araştırılmıştır. Yüz KNS suşunun standart tüp metodu ile % 60, Christensen metodu ile %61, mikrodilüsyon plak yöntemi ile %63, Kongo kırmızılı agar yöntemi ile %58'inin slime faktör ürettiği saptanmıştır. Bu dört yöntemle elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p > 0.05).

Çeşitli çalışmalarda mikrodilüsyon plak yönteminin en duyarlı yöntem olduğunun belirtilmesi nedeniyle^[14,15] bu yöntem referans test olarak kullanılarak, diğer 3 yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmıştır. Referans testten sonra en yüksek duyarlılık ve özgüllük Christensen yöntemi ile saptanmıştır.

Spektrofotometrik mikrodilüsyon metodunda zayıf pozitifliklerin objektif olarak değerlendirilmesi mümkün olduğundan, değerlendirme açısından üstünlük göstermektedir. Diğer tüp yöntemleri ise tamamen testi okuyanın yorumuna bağlı kalitatif testlerdir. Bu fark, özellikle zayıf pozitifliklerin değerlendirilmesinde önem kazanmaktadır. Ayrıca hem mikrodilüsyon plak hem de diğer tüp yöntemlerinde 48 saat gibi uzun bir sürede sonuç alınabilmektedir.

Tablo 3. Onbir antibiyotiğin “slime” (+) ve “slime” (-) suşlardaki direnç durumu

Antibiyotik	MİK aralığı mg/L	S	MİK ₅₀ mg/L	MİK ₉₀ mg/L	Direnç %	Direnç sınırı	P değerleri
• Sefepim	0.25 ≥ 32	+	1	32	14.2	≥ 32	p > 0.05
		-	1	8	5.4		(F)
• İmipenem	0.25-8	+	0.5	1	3.1	≥ 16	p > 0.05
		-	0.5	0.5	0		(F)
• Meropenem	0.25-≥ 16	+	1	16	15.8	≥ 16	p > 0.05
		-	0.5	16	10.8		
• Sefuroksim	0.5-32	+	8	32	30.1	≥ 32	p > 0.05
		-	8	32	29.7		
• Vankomisin	0.5-4	+	1	2	0	≥ 32	
		-	1	2	0		
• Teikoplanin	0.25-4	+	2	4	0	≥ 32	
		-	1	4	0		
• Ofloksasin	≤ 0.006-≥ 16	+	0.5	4	12.2	≥ 8	p > 0.05
		-	0.25	2	8.2		(F)
• Siprofloksasin	≤ 0.006-≥ 8	+	0.25	4	7.9	≥ 4	p > 0.05
		-	0.12	2	5.8		(F)
• Amikasin	≤ 0.5-≥ 64	+	1	32	14.70	≥ 64	p > 0.05
		-	1	32	13.5		
• TMP-SMX	0.12/2.35-4/76	+	0.5/9.5	2/38	7.9	≥ 4/76	p > 0.05
		-	0.5/9.5	1/19	5.4		(F)
• Rifampin	≤ 0.08-≥ 4	+	0.008	4	22	≥ 4	p > 0.05
		-	0.008	4	16.2		

F: Fisher, S: “Slime”.

Diğer testlerle kıyaslandığında Kongo kırmızılı agar yönteminin daha pratik, ekonomik ve daha kısa zamanda sonuç alınabilen bir yöntem olduğu bildirilmektedir^[10,14]. Nourizadeh^[14] kongo kırmızılı agar yöntemini, diğer yöntemlerle uyumlu ve güvenilir bir yöntem olarak bildirmiştir. Çalışmamızda da bu 4 yöntemle elde edilen “slime” pozitiflik yüzdele-ri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yöntemler arasındaki farklı sonuçlar daha çok zayıf slime üreten suşlarda görülmüştür. Ancak bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

“Slime” varlığı etkenin virülansını gösteren önemli bir parametre olduğuna göre, en uygun test yönteminin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bunun için rutin laboratuvar koşullarında yapılabilecek pratik, ekonomik ve kısa sürede sonuç alınabilecek bir yöntem ihtiyacı vardır. Çalışma sonuçlarımıza göre,

Kongo kırmızılı agar yöntemi rutin laboratuvar da kullanılabilecek en uygun test olarak görünmektedir.

Çeşitli çalışmalarda, KNS’lerde “slime” pozitifliğinin artan direnç ile korelasyon gösterdiği bildirilmiş, ayrıca “slime” faktörünün mikroorganizmaları çevreleyen bir bariyer oluşturarak bu yolla antibiyotiklere direnç geliştiği belirtilmiştir^[2,16,17]. Boussard ve arkadaşları^[16]’nın çalışmasında “slime” negatif KNS’lerin test edilen bütün antibiyotiklere duyarlı olduğu saptanırken, “slime” üreten KNS’lerin en az 7 antibiyotiğe direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Elçi ve arkadaşlarının^[2] çalışmasında da slime pozitif suşların, slime negatif suşlara oranla daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Kotilainen ve arkadaşlarının^[17] çalışmasında da slime üretimi ile gentamisin direnci arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak bu konuda çelişki doğuran çalışma sonuçları da bulunmaktadır. Jones ve arkadaşlarının^[18] ça-

ışmasında “slime” pozitif ve “slime” negatif KNS suşlarında metisiline direnç açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Yapılan başka çalışmalarda da “slime” üretimi ile antibiyotik direnci arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır^[19,20]. Steekelberg ve arkadaşlarının^[21] yaptığı bir deneysel endokardit çalışmasında ise slime üretiminin vankomisine tedavi yanıtını etkilemediği saptanmıştır.

Bu çalışmada “slime” pozitif ve negatif izolatlar arasında antimikrobiyal direnç ile ilgili bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak son zamanlarda bakterinin yabancı cisme yapışmasından hemen sonra kullanılan antibiyotikler için MİK değerlerinin aynı kalmasına karşın minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK)ların çok yükseldiği gösterilmiştir. Bu durumun, slime nedeniyle olabileceği düşünülmektedir^[22].

KAYNAKLAR

1. Barcs I, Valyi-Nagy T, Panovics J. Clinical occurrence and virulence testing of coagulase-negative staphylococci. Acta Microbiol Hung 1989;36:415-24.
2. Elçi S, Gül K, Özel F, Suay A, Mete Ö. Koagülaz-negatif stafilocoklarda makro ve mikro yöntemle “slime” oluşumunun saptanması ve antibiyotik direncinin araştırılması. Enfeksiyon Derg 1996;10:203-6.
3. Perdrey FS, Jansen B, Peters G, Pulverer G. Typing of coagulase negative staphylococci isolated from foreign body infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:270-3.
4. Goldman DA, Pier GB. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. Clin Microbiol Rev 1993;6:176-92.
5. Ludwicka A, Whenbruck G, Petters G, Seng PN, Gray ED, Jelja szewuicz J, Pul verer G. Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl Bakt Hyg A 1984;258:256-67.
6. Deighton MA, Balkau B. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. J Clin Microbiol 1990;28:2442-7.
7. Darville T, Giroir B, Jacobs R. The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Immunology and potential immunotherapy. Infection 1993;21:279-90.
8. Uzun Ö. Hastane enfeksiyonlarının tanımları. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 1997;8:20.
9. Christensen GO, Simpson A., Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 1982;7:318-26.
10. Freeman DJ, Falkiner FR, Reese CF. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42:472-8.
11. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 6th ed, Approved Standard. NCCLS document. M2-A6 (ISBN 1-56238-308-6) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898-1997.
12. NCCLS Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th Approved Standard, NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-562-38-309-4) NCCLS, 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1997.
13. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün G. Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yatan hastalardan izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılığı. Ankem Derg 1996; 10:48-51.
14. Nourizadeh E, Sultan N. Koagülaz-negatif stafilocoklarda slime faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi. Enfeksiyon Dergisi, 1993;7(1):31-4.
15. Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase negative staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:30-3.
16. Boussard P, Pithsy A, Devleeschouwer MU. Relationship between slime production, antibiotic sensitivity and the phage type of coagulase negative staphylococci: J Clin Pharm Therap 1993;18:271-4.
17. Kotilainen P, Nikoskelainen J, Houvinan P. Antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococcal blood isolates with special reference to adherent, slime-producing *Staphylococcus epidermidis* strains. Scand J Infect Dis 1991;23:325-32.
18. Jone SJW, Scott RJD, Morgan J, Pether JVS. 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.
19. Kropec A, Daschner F. In vitro activity of fleroxacin and 14 other antimicrobial against slime and non-slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. Chemotherapy 1989;35:351-4.
20. West TE, Walshe JJ, Kiol CP, Amsterdam D. Staphylococcal peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. J Clin Microbiol 1986;23:809-12.
21. Stellkelberg JM, Keating MR, Rouse MS, Wilson WR. Lack of extracellular slime effect on treatment outcome of *Staphylococcus epidermidis* experimental endocarditis. J Antimicrob Chemother 1989;23:117-21.
22. Ünal S, Akhan SA. Stafilocok Enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları Kitabı. 1. Baskı, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 1996:773-81.

Yazışma Adresi:

Dr. Kezban GÜRDOĞAN

Cemal Gürsel Cad.

Erdim Apt. 121/9

Cebeci - ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 26.12.1998

Kabul Tarihi: 25.05.1999