

STAFİLOKOK SUŞLARININ GAZ KROMATOĞRAFI METODUYLA TANIMLANMASI ve ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI¹

Ekrem KİREÇÇİ* Ayşe Esin AKTAŞ**

Yayın Kodu: 2005/10-A

Özet: Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocoklar gaz kromatografi metoduyla tanımlandı. Stafilocokların identifikasyonunda mikroskopik deneyler ve çeşitli biyokimyasal testlerin klasik olarak uygulanması yanında birçok basit ticari sistemler ortaya konmuştur. Bu sistemler fenotipik ya da genotipik karakterizasyon esasına göre uygulanmaktadır. Ticari olarak mevcut olan bilgisayar destekli Mikrobiyal İdentifikasyon Sistem (MİS), bakterilerin yağ asitlerini gaz kromatografi metoduyla analiz edilebilmektedir. Çalışmada 54 stafilocok izolatının identifikasyonu için MİS kullanıldı. İzole ve identifiye edilen stafilocok türlerinin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon metoduyla araştırıldı. Metsilin direnci koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilocoklarda sırası ile %47.0-%40.5 olarak bulundu. Metisiline dirençli stafilocok suşlarının, metisiline duyarlı stafilocok suşlarına göre antibiyotiklere daha dirençli oldukları saptandı. Suşların tamamı vankomisine ve teikoplanine duyarlı bulundu.

Anahtar sözcükler: Antibiyotiklere duyarlılık, MİS, *Staphylococcus*, yağ asit analizi.

Identification of Staphylococci by Gase Chromatography Method and Antibiotics Sensitivity of Strains

Summary: In this study, staphylococci isolated from various clinical specimens were identified by gase chromatography method. While the classical method of identifying staphylococci relies on microscopic examination followed by a variety of biochemical tests, a number of commercial systems have been introduced to simplify the procedure. These systems operate by either phenotypic or genotypic characterization. A commercially available, computer-assisted microbial identification system (MIS) employs gas-liquid chromatographic analyses of bacterial fatty acids. In this study, the MIS was used to identify 54 isolates of *Staphylococcus* species were tested. Sensitivities of strains isolated and identified were investigated to some antibiotics by disk diffusion method. Methicilline resistance were found to be 47.0% and 40.5% in coagulase positive and negative staphylococci, respectively. Methicillin-resistant *Staphylococcus* strains were found to be more resistant to other antibiotics than methicillin-sensitive *Staphylococcus* strains. All *Staphylococcus* strains were susceptible to vancomycine and teicoplanin.

Keywords: *Staphylococcus*, fatty acid analysis, MIS, antibiotics sensitivity.

GİRİŞ

Stafilocoklar, sistemik ve lokal bir çok enfeksiyona neden olan ve son yıllarda bazı antimikrobiale ajanlara dirençli hale gelmesi nedeniyle daha da önem kazanan bakterilerdir. Stafilocokların identifikasyonu için gerek manuel ve gerekse de otomatize birçok metod ticari olarak mevcuttur¹. Çalışmada stafilocokların identifikasyonunda, Microbial ID (MIDI, Newark, DE, USA) tarafından üretilen, Mikrobiyal İdentifikasyon Sistem (MİS)²'den yararlanıldı.

Sistem, türlere özgü olan yağ asit esterleri gibi bileşikler yüksek ayrıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MİS tam otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup, laboratuvarında izole edilen birçok mikroorganiz-

manın identifikasyonunda kullanılmaktadır^{2,3}.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 54 stafilocok suşunun MİS ile tür düzeyinde tanımlanması ve suşların antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Stafilocok suşları: Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesinde çeşitli servislerde yatan hastalardan laboratuvarımıza gönderilen 18'i kan, 12'si yara, 10'u idrar, yedisi vajen, dördü trakeal aspirat ve üçü boğaz kültüründen izole edilen ve enfeksiyon etkeni olabileceği düşünülen toplam 54 stafilocok suşu incelenmiştir. Stafilocoklar; koloni morfolojisi, gram boyama özelliği, katalaz testi, mannitol fermantasyonu, novobi-

¹ Araştırma daha önce XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster özet-metin olarak sunulmuştur (30 Eylül - 5 ekim 2004, Antalya)

* Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum-TÜRKİYE

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

ocin duyarlılığı ve koagülaz testleri ile tanımlanmıştır.

Kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 suşları kullanılmıştır.

MİS sistemi dört ana parçadan oluşan ve bilgisayar kontrolünde çalışan bir sistemdir. Bu ana parçalar; gaz kromatografisi, kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar sistemi ve database'den oluşmaktadır (Sherlock system software, library generation software, bakteri ve fungus için hazırlanmış kütüphaneler)^{2,3}.

Tanımlanması istenilen stafilocok izolatları kanlı agar besiyerinde saf kültür haline getirildikten sonra, yine plak kanlı agar besiyerine ekim yapılarak 37 °C de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Daha sonra stafilocokların yağ asit esterlerinin izolasyonu ve saflaştırılması için bir öze dolusu (yaklaşık 40 mg) izolat steril cam test tüpüne (5ml) aktarılarak ağız sıkıca kapatıldı. Daha sonra her bir test tüpüne 1ml çözelti 1 eklendi, 5-10 saniye çalkalandı ve 25 dakika süre ile 100 °C' lik sıcak su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bu işlem ile canlı hücreler parçalanıp yağ asitlerinin serbest kalması sağlandı.

İkinci basamakta test tüplerine 2 ml çözelti 2 eklenerek, 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 80 °C'de 10 dakika bekletildi ve hemen iki dakika kadar buz içerisinde tutuldu. Metilasyon basamağı olarak bilinen bu safhada serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil lenmekte ve yağ asitlerinden yağ asit esterleri oluşmaktadır. Böylece yağ asit esterleri yüksek sıcaklıkta uçuculuk özelliği kazanmaktadır.

Üçüncü basamakta soğutulmuş tüplere 1.25 ml çözelti 3 eklenerek 10 dakika çalkalandı. Bu süre sonunda tüplerde iki faz oluştu. Alt fazda asidik, üstte organik sıvı faz oluşup pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde asidik faz atıldı.

En son aşamada her tüpe 3 ml çözelti 4 eklendi. Tüpler beş dakika çalkalanarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bazik yıkama denilen bu safhada yağ asit esterleri daha saf olarak elde edildi. Bekleme sonunda tüplerde oluşan iki fazın üstte kalanı yağ asitlerinin saf metil esterleri olup bu alandan pastör pipeti

ile 2ml gaz kromatografisi tüplerine transfer edildi. Ağızları sıkıca kapatılarak MİS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Sistem kılavuzuna uygun şekilde tek tek analiz edildi ve CLIN40 kütüphanelerine göre sonuçları alındı^{2,4}.

Çözelti 1: Saponifikasyon (Hücre parçalayıcı)

NaOH	45 gr
Metil alkol	150 ml
Saf su	150 ml

Çözelti 2: Metilasyon

HCl ₂	325 ml
Metil alkol	275 ml

Çözelti 3: Ekstraksiyon (Saflaştırma)

Hekzan	200 ml
Meti-tert-butil eter	200 ml

Çözelti 4: Bazik yıkama

NaOH	10.8 gr
Saf su	900 ml

Duyarlılık testleri, tanımlanan bakterilerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları National Committee For Clinical Labotary Standars (NCCLS) kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılıp değerlendirilmiştir⁵.

BULGULAR

İzole edilen toplam 54 stafilocok suşunun 17' si *S.aureus*, 23'ü *S.epidermidis*, 3' ü *S.hominis*, 3'ü *S.ureolyticus*, 3'ü *S.warneri*, 1' i *S.kloosii*, 1' i *S.saprophyticus*, 1' i *S.simulans*, 1'i *S.arlettae*, 1' i *S.haemolyticus*, 1' i *S.capitis* şeklinde MİS ile tiplendirildi. *S.aureus* ve KNS'nin sırası ile penisiline % 0 - % 72.9, seftazidime %5.8-%64.8,ampisilin-sulbaktama % 41.1 - % 94.5 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Metsilin direnci koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilocoklarda sırası ile % 47.0 - % 40.5 olarak bulunmuştur. Metisiline dirençli stafilocok suşlarının, metisiline duyarlı stafilocok suşlarına göre antibiyotiklere daha dirençli oldukları saptanmıştır. Suşların tamamı vankomisine ve teikoplanine duyarlı bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. İdentifiye edilen stafilocok türlerinin MİS ve antibiyotik duyarlılık sonuçları .
Table 1. Staphylococcus species identified the results of MIS and antibiotic sensitivity.

MIS İle tanımlanan suşlar (sayı)	Penisilin		Sefazolin		Oxacillin		Amp./Sulb		Vankomisin		Teikoplanin	
	S*	R*	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>S. aureus</i> (17)	-	17	1	16	8	9	7	10	17	-	17	-
<i>S. epidermidis</i> (23)	15	8	13	10	2	21	21	2	23	-	23	-
<i>S. hominis</i> (3)	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-
<i>S. ureolyticus</i> (3)	3	-	1	2	3	-	3	-	3	-	3	-
<i>S. warneri</i> (2)	1	1	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-
<i>S. kloosii</i> (1)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>S.saprophyticus</i> (1)	-	1	-	1	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>S. simulans</i> (1)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>S. arlettae</i> (1)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>S.haemolyticus</i> (1)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
<i>S. capitis</i> (1)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-

S*: Sensitiv R*: Rezistan

TARTIŞMA ve SONUÇ

Stafilokokların tür düzeyinde tanımlanması için klasik yöntemlerin yanısıra Mikrobiyal identifikasyon sistem gibi alternatif yöntemler de mevcuttur. MİS, stafilokokları aynı gün tür düzeyinde tanımlama olanağı vermektedir⁶.

Stoakes ve ark.⁶ MİS'i, konvansiyonel ve diğer ticari tekniklerle (API Staph-Ident, DMS Staph-Trac, Minitek, Pos ID panel) karşılaştırmışlar, bu yöntem ile 470 stafilokok suşunun 413 (%87.8)'ünü doğru olarak isimlendirirken, 57 suşu ise isimlendirememişlerdir. Aynı çalışmada MİS'in stafilokokların identifikasyonunda performansı yüksek alternatif bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Yine bir çalışmada Kotilainen ve ark.⁷ koagülaz negatif suşlardan *S.capitis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri* ve *S.lugdunensis*'i MİS ile isimlendirmişlerdir.

Behme ve ark.⁸, stafilokokların tanımlanmasında biyokimyasal testler ile yağ asiti analizine dayanan MİS'i karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında her iki yöntemle de 35 stafilokok suşunun hepsini tanımlamışlardır. Araştırmacılar, tanıda yağ asit analizinin yanısıra biyokimyasal test verilerinin de kullanıldığında, her iki yöntemin birbirini destekleyici pratik bir sistem olabileceğini belirtmişlerdir⁸. Yapılan bu çalışmada suşların tiplendirilmesinde biyokimyasal testler ile MİS karşılaştırılmamıştır. Ancak suşların ilk izolasyonunda, koagülaz, mannitol fermentasyonu ve novobiocin duyarlılığı gibi konvansiyonel testlerle MİS identifikasyon sonuçları arasında paralellik görülmüştür.

Stafilokoklarda 1950'li yıllarda penisilin yanısıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanımda olan diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir. Çetinkaya ve Ünal⁹,1970'li yıllardan itibaren metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarının yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe dirençli hale gelmeye başladığını belirtmişlerdir.

Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda, metisilin direnci *S.aureus* suşlarında %43 ile %65 arasında, KNS'larda %44 ve %57 arasındaki oranlarda tespit edilmiştir¹⁰⁻¹⁵. Avrupa'da hastane enfeksiyonlarına yönelik bir prevalans çalışmasında, 10 ülkede toplam 43 labotatuvarından gönderilen 7333 izolatın %12.8'nin metisiline dirençli olduğu bildirilmiştir¹⁶. Bu çalışmada *S.aureus* suşlarının %47'si, KNS'lerinde %40.5'i metisiline dirençli bulunmuştur. Araştırmamızda stafilokok suşlarında metisiline dirençlilik oranının, Avrupa'da elde edilen oranlardan yüksek olduğu, ancak Türkiye'de yapılan çalışmalara paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Stafilokok suşlarının hiçbirinde vankomisin ve teikoplanin direnci saptanamazken, *S.aureus* suşlarında penisilin, sefazolin, oxacillin ve amp./sulb.'a yüksek oranda direnç saptanmıştır.

Sonuç olarak MİS'in tanıda kullanıldığı çalışmamızda bu yöntemin klasik yöntemlerden daha hızlı ve oldukça güvenilir sonuç vermesi nedeniyle tanıda yardımcı bir yöntem olabileceği, ancak diğer identifikasyon teknikleri ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 **Murray P, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA:** Medical Microbiology. 3th Ed Mosby Co, New York. 175-180, 1998.
- 2 **Onderdonk, AB, Sasser, M:** Gas-liquid and high-performance liquid chromatographic methods for the identification of microorganisms. "E.J. Baron, P.R. Murray, M.A. Pfaller, F.C. Tenovar, R.H. Yolken. In Manual of Clinical Microbiology", 6th by Washington D.C. 123-129, 1995.
- 3 **Miller I, Berger T:** Bacteria identification by gase chromatography of whole cell fatty acids. Hawlett-Packard gase chromatography application note, Hawlett-Packard Co., Alto, CA, 8, 1985.
- 4 **Buyer, SJ:** Identification of bacteria from single colonies by fatty acid ananlysis. *J Mic Meth*, 48, 259-265, 2002.
- 5 **National Committee For Clinical Labotaory Standars:** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9, Wayne, Pennsylvania USA, 1999.
- 6 **Stoakes L, John AM, Lannigan R, Ramos M:** Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J Clin Mic*, 32 (8), 1908-1910, 1994.
- 7 **Kotilainen P, Huovinen P, Eerola E:** Application of gas-liquid chromatograph analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negatif staphylococci. *J Clin Mic*, 29,315-322, 1991.
- 8 **Behme RJ, Shuttleworth R, McNab, A, Colby WD:** Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *J Clin Mic*, 34, 3075-3084, 1996.
- 9 **Çetinkaya Y, Ünal S:** Metisilin dirençli S.aureus infeksiyonları: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora Derg*, Ek. 1(3), 3-16, 1996.
- 10 **Arslan H, Tunçbilek S, Nazher S:** Nozokomiyal infeksiyonu olarak izole edilen stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklerin in vitro etkinliği. *İnfeksiyon Derg*, 12, 347,1998.
- 11 **Değerli K, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Sezgin C, Kurutepe S:** Klinik örneklerden soyutlanan Staphylococcus aureus suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg*, 14, 87, 2000.
- 12 **Özgünç D, Vural T, Çolak T, Gültekin M, Mutlu G:** Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok suşlarının antibiyotiklere direnç özellikleri. *İnfeksiyon Derg*, 12,157, 1998.
- 13 **Songür M, Sayan M, Yüce A, Yuluğ N:** Staphylococcus aureus'a karşı vankomisin ve trimetoprim-sulfametoksazol etkinliğinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg*, 12, 39, 1998.
- 14 **Türk Arıbaş E, Özcan M, Altındış M:** Klinik örneklerden izole edilen stafilokokların antibiyotik direnç oranları. *İnfeksiyon Derg*, 15, 73, 2001.
- 15 **Vardar Ünlü G, Ünlü M:** Yara örneklerinden soyutlanan Staphylococcus aureus kökenlerinin glikopeptid antibiyotiklere duyarlılığı. *İnfeksiyon Derg*, 15, 239, 2001.
- 16 **Voss A, Milatovic D, Roshdal VT, Braney I:** Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, *J Clin Mic Infect Dis*, 13, 50-55, 1994.

Yazışma adresi (Correspondence address)

Yrd.Doç.Dr. Ekrem KİREÇÇİ
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 25700 Ilıca/Erzurum-TÜRKİYE
Tel: 05357121284, 05433552834
e-mail:mikrobiyoloji2004 @superposta.com om