

HASTA REFAKATÇİLERİ VE ZİYARETÇİLERİNDEN ELDE EDİLEN KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARDA METİSİLİNE DİRENÇ VE BUNUN SLAYM FAKTÖR ÜRETİMİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

A.Serda KANTARCIOĞLU, Ayhan YÜCEL

ÖZET

Hastanede çalışmayan fakat hastalarla yakın ilişkide bulunan hasta refakatçi ve ziyaretçilerinden elde edilen koagülaz negatif stafilocoklarda (KNS) metisilin direnci ve bunun slaym (slime) üretimi ile ilişkisi araştırılmıştır. Yüzkırk kişinin el ve burnundan alınan toplam 280 örnekten 137 KNS kökeni ayrılmıştır. Kongo kırmızılı agar yöntemi ile 137 kökenin 66 (% 48)'sı slaym pozitif ve disk difüzyon yöntemi ile 43 (% 31)'ü metisiline dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli kökenlerin otuzsekizi (% 88) slaym üretmiş, metisiline duyarlı 94 suşta bu sayı 28 (% 30) olarak saptanmıştır. Dirençli kökenler içinde slaym pozitifliğinin anlamlı derecede daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

Hastalarla yakın ilişki içinde bulunabilen refakatçiler ve ziyaretçilerden elde edilen kökenlerde belirlendiğimiz oksasiline direnç insidensi ve slaym pozitifliği epidemiyolojik olarak kayda değer görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Koagülaz negatif stafilocoklar, metisilin direnci, slaym faktörü, hasta refakatçileri, hasta ziyaretçileri

SUMMARY

Investigation of methicillin resistance and its relationship with slime factor in coagulase-negative staphylococci isolated from patients' helpers and visitors.

Methicillin-resistance and slime production were investigated in coagulase-negative staphylococci isolated from patients' accomplices and visitors who are close with them but do not work in the hospital.

A total of 137 strains were isolated from 280 hand and nose cultures of 140 individuals. Using Congo red agar method, slime factor was found positive in 66 (48%) of the isolates. Fortythree (31%) strains showed resistance to methicillin by disk diffusion method. Of these 38 (88%) produced slime while this number was only 28 (30%) in 94 methicillin-sensitive strains ($p<0.05$).

The incidence of resistance to oxacillin and slime positivity detected in the strains from patients' accomplices and visitors was found epidemiologically significant.

Key words: Coagulase negative staphylococci, methicillin-resistance, slime factor, patients' helpers, visitors

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilocoklar (KNS), insan deri ve mukozaları başta olmak üzere birçok vücut bölgesinde normal flora üyesi olarak bulunan Gram pozitif bakterilerdir ve doğal yaşam ortamları olan insan derisinden tam olarak uzaklaştırılmaları güçtür. Ayrıca hastane ortamında ve çevrede de bulunabilirler. Ancak bağışıklık sisteminin doğuştan baskılandığı veya sonradan herhangi bir sebeple vücut direncinin çok azaldığı hallerde fırsatçı patojen olarak çeşitli infeksiyonlara yol açabilirler. İntravenöz kateter, merkez sinir sistemi şantı ile kalp kapağı ve benzeri protez implantlarda infeksiyonlara sebep olabildikleri gibi periton diyalizi yapılan böbrek yetmezlikli olgulardaki peritonitin de başlıca etkenidirler ve bakteriyemi olgularında da sıklıkla karşılaşılan pa-

tojenler arasında bulunmaktadır (6, 24).

Bu infeksiyonların patogenezinde, stafilocokların yabancı cisimlerin yüzeylerine yapışma ve bunun sonunda bu yüzeylerde biyofilm oluşturma yetenekleri rol oynamaktadır. Yabancı cisimlere yapışan fibrinojen, fibronektin gibi konak proteinleriyle üreyen stafilocokların mukoz bir madde üreterek içine gömüldükleri ve böylece oluşan kalın biyofilm tabakalarının bakteriyi kemoterapötiklerin etkisinden ve bağışıklık sisteminin humoral ve hücrel mekanizmalarından koruduğu; böyle bir odaktan kana karışan bakterilerin septemi tabloları oluşturabildiği ortaya konmuştur (1, 15). İn-vivo ve in-vitro çalışmalarda KNS'ların bir kısmının slaym (slime) denilen bu ekstraselüler maddeyi oluşturdukları göz-

*12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases'de sunulmak üzere kabul edilmiştir (24-27 Nisan 2002, Milan).
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

terilmiştir. Slaym yapımı önemli bir virulans faktörü olarak kabul edilmekte ve koagülaz negatif stafilocoklarla oluşan klinik olarak anlamlı infeksiyonları belirleyici olduğu düşünülmektedir (14, 21). Diğer yandan, slaym faktör oluşumu ile metisiline direnç birlikte gözlenebilmekte ve metisiline dirençli stafilocoklar diğer birçok antibiyotiğe de direnç gösterirken, bağışıklığı bozuk hastalarda giderek daha sıklıkla karşılaşılmaktadır.

Bu infeksiyonların çoğunluğunda bulaşma hastaların kendi derisi veya hastane personelinin deri ve burun florasindeki stafilocoklarla olduğu belirtilmiştir (27). Bu çalışmada risk grubu hastaların bulunduğu birimlerde hasta ile yakın temasta olan refakatçi ve ziyaretçilerin el ve burun sürüntülerinden ayrılan KNS'larda metisiline direnç ve bunun slaym üretimi ile ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

KNS kökenleri: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde risk grubu hastaların bulunduğu onkoloji, hematoloji, çocuk hematoloji, yeni doğan ve yoğun bakım gibi birimlerdeki hastaların refakatçi ve ziyaretçilerinin el ve burun sürüntülerinden ayrılmıştır. Bütün kökenler Gram pozitif, koagülaz negatif ve katalaz pozitif küme oluşturan koklar olarak tanımlanmıştır.

Metisilin direnci (Oksasilin direnci): NCCLS önerilerine göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kökenlerden 0.5 McFarland bulanıklık standardına uygun (10^8 bakteri/ml) olarak steril serum fizyolojik içinde süspan-siyonlar hazırlanıp % 4 NaCl içeren Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyerine ekilmiştir. 1 µg oksasilin (Oxoid) diski konularak 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 11

mm'nin altında zon çapı oluşturanlar dirençli kabul edilmiştir. Kontrol kökeni olarak liyofilize halde sağladığımız ve oksasilin için inhibisyon zon çapları bilinen *S.aureus* ATCC 25923 standart kökeni kullanılmıştır (19).

Ayrılan KNS kökenlerinin slaym yapma özellikleri Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 10 g agar, 50 g sukroz, 37 g Brain Hearth Infusion Broth ve 0.8 g Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 37°C'de bir gece inkübe edilmiş, koyu kırmızı-siyah koloni oluşturan kökenler slaym pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise slaym negatif olarak değerlendirilmiştir (11,26).

BULGULAR

Çalışmaya (106 kadın, 34 erkek, yaş aralığı 19-73, ortalama yaş 46) toplam 140 kişinin burun ve el örneklerinden oluşan 280 örnek alınmıştır. Burun örneklerinin 46 (% 33)'sından ve el örneklerinin 91 (% 65)'inden, toplam 280 örneğin 137 (% 49)'sinden KNS ayrılmıştır. Kökenlerin 79 (% 58)'u hasta refakatçilerinden (burun örneklerinden 29, el örneklerinden 50) ve 58 (% 42)'i ziyaretçilerinden (burun örneklerinden 17, el örneklerinden 41) elde edilmiştir.

Ayrılan 137 KNS kökeninin 66 (% 48)'sı slaym pozitif,

71 (% 52)'i slaym negatif; 43 (% 31)'ü metisiline dirençli, 94 (% 69)'ü metisiline duyarlı bulunmuştur. Slaym pozitif 66 kökenden 38 (% 58)'i, slaym negatif 71 kökenden ise sadece 5 (% 7)'i metisiline dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli 43 kökenden 38 (% 88)'i slaym oluşturunca, metisiline duyarlı 94 kökenin 28 (% 30)'i slaym oluşturmuştur (Tablo). Bu sonuçlarla metisilin direnci ile slaym oluşturma arasında istatistik olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ($p<0.05$).

Tablo. 137 KNS kökeninde metisilin direnci ve slaym oluşturma.

	Metisilin direnci		Toplam
	+	-	
Slaym pozitif	38	28	66
Slaym negatif	5	66	71
Toplam	43	94	137

TARTIŞMA

İnsanın deri ve mukoza zarlarının normal flora üyesi olan ve eskiden patojen olarak düşünülmemen KNS'lar son yıllarda başta sepsis ve bakteriyemiler olmak üzere, nozokomiyal infeksiyonların en önemli etkenleri arasına girmiştir. ABD'de yapılan ve 1980-1989 yıllarını kapsayan bir çalışmada nozokomiyal bakteriyemilerde KNS sıklığının % 9'dan % 27'ye ve metisiline dirençli KNS sıklığının da % 20'den % 60'a yükseldiği bildirilmektedir (23). KNS'larda antibiyotik direnci ile slaym yapımı arasında yakın bir ilişki olduğu da bildirilmiş (4, 15); ayrıca direnç gelişimi ile nozokomiyal infeksiyon sıklığındaki artış arasında bir paralellik olduğu gösterilmiştir (23).

İntravasküler yol aracılığıyla tedavi uygulanan hastalarda infeksiyon etkenlerinin damar sistemi içine girebileceği bir giriş kapısı da açılmış olmaktadır. İnert yüzeylere uyum sağlayarak yaşayabilen ve antibiyotiklerin kendisine ulaşmasını engelleyebilen KNS'lar kateter infeksiyonlarında en sık karşılaşılan fırsatçı patojenlerdir. KNS'ların ürettikleri hücre dışı yapışkan bu yapı onların yabancı yüzeylere adansını, konağın savunma mekanizmalarından ve antibiyotiklerden korunmalarını sağlamaktadır. Ancak tüm KNS'lar önemli hastalıkların sorumlusu olmadığından patojen olan ve olmayanlar arasındaki ayırım önem kazanmaktadır. Slaym yapan KNS'ların hastalık oluşturma potenslerinin daha yüksek ve tedavisinin zor olduğu vurgulanmaktadır. Patojen KNS'ları ayırtmakta kullanılabilecek en önemli parametrenin slaym oluşturma olduğu bildirilmektedir (9, 12, 16, 17). Kan kültürlerinden ayrılan KNS'ların klinik öneminin araştırıldığı bir çalışmada slaym pozitifliğin KNS sepsislerinin kontaminasyondan ayrılmasında önemli olduğu öne sürülmüştür (17).

Slaym faktör oluşumunu saptamak için makrotüp, mikropleyt ve Kongo kırmızısı besiyeri gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır ve genelde bu yöntemlerin birbirleriyle uyumlu ve güvenilir olduğu bildirilmektedir (7, 8, 17, 20). Çalışmamızda sağlam görümlü ve hastalarla yakın ilişkisi bulunan taşıyıcılardan ayrılan KNS'larda bu virulans faktörüne sahip potansiyel patojen olanların bulunma oranının araştırılması amaçlandığından; önceki çalışmalarda yöntemler arasında anlamlı farklılık bulunmamış olması da dikkate alınarak Kongo kırmızılı agar yöntemi ile çalışılmıştır. Kongo kırmızılı agar yöntemi pratikliği ve güvenilirliği sebebiyle seçilmiştir (20, 22, 26).

KNS'larda slaym yapımı gerçek bir patojenlik kriteri sa-

yılmaktadır. Çünkü, bu faktör plastik ve metal yüzeylere yapışmayı (adherensi) sağlayan, bakterileri fagositozdan koruyan, antibakteriyel maddelerin bakteri hücresi içine girişini engelleyen ekstraselüler bir polisakkarittir (9, 18, 23). İntravenöz kateterlerden ayrılarak hastalık etkeni olarak tanımlanan KNS'lar ile kontaminant KNS'lar arasında slaym faktör oluşturmaları yönünden anlamlı istatistiksel fark bulunduğu bildirilmiştir (16). Serebrospinal şantlarla yapılan bir çalışmada 85 KNS elde edilmiş, bunların 51'i patojen, 34'ü kontaminant olarak değerlendirilmiş ve bu iki gruptaki bakterilerin slaym oluşturmaları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (27). Kan, yara ve yenidoğan göbek kültürlerinde yüksek slaym pozitifliği belirlenmiş olan bir çalışmada stafilokok kökenlerinde belirlenen slaym faktör sıklığı ile infeksiyon oluşturma sıklığı arasında bir korelasyon bulunmuştur (20). Hastalar dışındaki taşıyıcılarla yapılan çalışmalar incelendiğinde, cerrahi yoğun bakım ünitelerindeki 190 tıbbi personelin burun boşluklarında patojen stafilokokları arayan Bal ve ark. (3) *S.epidermidis* kökenlerinin % 72.2'sinde slaym üretimi gözlemişlerdir. Çalışmamızda hastanede çalışmayan fakat hastalarla yakın ilişkide bulunan refakatçi ve ziyaretçilerden ayrılan kökenler arasında bu virulans faktörüne sahip suşlar % 48 (66/137) oranında bulunmuştur.

Diğer yandan; yurt dışında (4, 5, 25) ve içinde (2, 10, 13) yapılan bir kısım çalışmalarda metisilin direnci ile slaym faktör yapımının birlikte gözlemlendiği ve slaym pozitif KNS suşlarında metisilin direncinin slaym negatif suşlara göre daha fazla olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda ise hasta refakatçileri ve ziyaretçilerinin el ve burun sürüntülerinden ayırdığımız KNS'larda metisiline direnç oranı % 31, slaym üretim oranı % 48 olup dirençli kökenlerin % 88'inin slaym pozitif olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda hasta refakatçileri ve ziyaretçilerinin el ve burun sürüntülerinden ayırdığımız metisiline dirençli KNS suşlarında slaym faktör pozitifliğinin belirgin olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçları, nozokomiyal infeksiyon etkenlerinin antibiyotiklere direnç gösterebilmesi, artan tedavi maliyetleri ve mortalite oranları gibi birçok yönlerden önem kazandığı günümüzde yalnız hastane ortamı ve personelinin değil hasta ile yakın ilişkide bulunan diğer kişilerin de bu fırsatçı patojen bakterilerin bulaşmasında rol oynayabileceklerini ve bu durumun dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Ammendolia MG, Di Rosa G, Montanaro L, Arciola C R, Baldassari L: Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates, *J Clin Microbiol* 37: 3235 (1999).
- 2- Arda B, Ulusoy S, Yapar N, Özinel MA: Koagülaz negatif stafilokoklarda slime faktörünün ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Özet Kitabı* 01.18, Antalya (1998).
- 3- Bal Ç, Aydın M D, Anğ Ö: Tıp personelinde stafilokok kolonizasyonu, *İnfeksiyon Derg* 11:237 (1997).
- 4- Baussard P, Pithsy A, Devleeschowwer M J: Relationship between slime production, antibiotic sensitivity and the phagotype of coagulase-negative staphylococci, *J Clin Pharm Ther* 18:271 (1993).
- 5- Chisena S, Marconato R, Cantoni G, Zappa M, Inzaghi A, Pargiklian I, Mas Ranzi ML, Longo T: Importance of Staphylococcus epidermidis in the bacterial colonization of abdominal drains in surgical patients, *Minerva Chir* 46:269 (1991).
- 6- Christensen GD, Baddour LM, Madison BM, Parisi JT, Abraham WA: Colonial morphology of staphylococci on memphis agar. Phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics and virulence, *J Infect Dis* 161:1153 (1990).
- 7- Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey ED: Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol* 18:258 (1983).
- 8- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices, *J Clin Microbiol* 22:996 (1985).
- 9- Davenport DS, Massanari RM, Pfaller MA, Bale MJ, Streed SA, Hierhold W J Jr: Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci, *J Infect Dis* 153:332 (1986).
- 10- Elçi S, Gül K, Ögel F, Suay A, Mete Ö: Koagülaz negatif stafilokoklarda slime oluşumunun ve antibiyotik direncinin saptanması, *İnfeksiyon Derg* 10:203 (1996).
- 11- Freeman DJ, Falkiner FR, Reane CT: New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci, *J Clin Pathol* 42:872 (1989).
- 12- Gürdoğan K, Aktaş F, Dizbay M: Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz-negatif stafilokokların klinik önemini değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Derg* 3:393 (2000).
- 13- 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* 4:195 (1999).
- 14- Hogt AH, Dankert J, de Vries JA, Feijen J: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials, *J Gen Microbiol* 129:2959 (1983).
- 15- Houssain M, Wilcox M H, White P J: The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence, *FEMS-Microbiol Rev* 10:191 (1993).
- 16- Ishak MA, Gröschel DHM, Mandell GL, Wenzel RP: Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia, *J Clin Microbiol* 22:1025 (1985).
- 17- Kiraz N: Koagülaz negatif stafilokokların "slime" oluşturmaları ve bazı antibiyotiklerin "slime" oluşumuna etkileri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 4:219 (1993).
- 18- Kotilainen P: Association of coagulase-negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias, *J Clin Microbiol* 28:2779 (1990).
- 19- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6th ed, Approved Standard, Document M2-A5, NCCLS, Villanova, Pa (1997).
- 20- Nourizadeh E, Sultan N: Koagülaz-negatif stafilokoklarda slaym (slime) faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi, *İnfeksiyon Derg* 7:31 (1993).
- 21- Peters G, Locci R, Pulverer G: Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters, *J Infect Dis* 146:479 (1982).
- 22- Ruben FL, Norden CW: Staphylococcus infections, "Evans AS, Brachman PS (eds): *Bacterial Infections of Humans. Epidemiology and Control*" kitabında s. 621, Plenum Medical Book Co., New York (1991).
- 23- Rupp M E, Archer GL: Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress, *Clin Infect Dis* 19: 231 (1994).
- 24- Sewell CM, Lacke C, Weinman ES, Young ED: Staphylococcal nasal carriage and subsequent infection in peritoneal dialysis patients, *JAMA* 248:1493 (1982).
- 25- Steer JA, Hill GB, Srinivasan S, Southern J, Wilson APR: Slime production, adherence and hydrophobicity in coagulase-negative staphylococci causing peritonitis in peritoneal dialysis, *J Hosp Infect* 37:305 (1997).
- 26- Woznicova V, Votava M, Skaika B: Comparison of 2 methods of detecting slime production by coagulase-negative staphylococci, *Cesk Epidemiol Microbiol Immunol* 42:51 (1993).
- 27- Younger JJ, Christensen GD, Bartley DL, Simmons JCH, Barrett F: Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: Importance of slime production, species identification and shunt removal to clinical outcome, *J Infect Dis* 156:548 (1987).