

GENTAMİSİNE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA GENTAMİSİNİN BİYOFİLM VE KOAGÜLAZ OLUŞUMUNA ETKİSİ*

Vahide BAYRAKAL*, Yavuz DOĞAN**, Hüseyin BASKIN**, İ.Hakkı BAHAR**

* Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İZMİR

** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İZMİR

ÖZET

Klinikte önemli patolojilere neden olabilen *Staphylococcus aureus*'un patojenitesinde biyofilm ve plazma koagülaz enzimi oluşturma da önemi vardır. Bu çalışmada kateter ucundan ayrıştırılmış bir klinik suş (KSA) ile standart bir ATCC 25923 suşunun (SSA), gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunluk (MİK) altındaki ve üstündeki yoğunluklarda biyofilm ve bağlı ve serbest koagülaz oluşturma özellikleri karşılaştırılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile gentamisin MİK değerleri KSA suşu için 4 µg/mL, SSA suşu için MİK 0.125 µg/mL olarak belirlenmiştir. Kristal viyole yöntemi ile belirlenen biyofilm oluşumunun ve lamda belirlenen bağlı koagülaz testinin iki suş için de MİK ve altındaki gentamisin yoğunluklarında inhibe edilmediği, MİK üstündeki yoğunluklarda ise inhibe edildiği saptanmıştır. Tüpte serbest koagülaz testinde ise ilk 2 saatte iki suşta da ancak belirli MİK altındaki yoğunluklarda inhibisyon görüldüğü, 4 ve 24 saatte KSA suşunda 2xMİK'de bile inhibisyon olmamıştır. Bu sonuçlara göre; her iki suşta da biyofilm oluşumunu başlatan genetik ekspresyonun, gentamisin MİK yoğunluğunda bile pozitif bulunmasının klinikteki uygulamalarda dikkat edilmesi gereken bir özellik olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: biyofilm, koagülaz, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

The Effect of Gentamicin on Biofilm Formation and Coagulase Activity in Gentamicin Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains

Staphylococcus aureus is an important pathogen which can cause severe pathologies in clinical practice. The formations of biofilm and coagulase enzyme are important factors of its pathogenesis. In this study, biofilm formation and coagulase activity of a clinical strain (KSA) isolated from catheter and standart ATCC 25923 strain (SSA) were investigated in above and below minimum inhibitor concentrations (MIC) of gentamicin. The MIC values of gentamicin by microdilution method were found to be 4 µg/ mL for KSA strain and 0.125 µg/ mL for SSA strain. Biofilm formations detected by crystal violet method and slide (bound) coagulase tests were not inhibited in both strains by MIC and sub-MIC gentamicin concentrations. On the other hand, at concentrations above the MIC values these two assays were inhibited. Tube (free) coagulase assay was inhibited at certain sub-MIC concentration at the first two hours, but it was not inhibited at 4 and 24 hours in even 2xMIC concentration. As a result, the genetic expression of biofilm formation even at MIC concentrations seems to be important in clinical practice.

Keywords: biofilm, coagulase, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Mukozalı yüzeylerin normal floralarında bulunan *Staphylococcus* türlerinin özellikle

Staphylococcus aureus'un, sepsis, toksik şok sendromu, endokardit, tromboflebit, solunum sistemi infeksiyonları gibi birçok infeksiyonda etken olduğu bilinmektedir.

Yazışma adresi: Hüseyin Baskın, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340 İZMİR

Tel.: (0232) 412 45 11, GSM: (0533) 334 31 66

e-posta: huseyin.baskin@deu.edu.tr

Alındığı tarih: 17.05.2007, revizyon kabulü: 27.09.2007

* Bu çalışmanın bir bölümü, XXXII Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (12 -16 Eylül 2006, Antalya)

Makrofajların ve diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin bakterilere ulaşmasını engelleyen mükoid bir yapı olan biyofilmin, bakterinin tutunması ve antibiyotik direncinde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Biyofilmin, antibiyotiklerin geçişine engel olarak dirence uygun ortam hazırladığı düşünülmektedir^(4,5).

Ekstraselüler bir proenzim olan koagülaz, "Coagulase-Reacting Factor (CRF)" ile birleşip aktif duruma geçerek plazmayı pıhtılaştırır. *Staphylococcus* türleri için koagülaz, patojen olan ve olmayan suşların ayırımında kullanılan standart bir belirleyicidir. Patojen stafilokoklarda bağlı koagülaz (Kümeleştirici Faktör: KF; Clumping Factor) ve serbest koagülaz olmak üzere iki çeşit koagülaz belirlenmiştir. Serbest ve bağlı koagülazların oluşma mekanizmaları farklıdır. Protrombin ve türevleri ile etkileşen serbest koagülaz hücre dışı bir enzimdir. Hücre yüzeyinde meydana gelerek serbest bırakılmayan KF ile fibrinojen, fibrine dönüşür. Bu dönüşüm ile hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu meydana gelir ve böylece stafilokoklar kümeleşir. Hücre duvarının yüzeyinde bağlı bulunan bağlı koagülaz ise, plazma fibrinojenlerinin α ve β zincirleri ile etkileşir^(6,8). Bir virulans faktörü olan koagülazın, bakteri yüzeyinin fibrin ile kaplanmasını sağlayarak fagositozu önlediği düşünülmektedir⁽⁸⁾.

Bu çalışmada, gentamisin MİK, MİK altındaki ve üstündeki yoğunluklarının klinikte önemli patolojilere neden olan *S.aureus*'un patojenite ölçütlerinden olan biyofilm ve koagülaz oluşumlarına etkileri değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kateter ucundan ayrıştırılmış bir klinik *S.aureus* suşu (KSA) ve standart suş olarak da *S.aureus* ATCC 25923 suşu (SSA) kullanılmıştır.

Gentamisin suşlar için en düşük baskılayıcı yoğunlukları (MİK değerleri) katyon ilaveli MHB'da mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI standartlarına uygun olarak belirlenmiştir. Bakteri süspansiyonları McFarland 0.5 (1.5×10^8 hücre/mL) bulanıklığında hazırlanmıştır. ELISA

mikroplaklarındaki kuyucuklara önce 100 μ L MHB besiyeri, sonra antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları ve son olarak da 100 μ L bakteri süspansiyonu dağıtılmış, mikroplaklar 18 saat 37°C'de inkübe edilmiştir⁽³⁾. Gentamisin MİK değerleri her iki suş için spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir^(1,3).

Biyofilm oluşumu kristal viyole boyama yöntemi ile yine aynı ELISA plaklarında, iki katı absorbanslar pozitif kabul edilerek, spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir⁽⁹⁾.

Koagülaz aktivitesi gentamisin çeşitli MİK değerleri ile karşılaşmış KSA ve SSA suşlarından örnekler alınarak, bağlı koagülaz için lamda (10-30 saniye) ve serbest koagülaz için tüpte (1, 2, 4 ve 24. saatlerde) değerlendirilmiştir⁽²⁾.

Her deney aynı koşullarda, her örnek için üçer kez yinelenmiştir.

BULGULAR

Gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunluğu (MİK değeri) KSA suşu için 4 μ g/mL, SSA suşu için 0.125 μ g/mL olarak bulunmuştur.

Her iki suşta biyofilm oluşumu ve lamda koagülaz testi gentamisin MİK ve altındaki yoğunluklarında pozitif, MİK üstü yoğunluklarında negatif olarak saptanmıştır (Tablo 1 ve 2).

Tüpte koagülaz testi KSA suşunda 1 ve 2 saatte 0.03 μ g/mL (1/128 MİK)'de ve altındaki yoğunluklarda pozitif bulunurken, 4 ve 24 saatte 2xMİK, MİK ve bütün sub-MİK'larda pozitif sonuç vermiştir. SSA suşunda tüpte koagülaz testi ise 1 saatte 1/4 ve 1/8 MİK gentamisin yoğunluklarında bile negatif; 2 saatte bu yoğunluklarda pozitif, daha yüksek yoğunluklarda negatif; 4 ve 24 saatte 2xMİK ve altındaki yoğunluklarda pozitif, daha yüksek yoğunluklarda negatif bulunmuştur.

TARTIŞMA

S.aureus'un patojenitesinde önemli rol oynayan biyofilm oluşumu ve koagülaz, antibiyotik kullanımında önemli değerlendirme önceliği taşımaktadır. *S.aureus*'un tutunmasında koagü-

Tablo 1: Kateter ucundan ayrıştırılmış *Staphylococcus aureus* suşunun (KSA) gentamisin varlığında biyofilm, tüpte ve lamda koagülasyon oluşturmaları.

KSA*	8 µg/mL 2 MİK	4 µg/mL MİK	2 µg/mL 1/2 MİK	1 µg/mL 1/4 MİK	0.5 µg/mL 1/8 MİK	0.250 µg/mL 1/16 MİK	0.125 µg/mL 1/32 MİK	0.06 µg/mL 1/64 MİK	0.03 µg/mL 1/128 MİK	0.015 µg/mL 1/256 MİK
Biyofilm	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lamda koagülaz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tüpte koagülaz										
1 saat	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2 saat	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
4 saat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 saat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Antibiyotik ile karşılaşmamış şuşta biyofilm ve lamda koagülaz pozitif, tüpte koagülaz 2 saatten itibaren pozitif bulunmuştur.

Tablo 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşunun (SSA) gentamisin varlığında biyofilm, tüpte ve lamda koagülasyon oluşturmaları.

SSA*	0.5 µg/mL 4 MİK	0.250 µg/mL 2 MİK	0.125 µg/mL MİK	0.06 µg/mL 1/2 MİK	0.03 µg/mL 1/4 MİK	0.015 µg/mL 1/8 MİK
Biyofilm	-	-	+	+	+	+
Lamda koagülaz	-	-	+	+	+	+
Tüpte koagülaz						
1 saat	-	-	-	-	-	-
2 saat	-	-	-	-	+	+
4 saat	-	+	+	+	+	+
24 saat	-	+	+	+	+	+

* Antibiyotik ile karşılaşmamış şuşta biyofilm ve lamda koagülaz pozitif, tüpte koagülaz 2 saatten itibaren pozitif bulunmuştur.

lazın rolü deneysel olarak gösterilmiş, KF'nün *S.aureus* endokarditinin patogeneğinde önemli bir rol oynadığı da belirlenmiştir⁽⁷⁾.

Çalışmamızda gentamisine duyarlı iki farklı *S.aureus* suşunun biyofilm ve tüpte koagülaz oluşumunun inhibe edildiği antibiyotik yoğunluklarının farklı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda CLSI standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen gentamisinin MİK değerleri KSA için 4 µg/mL, SSA için 0.125 µg/mL olarak belirlenmiştir. Her iki suşta da biyofilm oluşumu, MİK değerleri birbirinden farklı olsa da, MİK ve altındaki yoğunluklarda oluşmuş, MİK üstü yoğunluklarda engellenmiştir. Bu sonuç biyofilm oluşumunu başlatan genetik ekspresyonun, her iki suşta da gentamisinin MİK ve altındaki yoğunluklarında gerçekleştiğini düşündürmüştür.

Lamda koagülaz, bağlı koagülaz varlığını gösterir. Her iki suşta da bağlı koagülaz oluşumunun, yine biyofilm oluşumu gibi MİK ve altındaki değerlerde pozitif olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlar bağlı koagülaz oluşumunun, biyofilm oluşumu ile paralel olduğunu, uyarılma mekanizmalarının MİK ve altındaki yoğunluklarda fonksiyon görebildiğini düşündürmüştür.

Tüpte yapılan serbest koagülaz değerlendirmesinde ise; KSA'da ilk saatte 0.03 µg/mL (1/128 MİK)'de koagülaz oluşurken, SSA'da ilk saatte denenen en düşük 0.015 µg/mL (1/8 MİK)'de koagülaz oluşumu gözlenmemiş, 2'inci saatte 0.03 µg/mL'de koagülaz oluşumu belirlenmiştir. KSA suşunda 2'inci saatten önce koagülaz ekspresyonun gerçekleşmesi, bu suşun daha önce bu antibiyotik ile karşılaşmış olmasından kaynaklanabilir.

Klinikte antibiyotik kullanımı, özellikle biyofilm yapabilen organizmalar için gittikçe daha önemli bir sorun haline gelmektedir. Bu çalışmada bir aminoglikozid olan gentamisinin MİK ve altındaki değerlerinde, biyofilm ve bağlı koagülaz oluşumunun inhibe edilmediği, ancak MİK üstü konsantrasyonlarda inhibe edildiği; serbest koagülazın ise ilk 2 saatte MİK altın-

daki konsatrasyonlarda inhibe edilebildiği, 4 saatte ise 2xMİK'de bile inhibe edilmediği belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu ve koagülazın MİK değerlerindeki pozitifliğinin *S.aureus* suşlarının patojenitesinde önemli rol oynadıkları düşünüldüğünde sonuç önemli olabilir kanısına varılmıştır.

Çalışmalarımız *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi biyofilm oluşturabilen bakterilerin, patolojik ekspresyonlarının hangi yollarla ile ne zaman ve hangi koşullarda oluştuğunun araştırılması yönünde devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baskın H, Doğan Y, Bahar IH, Yulug N: Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Int J Antimicrob Agents* 2002;19(1):79-82.
2. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji Tanı, birinci bas-
kı kitabında s. 452-3, Barış Yayınları Tıp Fakülte-
leri Kitabevi, İzmir (1992).
3. Clinical and Laboratory Standards Institute
(CLSI): (Çeviri editörü Deniz Gür) Antimikrobik
Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları,
Onaltıncı Bilgi Eki, M100-S16, Bilimsel Tıp Kitabevi,
Ankara (2006).
4. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang
Z, Jones RA, Miller SI: Aminoglycoside antibiotics
induce bacterial biofilm formation, *Nature*
2005;436(7054):1171-5.
5. Kanamaru S, Kurazono H, Terai A et al: Increased
biofilm formation in *Escherichia coli* isolated
from acute prostatitis, *Int J Antimicrob Agents*
2006;28(Suppl 1):S21-5.
6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schrecken-
berger PC, Winn CW: *Color Atlas and Textbook
of Diagnostic Microbiology*, 5th ed." kitabında
s.551-60, Lippincott, New York (1997).
7. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P et al: Role of
Staphylococcus aureus coagulase and clumping
factor in pathogenesis of experimental endocarditis,
Infect Immun 1995;63(2):4738-43.
8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA,
Tenover FC, Tenover FC: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th
ed." kitabında s.384-93, ASM Press, Washington
DC (2000).
9. Narisawa N, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki
M: Estimation of the biofilms formation of *Esche-
richia coli* K-12 by the cell number, *J Biosci Bioeng*
2005;99(1):78-80.