

HASTANE KÖKENLİ METİSİLİN DİRENÇLİ STAFİLOKOK SUŞLARINDA SLİME OLUŞUMU İLE BUNUN TEİKOPLANİN DUYARLILIĞINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

İlhami ÇELİK, Mustafa CİHANGİROĞLU, Pınar YÜCE, Ayhan AKBULUT, S. Sırrı KILIÇ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Nozokomiyal pnömoni ve sepsis etkeni olarak izole edilen 50 stafilocok suşunda E-test yöntemiyle ölçülen teikoplanin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri ile Kongo red agar plak yöntemiyle slime faktörü oluşumu arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 50 suşun 35'i *Staphylococcus aureus*, 15'i koagülaz negatif stafilocok (KNS) idi. Suşların 31'i endotrakeal aspirattan (ETA), 19'u kandan izole edilmiştir.

Otuzbir *S.aureus* ve 12 KNS suşu slime oluşturmuş, 4 *S.aureus* ve 3 KNS suşu oluşturmamıştır. Teikoplanine birer *S.aureus* ve KNS suşu orta duyarlı bulunmuş, dirençli suşa rastlanmamıştır. *S.aureus* veya KNS suşları için, ETA veya kandan izole edilenler için, slime oluşturan veya oluşturmayan suşlar için teikoplaninin ortalama MİK değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Yine de ortalama MİK değerinin slime oluşturan suşlarda (4.3 ± 3.5 µg/ml) oluşturmayanlardankinden (2.7 ± 1.2 µg/ml) yüksek olması konunun daha fazla suşla incelenmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: nozokomiyal MRSA, slime oluşturma, teikoplanin duyarlılığı

SUMMARY

Investigation of Slime Production of Nosocomial Methicillin-Resistant Staphylococci and its Relationship to Teicoplanin Susceptibility

In 50 *Staphylococcus* strains, isolated as the causal agents of nosocomial pneumonia and sepsis, the slime production and teicoplanin MIC's were determined by Kongo red agar plate method and E-test, respectively, and the correlation between these two parameters were analyzed. Thirty-five strains were *S.aureus* and 15 strains were coagulase negative staphylococci (CNS). Thirty-one of the strains were isolated from endotracheal aspirates (ETA) and 19 from blood.

Thirty-one *S.aureus* and 12 CNS strains were found as slime producer, and 4 *S.aureus* and 3 CNS strains as nonproducer. One *S.aureus* and 1 CNS strains were found moderately susceptible to teicoplanin to which no resistant strain was encountered. No significant difference was found for the mean teicoplanin MIC's between *S.aureus* and CNS strains, or between the strains from ETA or blood, or between the slime producers and nonproducers ($p>0.05$). But since the mean MIC was higher in producers (4.3 ± 3.5 µg/ml) than that in nonproducers (2.7 ± 1.2 µg/ml), although insignificantly, it is concluded that such a correlation should be investigated with higher numbers of strains.

Key words: nosocomial MRSA, slime production, teicoplanin susceptibility

Yazışma adresi: İlhami Çelik, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları Kliniği, 23119 ELAZIĞ

Tel.:(0424)2333555/1575

e-posta: ilhamicelik@hotmail.com

Alındığı tarih:09.11.2003, revizyon kabulü:27.02.2004

*XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (30 Eylül- 5 Ekim 2002, Antalya)

GİRİŞ

Stafilokoklar, hem sağlıklı hem de immün yetmezlikli olguların hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonlarının başlıca etkenleri arasında yer almaktadırlar. Ağır stafilokok infeksiyonları yüksek mortalite ve komplikasyon oranlarıyla ciddi bir sorun olma özelliğini sürdürmektedirler. Gerek *S.aureus* gerekse koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) nozokomiyal sepsis ve pnömoninin en önemli etkenleri arasında bulunmaktadır^(14, 15, 17).

Slime (biyofilm) maddesi; bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksis ve opsono-sitofagositozu önler, nötrofil etkisini inhibe eder ve lenfosit aktivitesini azaltır. Slime oluşturan bakteriler tedavisi güç infeksiyonlara yol açar. Slime oluşumunun antibiyotiklerin etkisini önleyici bir fonksiyonu olduğu bildirilmektedir^(4,6). Slime maddesini eradike etmek son derece güç olup slime oluşturan bakteriler oldukça inatçı infeksiyonlara yol açarlar. Uygulanan antimikrobiyal ajanların bakteriye etki etmesi için biyofilm tabakasına difüze olması gerekir⁽¹²⁾.

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli stafilokoklarda slime oluşumu ile teikoplaninin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Tıp Merkezi yoğun bakım birimlerinde yatan ve nozokomiyal sepsis ve pnömoni tanı kriterlerini karşılayan hastaların kan ve endotrakeal aspirat kültürlerinden izole edilen toplam 50 *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşu çalışmaya alınmıştır^(7,14). Suşların izolasyon ve identifikasyonu standart bakteriyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Örnekler % 5 koyun kanlı agara ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gram boyama, koloni morfolojisi dikkate alınarak stafilokok olarak tanımlanan suşlar için ticari olarak temin edilen Bacto Coagulase Plasma EDTA (Difco Laboratories) standart ve pürifiye tavşan plazması kullanılmıştır. Pıhtılaşma oluşan tüpler koagülaz pozitif olarak kabul edilmiştir.

Metisilin (oksasilin) direnci NCCLS önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Suşlardan 0.5 McFarland bulanıklık standardına uygun (10⁸ bakteri/ml) olarak steril serum fizyolojik içinde süspansiyonlar 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 suşu olarak oksasilin için inhibisyon zon çapları bilinen *S.aureus* ATCC

25923 standart suşu kullanılmıştır⁽¹³⁾.

Suşların teikoplanin duyarlılıkları E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) yöntemiyle incelenmiştir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan inokulum Mueller-Hinton agar plaklara ekilmiş, teikoplanin E-test şeridi yerleştirilmiş ve 24 saat 35°C'de inkübe edilmiştir. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak kabul edilmiştir. ≤ 8 µg/ml değerler duyarlı, 16 µg/ml orta derecede duyarlı ve ≥ 32 µg/ml dirençli olarak kabul edilmiştir⁽¹⁶⁾.

Stafilokok suşlarının slime yapma özellikleri Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 10 g agar, 50 g sükröz, 37 g beyin-kalp infüzyon buyyonu 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 suşlar slime pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise slime negatif olarak değerlendirilmiştir⁽³⁾.

İstatistiksel analiz ki-kare testi ve Spearman korelasyon analizi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Suşların 35'i *S.aureus*, 15'i KNS olarak idantifiye edilmiştir. *S.aureus* suşlarının 21'i endotrakeal aspirat (ETA), 14'ü kandan; KNS suşlarının 10'u ETA, 5'i kandan izole edilmiş; *S.aureus* suşlarının 31'i (% 89), KNS suşlarının 12'si (% 80) slime oluşturmuştur (Tablo 1).

Tablo 1: Suşların izole edildiği örnekler ve slime oluşturmaları.

Suşlar	Örnek		Slime		Toplam
	ETA	Kan	Pozitif (%)	Negatif (%)	
<i>S.aureus</i>	21	14	31(89)	4 (11)	35
KNS	10	5	12 (80)	3 (20)	15
Toplam	31	19	43 (86)	7 (14)	50

Suşlar için teikoplaninin MİK değerleri tablo 2'de gösterilmiştir. Birer *S.aureus* ve KNS suşu teikoplanine orta derecede duyarlı bulunmuş, dirençli suşa rastlanmamış, iki grup suşlar için de MİK₉₀ 8 µg/ml olarak saptanmıştır.

Tablo 2: Suşlar için teikoplaninin MİK değerleri.

MİK (µg/ml)	<i>S.aureus</i>	KNS
0.5	1	2
1.0	5	1
2.0	10	2
4.0	13	6
8.0	5	3
16.0	1	1

Teikoplaninin ortalama MİK değerleri suşların türüne, kaynağına ve slime oluşturup oluşturmamlarına göre tablo 3’de gösterilmiştir. Slime oluşturan suşlar toplam olarak alındığında bu değer $4.3\pm 3.5 \mu\text{g/ml}$, oluşturmayanlar için $2.7\pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bütün karşılaştırmalarda farklar anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 3: Çeşitli gruplarda teikoplaninin ortalama MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$).

Suşlar	Kaynak		Slime		Toplam
	ETA	Kan	Pozitif	Negatif	
S.aureus	3.8 ± 3.1	3.4 ± 3.1	4.0 ± 3.2	2.5 ± 1.0	3.3 ± 2.5
KNS	4.5 ± 3.9	2.8 ± 2.4	5.1 ± 4.4	3.0 ± 1.7	4.2 ± 3.9
Tüm suşlar			4.3 ± 3.5	2.7 ± 1.2	

Bütün karşılaştırmalar için $p>0.05$

TARTIŞMA

Slime (biyofilm) maddesi bir ekzopolisakarit olup bakterilerin bazı yüzeylerde kolonizasyonuna yol açar. Biyofilm maddesini ortadan kaldırmak oldukça güçtür ve inatçı infeksiyonlara kaynak teşkil etmesi açısından oldukça önem taşır. Biyofilm tabakası ekzopolimer matrikse sahip kapalı bir yapıdır ve çeşitli maddelerin difüzyonunu kısıtlar ve antimikrobiyal ajanları bağlar. Bu durum biyofilm hücreleri için lizozim, kompleman ve antimikrobiyal proteinler gibi büyük moleküllere karşı etkili bir direnç sağlar⁽¹²⁾. İnfeksiyon tedavisi için antibiyotik seçiminde in-vitro difüzyon ve dilüsyon yöntemleri kullanılır; biyofilm oluşumu göz önüne alınmaz. Bu durum tedavi başarısızlığına yol açabilir⁽²⁾.

Son birkaç onyılıda *S. epidermidis* ve yakın zamanlarda da *S. aureus*’da slime oluşumu ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır. Slime maddesi fagositozu ve polimorfonükleer lökositlerin mikroorganizmayı öldürücü etkisini azaltıcı rol oynamaktadır. Birçok çalışmada slime maddesi varlığının fagositozu ve mikroorganizmanın ortadan kaldırılmasını önlediği belirtilmektedir^(9,10). Akiyama ve ark.⁽¹⁾ kan kültüründen izole ettikleri stafilokokların kontaminan suşlara oranla slime oluşturma oranlarının klinik olarak daha anlamlı olduğunu bildirmişlerdir.

Souli ve Giamarellou⁽¹⁵⁾ KNS suşlarında slime oluşumu ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişkiyi araştırdıkları bir çalışmada pefloksasin, teikoplanin ve vankomisin duyarlılığının slime oluşturan suşlarda sırasıyla % 30, % 52 ve % 63 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Ancak rifampin için aktivitenin ancak % 1 oranında azaldığını belirtmişlerdir.

Boussard ve ark.⁽⁴⁾ slime oluşturan suşlarda antibiyotik duyarlılığının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını, Kotilainen ve ark.⁽¹¹⁾ slime üreten suşlarda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin üretmeyen suşlardan daha yüksek olduğunu ve bir-

çok antibiyotiğe direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Kantarcioglu ve Yücel⁽⁹⁾ hasta refakatçi ve ziyaretçilerinden izole ettikleri metisiline dirençli KNS’larda slime oluşumunun metisiline duyarlı olan suşlardan anlamlı derecede daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir.

Diaz-Mitoma ve ark.⁽⁵⁾ ventriküloperitoneal şant infeksiyonlu hastalarda antibiyotik başarısızlığı ve slime üretimi arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır.

Öte yandan Karadenizli ve ark.⁽¹⁰⁾ tarafından yapılan bir çalışmada ise slime üreten *S.epidermidis* suşlarının fusidik asit duyarlılığı ile üretmeyen suşlar arasındaki duyarlılık açısından farklılık saptanmadığını bildirmiş ve bunu kan kültürlerinden izole edilen ajanların gerçek patojen değil kontaminan olabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Ishak ve ark.⁽⁸⁾ KNS’larda teflona yapışma, fagositoz ve polimorfonükleer fagositler tarafından öldürülmenin slime oluşumundan etkilenmediğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada da slime üretimi ile teikoplanin MİK değerleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır ($r = 0.135$, $p=0.35$). Bunun olası nedeni çalışmaya alınan suşların istatistiksel karşılaştırmasını etkileyebilecek sayısal farklılık olması (43 vs 7) şeklinde açıklanabilir.

Slime oluşturan suşlar için, anlamlı olmasa da, teikoplaninin ortalama MİK değerinin daha yüksek bulunması ($4.3\pm 3.5 \mu\text{g/ml}$ vs $2.7\pm 1.2 \mu\text{g/ml}$) teikoplanin ile tedavide akılda tutulması ve konunun daha çok sayıda suşla incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, Arata J: Adherence characteristics, and susceptibility to antimicrobial agents of Staphylococcus aureus strains isolated from skin infections and atopic dermatitis, J Dermatol Sci 2000;23:155-60.
2. Amorena B, Gracia E, Monzon M et al: Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro, J Antimicrob Chemother 1999;44:43-55.
3. Arciola CR, Campoccia D, Borrelli AM, Donati ME, Montanaro L: Congo red agar plate method: improved accuracy and new extended application to Staphylococcus aureus, New Microbiol 2001;24:355-63.
4. Boussard P, Pithsy A, Devleeschouwer MJ: Relationship between slime production, antibiotic sensitivity and the phagetype of coagulase-negative staphylococci, J Clin Pharm Ther 1993;18:271-4.
5. Diaz-Mitoma F, Harding GKM, Hoban DJ, Roberts RS, Low DE: Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci, J Infect Dis 1987;156:555-60.
6. Donlan RM: Role of biofilms in antimicrobial resistance, ASAIQ Journal 2000;46:47.
7. George DL: Nosocomial pneumonia, “Mayhall CG (ed): Hospital

- Epidemiology and Infection Control” kitabında s.175-95, Williams and Wilkins, Baltimore (1996).
8. Ishak MA, Groschel DH, Mandell GL, Wenzel RP: Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia, *J Clin Microbiol* 1985;22:1025-9.
 9. Kantarcıoğlu AS, Yücel A: Hasta refakatçileri ve ziyaretçilerinden elde edilen koagülaz negatif stafilocoklarda metisiline direnç ve bunun slaym faktör üretimi ile ilişkisinin araştırılması, *ANKEM Derg* 2002; 16:52-5.
 10. Karadenizli A, Meriç M, Gülenç S, Akhan S, Gündes S, Willke A: The relation between slime production and resistance to fusidic acid of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures, *Microbiol Infect* 2001;7 (Suppl 1):80.
 11. Kotilainen P, Nikoskelainen J, Huovinen 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.
 12. Lewis K: Riddle of biofilm resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:999–1007.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard M2-A6, 6th ed. Vol 17 No: 1, NCCLS, Villanova (1997).
 14. Pittet D: Nosocomial bloodstream infections, “Wenzel RP (ed): Prevention and Control of Nosocomial Infections, Third edition” kitabında s.711-69, Williams and Wilkins, Baltimore (1997).
 15. Souli M, Giamarellou H: Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents, *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:939-41.
 16. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC et al: Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides, *J Clin Microbiol* 1998;36:1020-7.
 17. Weinstein MP, Towns ML, Quarley SM et al: The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults, *Clin Infect Dis* 1997;24:584-602.