

KIA ve Triptofanlı Buyyon Besiyerindeki Biyokimyasal Özelliklerine Göre Enterik Bakterilerin Tanımlanmasında Klasik Yöntemlerin Modifikasyonu

Halil YAZGI(*)

ÖZET

Enterobacteriaceae ailesi içinde 30'dan fazla cins ve 130'dan fazla tür bulunmaktadır. Bu 130 tür bakteriden klinik örneklerde en sık izole edilenler Escherichia coli, Shigella serogrup A,B,C,D, Salmonellalar, Citrobacter freundii, Citrobacter diversus, Edwardsiella tarda, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Hafnia alvei, Serratia marcescens, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Providencia alcalifaciens, Morganella morganii, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis ve Yersinia pseudotuberculosis'dir.

Enterik bakterilerin tanımlanması biyokimyasal testlerle olur. Bu amaçla en sık kullanılan besiyerleri Kligler's iron agar (KIA) ve triptofanlı buyyon'dur.

Enterik bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde klasik değerlendirme tablolarının kullanımı pratik uygulamalarda pek uygun değildir. Özellikle mikrobiyoloji uzmanlık eğitimine yeni başlamış araştırmacılar için bu tabloları değerlendirmek daha da zaman alıcı olmaktadır. Tanımlama tablosunun bu değerlendirme zorluğunu gidermek amacıyla enterik bakterinin KIA da oluşturduğu özellikleri ve indol deneyini birlikte değerlendirmek suretiyle bir tanımlama tablosu tasarlanmıştır. Tasarlanan bu tablo yardımıyla sık izole edilen enterik bakterilerin tanımlanması daha kolay ve kısa sürede gerçekleştirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Enterik bakteriler, tanımlama tablosu

SUMMARY

Modification of the Classical Methods in Identification of Enterobacteriaceae by Their Biochemical Properties on KIA and Tryptone Broth Media

There are more than 30 genera and more than 130 species in Enterobacteriaceae. The most commonly isolated bacteria are Escherichia coli, Shigella serogrup A,B,C,D, some Salmonella serotypes, Citrobacter freundii, Citrobacter diversus, Edwardsiella tarda, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Hafnia alvei, Serratia marcescens, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Providencia alcalifaciens, Morganella morganii, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis.

The identification of Enterobacteriaceae could be done by biochemical tests. For this purpose, the most commonly used media are KIA and tryptone broth.

The use of classical evaluation tables is not practical in the evaluation of biochemical features of Enterobacteriaceae. Moreover evaluation of these tables could be time-consuming, especially for those who are at the beginning of microbiology residency programme. For this purpose, we composed an identification table evaluating features of Enterobacteriaceae both in KIA and tryptone broth media. With the aid of this table the identification of commonly isolated Enterobacteriaceae could be easier and not time-consuming.

Key words: Enterobacteriaceae, identification table

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesinin yada kısaca enterik bakterilerin genel özellikleri şunlardır: 0,3-0,5 mm en ve 1-6mm boyunda çoğu hareketli, bazısı hareket-siz, düz, Gram negatif, sporsuz, çomak biçiminde

bakterilerdir. Fakültatif anaeropturlar. Genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. Fermentatif metabolizmaları var olup tümü glikozu parçalayarak asit ve birçoğu da gaz oluştururlar. Katalaz olumlu, oksidaz olumsuzdur. Nitratları nitritlere çevirirler (1).

Enterobacteriaceae ailesi içinde 30'dan fazla cins ve 130'dan fazla tür bulunmaktadır (2). Ancak bu 130

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

tür bakteriden klinik örneklerde en sık izole edilenler *E. coli*, *Shigella* serogrup A,B,C,D, *Salmonella*, *C. freundii*, *C. diversus*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *H. alvei*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. alcalifaciens*, *M. morgani*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* ve *Y. pseudotuberculosis*'dir(3). Ülkemizde yapılmış çalışmalarda da klinik örneklerden yaklaşık olarak benzer bakteriler izole edilmektedir (4-11). Enterik bakterilerin etken olabileceği hastalık materyallerinden ilk ekimler en az bir adet zengin besiyerine, örneğin kanlı agar, bir de EMB, Endo, Mac Conkey gibi ayırtedici bir besiyerine yapılmalıdır (1). EMB, Endo, Mac Conkey besiyerlerinde Gram pozitif bakteriler ve müşkülpesent Gram negatif bakteriler üreyemez iken enterik bakteriler iyi ürer (1,12). EMB, Endo, Mac Conkey gibi besiyerinde üreyen bakterilerin kesin tanısı biyokimyasal yöntemlerle yapılır. Bu amaçla kullanılan kırktan fazla test vardır (2). Özellikle rutin mikrobiyolojik çalışmalarda her enterik bakterinin tanısında bu testlerin hepsinin yapılmasına gerek yoktur. Ayrıca zaman ve ekonomik bakımdan uygun da değildir.

Enterik bakterilerin tanısında uygulanan biyokimyasal deneylerde en sık kullanılan besiyerleri Triple Sugar Iron (TSI= Üç şekerli demir) besiyeri ve triptofanlı buyyon'dur (13). TSI besiyerinin yerine aynı amaçla Kligler's Iron Agar (KIA) da kullanılabilir(12). Bu iki besiyerinin içeriğindeki temel fark TSI de üç çeşit (glukoz, laktoz ve sukroz) şeker bulunması oysa KIA da iki çeşit (glukoz ve laktoz) şeker bulunmasıdır. Sukrozu fermente eden bakteriler TSI besiyerinin yatık kısmında asit reaksiyon oluşumuna neden olmaktadır. Klinik örneklerden sık olarak izole edilen bakterilerin laktoz fermente etme özellikleri sukroz fermente etme özellikleriyle genellikle paralellik göstermektedir. Ancak bu paralellik durumu her bakteride bulunmamaktadır. Örneğin *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris* ve *S. marcescens*'te laktoz negatif olmasına karşın sukroz pozitifdir (2).

Laktoz negatif ve sukroz pozitif özellikteki bir bakteriyi TSI besiyerine ektiğimizde sukrozun fermentasyonu TSI besiyerinin yatık kısmını sarı renge dönüştürmesinden dolayı sanki bakteri laktoz pozitifmiş gibi değerlendirme hataları ortaya çıkabilir. Bu yanlı-

gıya meydan vermemesinden dolayı, özellikle dışkı örneklerinde *Salmonella* *Shigella* ve *Yersinia* cinslerinin izole edilme olasılığı varsa, KIA besiyeri TSI besiyerine tercih edilebilir (12).

EMB yada Mac Conkey gibi bir besiyerinde üremiş ve oksidaz negatif olan bir bakteri kolonisinden KIA besiyerinin dip kısmına batırılıp sonra yatık yüzeyine zikzak çizilerek ekim yapılır. 35 °C' de 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda KIA besiyerinde oluşan özelliklerin değerlendirilmesi şu şekildedir:

Dipte sarı (asit), yatık kısmında kırmızı (alkali) reaksiyon gösteren bakteriler, yalnız glukozu fermente etmiş laktozu edememişlerdir.

Dip ve yatık kısımda sarı (asit) reaksiyon verenler, hem glukozu hem de laktozu fermente etmişlerdir.

Besiyerinde hava kabarcıklarının yada çatlamlarının varlığı bakterinin gaz, siyah rengin oluşumu H₂S oluşturduğunu gösterir (1).

Klinik örneklerden sıklıkla izole edilen enterik bakterilerin KIA ve triptofanlı buyyon besiyerinde oluşturduğu özellikler klasik şekliyle Tablo 1' de gösterilmiştir (1-3). Enterik bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde klasik değerlendirmenin değerlendirilmesinde klasik değerlendirme tablolarının kullanımı pratik uygulamalarda pek uygun değildir. Özellikle mikrobiyoloji uzmanlık eğitimine yeni başlamış araştırma görevlileri için bu tabloları değerlendirmek daha da zaman alıcı olmaktadır. Örneğin "glukoz pozitif, glukozdan gaz oluşumu negatif, H₂S pozitif, laktoz negatif, indol pozitif" özellikte olan bir bakteri suşunu tanımlayabilmek için Tablo 1' de teorik olarak yaklaşık 50 kareyi işaretlememiz gerekmektedir.

Tanımlama tablosunun bu değerlendirme zorluğunu gidermek amacıyla bakterinin KIA da oluşturduğu özellikleri ve indol deneyini birlikte değerlendirmek suretiyle Tablo 2' de görülen tanımlama tablosu tasarlandı. Tablonun tasarımında bakterilerin laktoz fermentasyonu özelliği özel önem taşımaktadır. Enterik bakterilerin bu özelliği onların ayrımları bakımından önemlidir (1). Özellikle enterik patojenlerin büyük bir bölümünün laktoz negatif olması, tablonun bu şekilde tasarlanmasında etkili olmuştur.

İncelendiğinde görüleceği üzere Tablo 2'nin birinci

Tablo 1. Enterik bakterilerin KIA ve İndol besiyerinde oluşturduğu özellikler (Klasik tablo)*

Bakteri	Glukoz fermentasyonu	Glukozdan gaz oluşumu	Laktöz fermentasyonu	H ₂ S oluşumu	İndol üretimi
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+
<i>Shigella</i> serogrup B,C	+	-	-	-	+/-(%50+)
<i>S. dysenteriae</i>	+	-	-	-	+/-(%45+)
<i>S. sonnei</i>	+	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> most serotypes	+	+	-	+	-
<i>S. typhi</i>	+	-	-	+	-
<i>S. paratyphi</i> A	+	+	-	-	-
<i>C. freundii</i>	+	+	+/- (%50 +)	+/-(%80+)	-
<i>C. diversus</i>	+	+	+/- (%35 +)	-	+
<i>E. tarda</i>	+	+	-	+	+
<i>K. pneumonia</i>	+	+	+	-	-
<i>K. oxitoca</i>	+	+	+	-	+
<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	-	-
<i>H. alvei</i>	+	+	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	+	+/- (% 55 +)	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	+	+	-	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	+/-(%85 +)	-	+	+
<i>P. rettgeri</i>	+	-	-	-	+
<i>P. stuarti</i>	+	-	-	-	+
<i>P. alcalifaciens</i>	+	+/- (%85 +)	-	-	+
<i>M. morgani</i>	+	+	-	-	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	-	-	-	+/-(%50 +)
<i>Y. pestis</i>	+	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	+	-	-	-	-

*Açıklama:

+ = kökenlerin en az %90'ı olumlu

+/- =kökenlerin % 11-89'u olumlu

- =kökenlerin 0-10'u olumlu (1-3).

bölgesinde enterik bakterilerin KIA ve indol deneylerine ait veriler, ikinci bölgesinde ise enterik bakterilerin tanımlanmasında sık kullanılan diğer biyokimyasal testlere ait veriler bulunmaktadır. Ayrıca tablonun üst tarafında laktöz negatif bakteriler, alt tarafında ise laktöz pozitif bakteriler bulunmaktadır. Yukarıda kalın (bold) yazım şeklinde biyokimyasal özellikleri verilen bakterinin Tablo 2'ye göre değerlendirildiğinde *Proteus vulgaris* olduğu kolayca görülmektedir. Tablo 2 incelendiğinde bazı bakterilerin birden fazla bölgede yer aldığı görülmektedir. Bunun nedeni o bakterilerin biyokimyasal özelliklerinden bir yada birkaçının değişken olmasıdır. Örneğin *C.freundii*'nin KIA ve triptofanlı buyyonda izlenen biyokimyasal özellikleri klasik tanımlama tablosun-

da indol üretimi negatif, H₂S değişken, glukozdan gaz oluşumu pozitif ve laktöz fermentasyonu değişken olarak görülmektedir. *C. freundii*'nin bu dört biyokimyasal özelliğinden ikisinin değişken olması tasarlanan tabloda bu bakterinin dört farklı bölgede yer almasına neden olmuştur.

SONUÇ

Tasarlanan tabloda bazı gruplarda (örneğin laktöz pozitif, glukozdan gaz pozitif, H₂S pozitif, indol negatif grupta olduğu gibi) sadece bir bakteri türü bulunmakta ve bu bakteri türünün tanımlanmasında KIA ve triptofanlı buyyon besiyerinden elde ettiğimiz veriler yeterli olmaktadır. Öte yandan diğer bazı gruplarda (örneğin laktöz negatif, glukozdan gaz ne-

Tablo 2. Enterik bakterilerin KIA ve İndol besiyerinde oluşturduğu özellikler (tasarlanan tablo)**

	1.Bölge		2. Bölge								
	KIA+İndol Özelliği	Olası etken	MR	VP	Citrat	Üreaz	LD	OD	Mannitol	Hareket	
LAKTOZ NEGATİF	Gaz (-) H ₂ S (-) İndol(-)	S. sonnei	+	-	-	-	-	+	+	-	
		S. dysenteriae	+	-	-	-	-	-	-	-	
		Shigella serogrup B,C	+	-	-	-	-	-	+	-	
		S. marcescens	D	+	+	D	+	+	+	+	
		Y. enterocolitica	+	-	-	D	+	+	+	-	
		Y. pestis	D	-	-	-	-	-	-	+	-
		Y. pseudotuberculosis	+	-	-	+	-	-	-	+	-
	Gaz (-) H ₂ S (-) İndol(+)	S. dysenteriae Shigella serogrup B,C P. rettgeri P. stuartii P. alcalifaciens Y. enterocolitica	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz (-) H ₂ S (+) İndol(-)	S. thypi	+	-	-	-	+	-	+	+		
LAKTOZ POZİTİF	Gaz (+) H ₂ S (-) İndol(-)	S. paratyphi A	+	-	-	-	-	+	+	+	
		H. alvei	D	D	-	-	+	+	+	D	
		S. marcescens	D	+	+	D	+	+	+	+	
		C. freundii	+	-	D	D	-	-	+	+	
	Gaz (+) H ₂ S (-) İndol(+)	P. alcalifaciens M. morgani C. diversus	+	-	+	-	-	-	-	-	+
		Salmonella most serotypes P. mirabilis C. freundii	+	-	+	-	+	+	+	+	+
		P. vulgaris E. tarda	+	-	D	+	-	+	-	-	+
Gaz (-) H ₂ S (+) İndol(+)	P. vulgaris	+	-	D	+	-	-	-	+		
LAKTOZ POZİTİF	Gaz (+) H ₂ S (-) İndol(-)	K. pneumonia E. aerogenes E. cloacae C. freundii	-	+	+	+	+	-	+	-	
		E. coli C. diversus K. oxiotoca	+	-	-	-	+	D	+	+	
		C. freundii	+	-	+	D	-	-	+	+	
Gaz (+) H ₂ S (+) İndol(-)	C. freundii	+	-	D	D	-	-	+	+		

****Açıklama :**

- 1.gaz= glukozdan gaz oluşumu, MR= metil kırmızısı, VP=Voges Proskauer, Citrat= citrat utilizasyonu, Üreaz= üre hidrolizi, LD=lizin dekarboksilaz, OD= ornitin dekarboksilaz
- 2.Sadece bir tek grupta yer alan bakteri türlerinin belirtilen özellikleri %90 ve üstündeki değerlerde ise (+), %10 ve altındaki değerlerde ise (-) olarak değerlendirildi.
- 3.Birden fazla grupta yer alan bakteri türlerinin belirtilen özelliklerinden bir yada birkaçının pozitiflik oranları %11-89 arasındadır.
- 4.Değerlendirme tablosunda yer alan salmonella, shigella ve E.coli türlerinin kesin tanısı için biyokimyasal testlerin yanısıra serolojik deneylerle antijenik yapılarının incelenmesi de uygun olur.
5. + = kökenlerin en az%90'ı olumlu
- =kökenlerin %0-10'u olumlu
D =kökenlerin %11-89'u olumlu (1-3).

gatif, H₂S negatif , indol negatif grupta olduğu gibi) birden fazla bakteri türü bulunmaktadır. Bu gibi durumlarda triptofanlı buyyon ve KIA besiyerinden elde ettiğimiz veriler yetersiz kalmakta ve kesin tanımlama yapılamamaktadır. Bu nedenle KIA ve indol deneyine ek olarak bazı biyokimyasal deneyler de

yapılmalıdır. Sıklıkla kullanılan bu deneylerden bazıları üreaz , lizin-ornitin dekarboksilaz etkinlikleri, hareket, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneği, Voges–Proskauer, metil kırmızısı ve manitol fermentasyonudur (3). Laboratuvar olanaklarına göre KIA ve indol deneylerine ilave olarak bu testlerden dört yada beş tanesinin uygulanması kesin

tanımlama için genellikle yeterli olmaktadır.

Biyokimyasal özellikleri ile Salmonella, Shigella ya da E.coli olarak tanımlanan bakteri türlerinin kesin tanısı için biyokimyasal testlerin yanısıra serolojik deneylerle antijenik yapılarının incelenmesi de uygun olur (1). Salmonella sadece cins düzeyinde biyokimyasal olarak tanımlanır, serotip tayini ise anti O ve anti H serumları ile yapılır. Shigella için biyokimyasal yöntemlerle tür düzeyinde tanı yapılır, serotipleri ise grup ve tipe özgü polivalan Shigella antiserumları kullanılarak belirlenir. E. coli için gerekirse polivalan E. coli O antiserumları ile lam aglutinasyonu yapılarak serotiplendirme yapılmalıdır (14).

Tablo 2’de KIA besiyerinden elde edilen verilerin yerine TSI agar besiyerinden elde edilen veriler de aynı amaçla kullanılabilir. Tasarlanan tablonun sık izole edilen enterik bakterilerin tanımlanmasında genç mikrobiyologlara faydalı olacağını ummaktayız.

KAYNAKLAR

- 1.**Bilgehan H:** Klinik Mikrobiyolojik Tanı, s385, 1.baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir (1992).
- 2.**Farmer JJ III:** Enterobacteriaceae:Introduction and identification. ”Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC,Yolken RH (eds): Manual of Clinical Microbiology”, pp 442, 7th ed, ASM Press, Washington DC (1999).
- 3.**Baron EJ, Finegold SM:** Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology, p 363, 8th ed, Mosby, St Louis, Missouri (1990).
- 4.**Aksaray S, Güvener E:** Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram olumsuz bakterilerin antibiyotik duyarlılığı, 28. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-9 Ekim Özet Kitabı(1998).

bı(1998).

- 5.**Hoşoğlu S, Ayaz C, Geyik MF, Kökoğlu ÖF, Demirel M:** Aerobik bakteriemi etkenlerinin izolasyonunda BACTEC 9240 sisteminin değerlendirilmesi. İnfek Derg 13:85 (1999).
- 6.**Özyurt M, Albay A, Yıldırım ŞT, Başustaoğlu A, Gün H:** BacT/Alert otomatize kan kültür sistemi ile iki yıllık dönemde alınan sonuçlar: Retrospektif bir çalışma, İnfek Derg 12:323 (1998).
- 7.**Köksal F, Samastı M:** Kan kültürlerinden izole edilen enterik bakterilerin antibiyotiklere direnç durumları. 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Özet Kitabı (2000).
- 8.**Bozkurt H, Berktaş M, Güdücüoğlu H, Kurtoğlu MG:** Van yöresinde çocuk yaş grubu idrar kültürlerinin değerlendirilmesi. 10. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Program Kitabı (2001).
- 9.**Durmaz B, Tekerekoğlu MS, Taştekin N, Oflu B:** İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi’nde BACTEC kan kültür sistemi ile alınan sonuçların değerlendirilmesi. İnfek Derg 14:397 (2000).
10. **Durmaz Çetin B, Gündüz A, Şensoy A, Korkmaz F, Seber E:** Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif çomaklarda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi ve antibiyotiklere duyarlılık özellikleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 31:41 (2001).
- 11.**Köseoğlu Ö, Öztoklu İ, Tezcan S, Haşçelik G, Günalp A:** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi kan kültürlerinin mikrobiyolojik ve klinik değerlendirilmesi: Tanımlayıcı/metodolojik bir çalışma. İnfek Derg 14:387 (2000).
- 12.**Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr:** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, p105, 4th ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia (1992).
- 13.**Brooks GF, Butel JS, Ornston LN:** Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical Microbiology, p 212, 19th ed. Appleton and Lange, International Edition (1991).
- 14.**Birsel Erdem:** Enterobacteriaceae. “Ustaçelebi Ş (ed): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji” s472, Güneş Kitabevi, Ankara (1999).