

# Stafilokok Suşlarının Gaz Kromatografi Metoduyla Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları (\*)

Ekrem KİREÇCİ(\*\*), Ayşe Esin AKTAŞ(\*\*)

(\*) XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresin' de (30 Eylül-05 Ekim, 2002 Antalya) sunulmuştur.

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

## ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokoklar gaz kromatografi metoduyla tanımlanmıştır. Stafilokokların identifikasyonunda mikroskopik deneyler ve çeşitli biyokimyasal testlerin klasik olarak uygulanması yanında birçok basit ticari sistemler ortaya konmuştur. Bu sistemler ya 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 54stafilokok suşunun identifikasyonu için MİS kullanılmıştır. İzole ve identifiye edilen stafilokok türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyon metoduyla araştırılmıştır. Metisilin direnci koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilokoklarda sırası ile 47.0-%40.5 olarak bulunmuştur. Metisiline dirençli stafilokok suşlarının, metisiline duyarlı stafilokok suşlarına göre antibiyotiklere daha dirençli oldukları saptanmıştır. Suşların tamamı vankomisine ve teikoplanine duyarlı bulunmuştur

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus*, yağ asit analizi, MİS, antibiyotiklere duyarlılık

## SUMMARY

Identification by Gase Chromatography Method and Antibiotic Susceptibilities of Staphylococcus Strains

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. Antibiotic susceptibilities of the strains were examined 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.

Key words: *Staphylococcus*, fatty acid analysis, MIS, antibiotics sensitivity

## GİRİŞ

Stafilokoklar, sistemik ve lokal bir çok enfeksiyona neden olan ve son yıllarda bazı antimikrobiale ajanlara dirençli hale gelmesi nedeniyle daha da önem kazanan bakterilerdir. Stafilokokların identifikasyonu için gerek manuel ve gerekse de otomatize bir çok metod ticari olarak mevcuttur (1).

Çalışmamızda stafilokokların identifikasyonunda, Microbial ID (MIDI, Newark,DE,USA) tarafından üretilen, Mikrobiyal İdentifikasyon Sistem (MİS)'den yararlanılmıştır. Sistem türlere özgü olan tüm yağ asiti metil esterleri, dimetil asetil, aldehid gibi bileşikler yüksek ayrıştırma özelliğindeki gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla tanımlar. MİS tam

otomatik bilgisayar destekli, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli olup laboratuvarında izole edilen bir çok mikroorganizmanın identifikasyonunda kullanılmaktadır (2,3).

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 54 stafilokok suşu MİS ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Ayrıca suşların antibiyotik duyarlılıkları da incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Stafilokok 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 infeksiyon etkeni olabileceği düşünülen toplam 54 stafilokok suşu incelenmiştir. Suşlar, koloni morfolojisi, Gram boyama özelliği, katalaz, manitol fermantasyonu, novobiocin duyarlılığı ve koagülaz testleri ile tanımlanmıştır.

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

**MİS.** MİS sistemi dört ana parçadan oluşan ve bilgisayar kontrolünde çalışan bir sistemdir. Bu ana parçalar; 1-Gaz kromatografisi 2-Kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava) 3-Bilgisayar sistemi 4-Database'ler (Sherlock system software, library generation software, bakteri ve fungus için hazırlanmış kütüphaneler) (2,3).

Tanısını yapmak istediğimiz stafilokok izolatlarının kanlı agar besiyerinde saf kültürlerinden, yine kanlı agar besiyerine ekim yapılarak 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra stafilokokların yağ asiti metil esterlerinin izolasyonu ve saflaştırılması için bir öze dolusu (yaklaşık 40 mg) izolat steril bir cam test tüpüne (5ml) aktarılıp ağzı sıkıca kapatılmıştır. Her bir test tüpüne 1ml çözelti bir eklenmiştir, 5-10 saniye çalkalanmıştır ve 25 dakika süre ile 100 °C lik sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem ile canlı hücreler parçalanıp yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

İkinci basamakta test tüplerine 2 ml çözelti iki eklenmiştir. 5-10 sn çalkalandıktan sonra 10 dk 80 °C'de ve

iki dakika kadar buz içerisinde bekletilmiştir. Metilasyon basamağı olarak bilinen bu safhada serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş olur ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri oluşur. Böylece yağ asit esterleri yüksek sıcaklıkta uçuculuk özelliği kazanır.

Üçüncü basamakta soğutulmuş tüplere 1.25 ml çözelti üç eklenerek 10 dakika çalkalanmıştır. Bu süre sonunda tüplerde iki faz oluşmuştur. Alt fazda asidik, üstte organik sıvı faz oluşup pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde asidik faz atılmıştır.

En son aşamada her tüpe 3 ml çözelti dört eklenmiştir. Beş dakika çalkalanıp, 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bazik yıkama denilen bu safhada yağ asit metil esterleri daha saf olarak elde edilmiştir. Bekleme sonunda tüplerde oluşan iki fazın üstte kalanı yağ asitlerinin saf metil esterleri olup bu alandan pastör pipeti ile 2ml gaz kromatografisi tüplerine transfer edilmiştir. Ağzuları sıkıca kapatılarak MİS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsinine dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Sistem kılavuzuna uygun şekilde tek tek analiz edilmiş ve CLIN40 kütüphanelerine göre sonuçları alınmıştır (2,3,4). (Tablo 1)

**Tablo 1. Deneyde kullanılan çözeltiler**

<b>Çözelti 1: Saponifikasyon ( Hücre parçalanması )</b>	
NaOH	45 gr
Metil alkol	150 ml
Saf su	150 ml
<b>Çözelti 2: Metilasyon</b>	
HCl2	325 ml
Metil alkol	275 ml
<b>Çözelti 3: Saflaştırma</b>	
Hekzan	200 ml
Meti-tert-butil eter	200 ml
<b>Çözelti 4: Bazik yıkama</b>	
NaOH	10.8 gr
Saf su	900ml

Duyarlılık testleri, tanımlanan bakterilerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları NCCLS kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılıp değerlendirilmiştir (5).

## 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* olarak tanımlanmıştır. *S.aureus* ve KNS suşlarının sırası ile penisiline %0-%72.9'u, seftazidime %5.8-%64.8'i, ampisilin-sulbaktama %41.1-%94.5'i duyarlı bulunmuştur. Metisilin dirençli 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 2).

## TARTIŞMA

Stafilocokların tür düzeyinde tanımlanması için klasik yöntemlerin yanısıra Mikrobiyal identifikasyon sistem gibi alternatif yöntemlerde mevcuttur. MİS, stafilocokları aynı gün tür düzeyinde tanımlama olanağı vermektedir (6).

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

Tablo 2. İdentifiye edilen stafilocok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları (n)

MIS ile tanımlanan suşlar (n)	Penisilin		Sefazolin		Oksasilin		Amp./Sulb		Vankomisin		Teikoplanin	
	Du*	Di**	Du	Di	Du	Di	Du	Di	Du	Di	Du	Di
<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	-

\* Du: Duyarlı

\*\* Di: Dirençli

Behme ve ark (8) stafilokokların tanımlanmasında biyokimyasal testler ile yağ asiti analizine dayanan MIS'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 belirtmişlerdir. Çalışmamızda suşların tiplendirilmesinde biyokimyasal testler ile MIS karşılaştırılmamıştır. Ancak suşların ilk izolasyonunda, koagülaz, manitol fermentasyonu ve novobiocin duyarlılığı gibi klasik test sonuçları ile MIS identifikasyon sonuçları arasında paralellik görülmüştür.

Stafilokoklarda 1950'li yıllarda penisilinin yanısıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanımda olan diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir. 1970'li yıllardan itibaren ise metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları yaygın olarak kullanılan bir çok antibiyotiğe dirençli hale gelmeye başlamıştır (9).

Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda metisilin direnci *S.aureus* suşlarında %43 ile %65 arasında, KNS'larda %44 ve %57 arasındaki oranlarda tespit edilmiştir (10-15). Avrupa'da hastane infeksiyonlarına yönelik bir prevalans çalışmasında, 10 ülkede toplam 43 labotatuvarından gönderilen 7333 izolatın %12.8'nin metisiline dirençli olduğu bildirilmiştir (16). Çalışmamızda *S.aureus* suşlarının %47'si, KNS'ların %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. Çalışmamızda stafilokok suşlarının hiçbirinde vankomisin ve teikoplanin direnci saptanamazken, *S.aureus* suşlarında diğer antibiyotiklere yüksek oranda direnç görülmüştür.

Sonuç olarak MIS'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.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmamızı destekleyen Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına te-

şekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Murray P, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller M.A:** Medical Microbiology. p 175-180, 3. baskı, Mosby Co, New York, (1998).
- Onderdonk, A.B, 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. Tenover, R.H. Tenover (eds): Manual of Clinical Microbiology", p123-129, 6. baskı, Washington D.C. (1995).
- Miller I, Berger T:** Bacteria identification by gase chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard gase chromatography application note, Hewlett-Packard Co., Alto, CA,8, (1985).
- Buyer, S.J:** Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. J Mic Meth, 48: 259 (2002).
- National Committee For Clinical Laboratory Standards:** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS document M100-S9, Wayne, Pennsylvania USA (1999).
- Stoakes L, John A.M., Lannigan R., Ramos M:** Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. J Clin Mic 32:1908 (1994).
- Kotilainen, P., Huovinen, P., Eerola, E:** Application of gas-liquid chromatograph analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 29:315 (1991).
- Behme, R.J., Shuttleworth, R., McNabb, A. & Colby, W.D:** Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. J Clin Microbiol 34 (Suppl 1):3075 (1996).
- Çetinkaya Y, Ünal S:** Metisilin dirençli *S.aureus* infeksiyonları: Epidemiyoloji ve kontrol. Flora (1996).
- Arslan H, Tunçbilek S, Nazlıer S:** Nozokomiyal infeksiyonu olarak izole edilen stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklerin in vitro etkinliği. İnfeks Derg 12:347 (1998).
- Değerli K, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Sezgin C, Kurutepe S:** Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. İnfeks Derg 14:87 (2000).
- Özgüncü D, Vural T, Çolak T, Gültekin M, Mutlu G:** Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok suşlarının antibiyotiklere direnç özellikleri.

ri. *İnfeksi Derg* 12:157 (1998).

**13. Songür M, Sayan M, Yüce A, Yuluğ N:** Staphylococcus aureus'a karşı vankomisin ve trimetoprim-sulfametoksazol etkinliğinin karşılaştırılması. *İnfeksi Derg* 12:39 (1998).

**14. Türk Arıbaş E, Özcan M, Altındiş M:** Klinik örneklerden izole edilen stafilokokların antibiyotik direnç oran-

ları. *İnfeksi Derg* 15:73 (2001).

**15. Vardar Ünlü G, Ünlü M:** Yara örneklerinden soyutlanan Staphylococcus aureus kökenlerinin glikopeptid antibiyotiklere duyarlılığı. *İnfeksi Derg* 15:239 (2001).

**16. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz , Roshdal VT, Braney I:** Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:50 (1994).