

T.C.
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOK KÖKENLERİNİN SLİME ÜRETİMİ VE
BUNUN ANTİBİYOTİK DİRENCİ İLE İLİŞKİSİ**

118423

UZMANLIK TEZİ

Dr. Uğur Ersoy

118423

**TC. YÜSEKÖĞRETİM ENCELİK
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
DANIŞMAN**

Prof. Dr. Funda Babacan
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İstanbul - 2002

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında değerli katkıları nedeni ile sayın hocam Prof. Dr. Funda Babacan'a ve çalışma süresince sağladıkları destek nedeni ile mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, çalışma arkadaşım Dr. Arzu Akşit İliki ile diğer asistan arkadaşlarıma; ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen Prof.Dr. Candan Johansson'a, Prof.Dr. Güner Söyletir'e, Doç.Dr. Ayşegül Yağcı'ya, Yard.Doç.Dr. Nilgün Çerikçioğlu'na, Yard. Doç.Dr. Ufuk Över'e ve Dr. Nurver Ülger'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım

Ayrıca tıp eğitimim boyunca her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm kardeşim Soner'e ve aileme içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
1- STAFİLOKOKLAR	4
A) Genel Özellikler	4
B) Epidemiyoloji	5
C) Patogenez	7
I. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
II. Koagulaz negatif stafilokoklar	9
D) <i>Stafilokokların antibiyotiklere direnç durumu</i>	11
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER	13
1- GEREÇLER	13
A) Bakteri	13
B) Besiyerleri	13
C) Şekerler	13
D) Tamponlar	14
E) Boyalar	14
F) Araç ve gereçler.....	15
2- YÖNTEMLER	16
A) Bakterilerin saklanması	16
B) Bakterilerin identifikasyonu.....	16
C) Antibiyotik duyarlılıklarının saptanması	16
D) Slime üretiminin saptanması	17
I. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi.....	17
I a) Kongo Kırmızılı Agar Yönteminde kullanılan maddeler	17
I b) Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	17
II. Kantitatif Mikroplak Test Yöntemi.....	19
II a) Kantitatif mikroplak test yönteminde kullanılan maddeler	19
II b) Kantitatif Mikroplak Test Yöntemi	19
D) İstatistik analizler.....	21
IV. BULGULAR	22
1- BAKTERİLER	22
2- SLİME OLUŞUMU	23
3- ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK	27
V. TARTIŞMA	32
VI. ÖZET	41
VII. SUMMARY	42
VIII. KAYNAKLAR	43

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Lokal enfeksiyonun yayılması ve immün sistemin bu yayılmayı baskılamamasından kaynaklanan bakteremi ve/veya sepsis, morbidite ve mortalitenin en sık nedenidir. Bu enfeksiyonun sıklığı, epidemiyolojisi ve etken mikroorganizma, immün sistemi baskılanmış hasta sayısının ve vücut bütünlüğünü bozan medikal aletlerin kullanımının sayısının da artmasıyla birlikte değişmiştir.(1)

1970'lerde, stafilokoklara karşı güçlü beta laktam antibiyotiklerin kullanılmaya başlaması ile gram negatif bakteriler *Staphylococcus aureus*'un yerine geçerek ilk sıraya yükseldiler. Ancak; 1980'lerden sonra gram pozitif kokların sıklığı yeniden artmaya başlamıştır.(1) 1995 ile 1998 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nde 49 hastaneden alınan verilerde hastane kaynaklı kan yolu enfeksiyon etkenleri sırasıyla: koagulaz negatif stafilokoklar, *S. aureus*, ve enterokoklar olarak bulunmuştur (2).

Gram pozitif koklar 10,617 hastane kaynaklı bakteriyemi hastasının % 64.4'ünde, gram negatif basiller ise % 27 sinde saptanmıştır(2). Gram pozitif bakterilerden stafilokok türü bakteriler ilk sırayı almaktadır. Yapılan çalışmalarda, en sık *Staphylococcus epidermidis* (%53) olmak üzere, *S. hominis* (%13), ve *S. haemolyticus* sıklıkla kandan izole edilen stafilokok türleridir (3). Amerikadan 1996 yılında yayınlanan bir çalışmada, Birleşik Amerika'daki 48 merkezden bildirilen toplam 2596 hastane kaynaklı

bakteriyeminin % 32.2'sinden Koagulaz Negatif Stafilokoklar (KNS) izole edilmiştir (4). Bunların içinde *Staphylococcus epidermidis* %65-90 oranında en sık izole edilen türdür(5).

Normal deri florası elemanı olmaları nedeniyle, KNS'lar sıklıkla kan kültürlerinden izole edilmektedirler. Bu nedenle %85'inin deri kontaminasyonu olduğu bilinmektedir(6,7). Birden fazla kan kültürü pozitif olsa bile, çoğu zaman gerçek bir bakteriyemi mi yoksa kontaminasyon mu olduğunu saptamak güç olmaktadır (7). Yapılan bir çalışmada, kan kültüründen izole edilen, aynı türde, aynı serotipte, antibiyotik dirençleri aynı olan KNS'ların bazılarının, moleküler tiplendirme yöntemleri ile analiz edildiğinde farklı kökenler oldukları gösterilmiştir (8).

Son 20 yılda, KNS'lar, özellikle vücut bütünlüğünü bozan medikal aletlerin kullanılması sonucu, hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık nedeni haline gelmiştir. Biyomateryal enfeksiyonlarına karşı olan bu yatkınlık anlaşılammıştır. Bu nedenle araştırmalar, mikroorganizmanın patogeneğinde, bakteriyel yapışmanın, özellikle de slime üretiminin rolü üzerine yoğunlaşmıştır. Slime, in vitro kültür materyali içine konulan cansız objeler üzerinde bakterinin oluşturduğu kalın, kolaylıkla ayrılmayan film tabakasıdır ki morfolojik olarak enfekte medikal aletlerin üzerini kaplayan in-vivo biofilmden ayırd edilememektedir (9).

Biofilm üretimi ile mikroorganizmalar yüzeylere geridönüşsüz olarak yapışarak üremeye başlarlar. Bu sırada üretmiş oldukları ekstrasellüler polimerler tutunmayı ve matriks oluşumunu hızlandırarak üreme hızı ve gen transkripsiyonu açısından organizmanın fenotipini de değiştirirler. Bu biyofilm üreten mikroorganizmaların önemi, antimikrobiyal ajanlara karşı dramatik olarak azalmış duyarlılıklarından kaynaklanır(10).

AMAÇ

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen stafilokok türlerinde, 'slime' üretimi saptanarak, yöntemler arasındaki duyarlılık ve kullanım kolaylığı incelenmiş, etken ve kontaminant stafilokok türleri ve bunların slime üretimindeki farklılıkları araştırılmıştır. Ayrıca slime faktör üretiminin antimikrobiyal duyarlılıkla arasındaki ilişki araştırılarak, slime üretiminin kontaminasyon ve bakteriyemi ayırımında kullanılıp kullanılmayacağı saptanmaya çalışılmıştır.



II. GENEL BİLGİLER

1- STAFİLOKOKLAR

A) Genel Özellikler :

Bütün stafilokoklar koyu boyanan, gram pozitif, çoğu fizyolojik olmayan koşullarda yaşayabilen, spor oluşturmeyen fakültatif anaerob bakterilerdir. Üremeleri için, çeşitli aminoasitler ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Katalaz enzimi üretirler ve düzensiz topluluklar şeklinde bölünerek, üzüm salkımı şeklinde bakteri kümeleri oluştururlar (11).

Stafilokoklar klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında primer olarak koagulaz enzimi üretilip üretilmemelerine göre sınıflandırılırlar. Koagulaz pozitif olan stafilokoklar aynı zamanda mannitolü de fermente ederler ve duvarlarında IgG bağlayan protein (protein A) içerirler. Aynı zamanda hücre yüzeylerinde fibrinojen bağlayan bir protein (kümeleyici faktör) içerirler. Kanlı agar ve diğer seçici olmayan besiyerlerinde üreyebilirler. 18-24 saatlik inkübasyon sonrası, düzgün sınırlı ve yüzeyli , 1-4 mm çapında koloniler oluşturur(12).

Stafilokokların tanımlanmasında katalaz ve koagulaz enzimi dışında biyokimyasal özellikleride kullanılır. Bunlardan en sık kullanılanları, mannitol fermentasyonu, DNAz üretimi ve novobiyosin duyarlılığıdır(13).

İnsanda etken olan koagulaz pozitif stafilokoklar yalnız *Staphylococcus aureus* kökenleridir ancak insanda hastalık etkeni olabilen 15 koagulaz negatif stafilokok türü mevcuttur (5).

B) Epidemiyoloji :

KNS'lar normal kalıcı cilt florasında yaygın olarak bulunurlar (12). *S. epidermidis*, insan müköz membranlarında ve derisinde en sık ve en yoğun bulunan stafilokok türüdür (5,14). Tüm stafilokokların % 65-90'ını oluşturur ve daha çok burun kanatları, kıllı deri (aksilla, inguinal bölge, perineal bölge) ve parmak aralarında saptanır. *S. hominis* ikinci sıklıkla izole edilen KNS türüdür. Diğer KNS türleri ya kalıcı cilt florasının nadir üyeleridir (*S. haemolyticus*, *S. warneri*) ya da geçici olarak cilt florasını oluştururlar (*S. xylosus*, *S. simulans*, *S. cohnii*). Bazı türler de sadece spesifik vücut bölgelerinde bulunurlar (*S. capitis* [kafa], *S. auricularis* [dış kulak yolu]) (5). *S. saprophyticus* ise üroepitelyal hücrelere affinite gösterir (12). KNS'ların tipi ve lokalizasyonu, antibiyotik tedavisi ve müköz membranlarda kolonize olabilen *S. aureus*'un varlığı ile değişim göstermektedir(5).

Doğal kalp kapakçığı endokarditi ve bazı periton diyaliz kateter enfeksiyonları dışında, hemen hemen bütün *S. epidermidis* enfeksiyonları hastane kaynaklıdır. Bunun aksine, *S. saprophyticus* enfeksiyonlarının (idrar yolu enfeksiyonları) hemen hemen tümü hastane dışından edinilmiştir. Muhtemelen hastanede yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin seleksiyon baskısı uygulamasından dolayı, hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *S. epidermidis* kökenleri çoklu antibiyotik direncine sahiptir. Hastaların ve hastane personelinin, antibiyotiğe dirençli *S. epidermidis* kökenleri ile kolonize olmaları, hastane kaynaklı enfeksiyonların başlangıcını oluşturur. Böylece, hastalar ve hastane personeli *S. epidermidis*'in rezervleridir ve mikroorganizma buradan, medikal aletlerin takılmaları sırasında direk olarak yabancı cisimlere bulaşır (5,6).

Laboratuvarda izole edilen çoğu KNS'lar normal cilt florasından kaynaklanan kontaminantlardır. Kontaminasyon olmayan izolatlar, genelde hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleridir ve KNS enfeksiyonu olan hastalarda, cerrahi, kateter veya protez takılması veya immünsupresyon gibi konak savunmasında bozukluklar vardır. Prematür yenidoğanlarda, özellikle doğum ağırlığı 1500 gr altındaki bebeklerde, KNS'lar tek başlarına, geç başlangıçlı septiseminin ve bütün yaşlarda hastane kaynaklı bakteriyemi ataklarının en sık nedenidir(15).

S. aureus neonatal dönemden başlayarak insanları kolonize edebilir ve yetişkinlerin % 25'inde burun taşıyıcılığı vardır. Buradan *S. aureus* deri ve müköz membranları kolonize edebilir. Müköz membranlar ve deri *S. aureus*'un yapışması için uygun bölgeler olsa da, aynı zamanda lokal doku invazyonu yapmasını engelleyen etkili bariyerlerdir. Eğer deri ve müköz membran bariyeri travma yada cerrahi girişim sonrası bozulursa, *S. aureus* alttaki dokulara geçerek karakteristik lokal abse lezyonunu yapar (5,13). Enfeksiyonun herhangi bir zamanında, çoğalan bakteri lokal fagositik mekanizmaları aşarsa, lenf kanallarına ve dolayısı ile kan akımına karışabilir. Takip eden *S. aureus* septisemisi çok ciddi bir komplikasyondur ve metastatik enfeksiyonlara yol açabilir (endokardit, pnömoni, veya osteomyelit) (13).

Stafilokoklar hastane kaynaklı bakteriyemi etkenleri arasında gittikçe artan oranlarda izole edilmeye başlanmıştır(1,4). KNS'lar birinci sırada yer alırken *S. aureus* ikinci sıklıkla hastane kaynaklı bakteriyemi etkenidir(1). Son 20 yılda tıbbi uygulamalardaki değişimin yanısıra, immüdüşkün hasta sayısındaki artış, KNS'ların hastane kaynaklı bakteriyeminin en sık nedeni olmasını sağladı. Bu değişimler :

1. Kritik ve kronik hastalarda gittikçe fazla kullanılmaya başlayan medikal aletler ; KNS'lar vasküler kateter, serebrospinal şant, prostetik eklemler, periton kateterleri, damar grafleri ve prostetik kalp kapakçıklarıyla ilgili enfeksiyonlara sıklıkla neden olurlar.

2. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin özellikle beta-laktam antibiyotiklerin yatan hastalarda artan oranlarda kullanılması ; Artmış olan bu antibiyotik kullanımı, hastanelerde birden fazla ilaca dirençli KNS kökenlerinin yoğunlaşmasına ve hastaların kolonizasyonlarına neden olmaktadır.
3. Gittikçe artan sayıda, immün komprezite ve kritik hastaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için, uzun süreli vasküler katetere bağımlı olmaları. Bu hastalarda KNSlarla bakteriyemi gelişme riski yüksektir ve kateter veya gastrointestinal sistem, KNS'ların giriş yolu olmaktadır (4).

C) Patogenez :

I. *Staphylococcus aureus* :

Diğer tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi, konak savunma mekanizması ve bakteriyel virulans arasındaki denge patogenez için önemlidir(12). *S. aureus*'un hücre duvarı, peptidoglikan, ribitol, teichoic acid ve protein A dan oluşur (16). Hücre duvarının büyük bölümü, diğer gram pozitif mikroorganizmalarda olduğu gibi kalın bir peptidoglikan tabakadan meydana gelir. Bu peptidoglikan tabakanın endotoksin benzeri aktivitesi vardır ve opsonizasyon için gereklidir (12). *S. aureus*'un kolonizasyonu için , öncelikle konak hücreye tutunması gerekir (13). Hücre duvarında bulunan teichoic acid bakterinin mukozal hücrelere tutunmasında ve *S. aureus*'un mukosal kolonizasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir (12). Peptidoglikan tabakanın en dışında yer alan ve hücre duvarına kovalen bağlarla tutunan protein A'nın antifagositik etkisi vardır.

S. aureus'un travmatize olmuş dokuya, bütünlüğü bozulmuş deriye, yabancı cisimlere ve endotel dokuya tutunabildiği , fibrinojen, fibronektin, laminin, thrombospondin ve muhtemelen tip 4 kollojeni de içeren en az 5 farklı

protein saptanmıştır. *S. aureus*'un septisemi sırasında endotel hücreye tutunmasında, endotel hücrenin kendisi, fibronektin ve laminin önemli rol oynar. Biyomateryal enfeksiyonlarında da, kalıcı tıbbi cihazın, konakçı plazma ve matriks proteinleriyle (fibrinojen ve fibronektin gibi) kaplanması ve bakterinin fibronektin bağlayan protein gibi reseptörler aracılığı ile bunlara tutunması, yabancı cisim enfeksiyonlarına yol açar.(12,13)

S. aureus'un virülansından, alpha, beta, gamma, ve delta hemolizinler, lökositinler, proteazlar, lipaz, deoksiribonükleaz hiyolorinidaz ve koagulaz gibi, salgıladığı enzim ve toksinler de sorumludur(13). Bu proteinlerin ana fonksiyonları, lokal konak dokularını bakterinin üremesi için gerekli besin maddelerine dönüştürmek olabilir(17). Henüz virulanstaki yeri tam anlayamamış olan bu toksinler dışında, spesifik klinik sendromlara neden olan toksinler de salgılar. Epidermolitik toksin A ve B, stafilokoka bağlı cilt sendromununun cilt bulgularından, toksik şok sendrom toksin 1 ise, toksik şok sendromunun kliniğinden sorumludur. (13,16)

S. aureus için, slime üretimi 1990'ların ikinci yarısına kadar, bir virulans faktörü olarak düşünülmemiştir. Koagulaz pozitif stafilokokların medikal aletlerle ilgili enfeksiyonlardaki önemi, mikroorganizmanın konak matriks proteinlerini tanıyabilen moleküller ifade etmesine bağlanmıştır (18).

S. aureus bakteriyemisi, olguların büyük çoğunluğunda lokal bir enfeksiyon odağına sekonder olarak gelişir. Bu odaklar; ekstra vasküler(selülit, osteomyelit, pnömoni v.b.) ; intravasküler (intravenöz kateter, intravenöz ilaç kullananlar) olarak sınıflandırılabilirler. Vakaların 1/3'ünde ise odak saptanamaz (12).

II. Koagulaz negatif stafilokoklar :

KNS enfeksiyonları için yabancı cisim varlığı en önemli risk faktörüdür. Yabancı cisimler içinde intravasküler kateterler başta gelir. İkinci sırada yer alan risk faktörü ise immün yetmezliktir.(19) Kateterler hastane kaynaklı enfeksiyonların ve primer septisemilerin başta gelen nedenidir.(20) Kalıcı yabancı cisim varlığında, çok az miktarda mikroorganizmanın bile enfeksiyona yol açabileceği uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda yabancı cisim bölgesindeki nötrofiller mikroskopik olarak normal görünseler bile, öldürme fonksiyonlarında belirgin azalma olduğu saptanmıştır. Yine bakterinin yabancı cisme yapışmasından hemen sonra, kullanılan antibiyotikler için minimum inhibitör konsantrasyonların (MIC) aynı kalmasına rağmen, minimum bakterisidal konsantrasyonların (MBC) çok yükseldiği gösterilmiştir. Bunun salgılanan slime nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.(12)

Yabancı cisim enfeksiyonlarındaki ilk aşama, stafilokokların plastik yüzeye yapışmasıdır (21). Bir kaç faktör mikroorganizmanın protez materyaline yapışmasını etkiler. Yapışmanın erken dönemlerinde yüzey elektrik yükü, polarite , Van der Waals güçleri ve hidrofobik etkiler önemli iken geç dönemlerde adhesinler ve reseptörler arasındaki ilişki daha önemlidir(6).

Bu yapışmayı takiben stafilokoklar lokal olarak çoğalırlar ve yüzeyde, ekstra sellüler poliskkaritin içinde stafilokokların yer aldığı, yabancı cisimden kolay kaldıralamayan bir üreme gösterirler(21). Yabancı cisim enfeksiyonlarındaki ikinci aşama olan bu kalıcılık (persistans), KNS'ların ekstra sellüler slime materyali oluşturması ile ilişkili olabilir (45). Hem mikroorganizma (slime) hem de konak (fibrin ve fibronektin) faktörleri biyofilmin oluşmasına katkıda bulunurlar. Biyofilm, yapışma ve kolonizasyonun devamı için gereklidir(22). Burada deri KNS'lar için büyük bir rezervuar görevi görür. Preoperatif olarak, farklı antiseptik solüsyonları ile ne kadar temizlenirse temizlensin, sebace bezlerinden ve apokrin gözeneklerinden KNS'ların temizlenemeyeceği gösterilmiştir. Preoperatif olarak kullanılan antibiyotikler sadece antibiyotiğe dirençli mikroorganizma popülasyonunun çoğalmasına

neden olur (6). Protez materyali yerine takılırken, bu mikroorganizmaların küçük bir kısmı cerrahi yaraya bulaştırılır. Bakteri biyomateryale yapışır üremeye başlar ve klinik enfeksiyonun ortaya çıkmasını sağlar (23).

Koagulaz negatif stafilokoklar, özellikle *S. epidermidis*, kolonize ettikleri kateterin üzerinde elektron mikroskopisi ile görülebilen egzopolisakarit (slime) üretirler. Üretilen bu egzopolisakaritin patogenezdaki rolü tam olarak bilinmemektedir(5). Bu biyofilm üretilip kateter yüzeyini kapladıktan sonra, bakteri bu biyofilmin içine gömülerek , konağın immün cevabından ve antibiyotik etkilerinden korunmaktadır(5,24,25). Antibiyotik diffüzyonunu engellemenin yanısıra, biyofilmin içine gömülmüş bakteri sayısının fazlalığı ve bakterinin düşük üreme hızı da antibiyotik direncini artırmaktadır (24). Bunlara ek olarak, slime'ın nötrofil ve lenfosit aktivitesini azalttığı da gösterilmiştir (25).

Bu etkiler, hem *S. epidermis* ile hem de slime üreten diğer koagulaz negatif stafilokoklarla oluşan yabancı cisim enfeksiyonlarının kronik hale gelmesini kolaylaştırmakta, özellikle kateter varlığında bakteriyemi ve sepsis riskini artırmaktadır.

Son yıllarda, intravasküler kateterler, yapay kalp kapakçıkları ve ortopedik implantlar gibi medikal aletlerle yapılan tedavilerin artması ile birlikte, bu tür yabancı cisimlere bağlı olarak gelişen enfeksiyonlarda ciddi biçimde artmıştır (24). KNS lar, hem bu tür yabancı cisim ve kateter enfeksiyonlarında, hem de buna bağlı olarak gelişen hastane kaynaklı bakteriyemilerde başta gelen etken olmaktadır (26). Hastalara takılan bütün kateterlerin yüzde 12 ile yüzde 37'sinde enfeksiyon gelişmektedir ve bu enfeksiyonların yüzde 50 ile yüzde 75'inden *S. epidermidis* sorumludur (5). KNS sepsisli hastaların yaklaşık %75'inde başta intravasküler kateterler olmak üzere, girişimsel tıbbi cihaz uygulaması vardır(6).

Santral yada perifer venöz kateterler, total parenteral nütrisyona kateterleri, pulmoner arter balon kateterler, arteriyel kanüller ve hickman gibi

kalıcı kateterler ile bakteriyemi oluşabilir(27). Normal deri florasında bulunan KNS'ların hastane kaynaklı patojen haline gelmesindeki faktörler tam olarak bilinmemesine rağmen, kateter girişi esnasında, kateter sisteminin manüplasyonu esnasında veya kateterden geri gelen kan akımı ile kolonize olabilir. KNS'ların üretmiş olduğu slime'ın, bakteriyi fagositozdan koruyarak bu kolonizasyona katkıda bulunduğu da bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür(26).

Kateter sepsisi gelişiminde; hasta, kateter ve bakteriye ait bazı özellikler predispozisyon oluşturabilir. Hastanın bir yaş altı ve atmış yaş üstünde olması, granulositopenik olması, immün supressif kemoterapi alması, yanık yada psoriasis gibi nedenlerle deri bütünlüğünün bozulması, altta yatan ciddi hastalık olması, mevcut başka bir enfeksiyonun varlığı, kateter sepsisi için hasta ile ilgili risk faktörlerini oluşturur(27).

Hastanın deri mikroflorasındaki değişiklik, hasta bakımında hijyene uyulmaması, kontamine solüsyonların kullanılması, kateter çapının büyük ve lümen sayısının fazla olması, kateter bölgesinde yada başka bir yerde enfeksiyon varlığı, kateterle ilişkili enfeksiyonlar için ek risk faktörleridir.(27)

D) Stafilokokların antibiyotiklere direnç durumu:

Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen KNSlar, özellikle *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus*, beta-laktam antibiyotikler, eritromisin, klindamisin, kloramfenikol ve tetrasiklin'i içeren çoklu antibiyotik direnci göstermektedir ve % 80'den fazlası metisiline dirençlidir(5).

Stafilokoklarda esas sorun giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. Bu bakteride metisilin direnci antibiyotiğin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra, ilk kez 1961 yılında *S. aureus* kökenlerinde bildirilmiştir. 1970'lerde Avrupada, 1980 lerde de Amerikada metisiline dirençli *S. aureus* kökenleri yayılmıştır(12). 1995 ile 1999 yıllarında Amerikada SCOPE

programı çerçevesinde kan yolu enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* kökenlerindeki metisilin direnci % 29 olarak saptanmıştır (2). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kökenli kan yolu enfeksiyonlarının risk faktörleri içinde, geniş ve uzun süreli antibiyotik kullanımı, hastanede uzun süreli yatış, hastada kateterlerin özellikle santral venöz kateterlerin varlığı, eşlik eden ciddi hastalıklar, ve MRSA kökenleri ile nazal kolonizasyon varlığı sayılmaktadır (1).

Günümüzde metisiline dirençli KNS'lar, hastane kaynaklı KNS enfeksiyonlarının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Çoğu metisiline hassas kökenlerde, metisiline heterojen direnç vardır, çünkü metisiline değişen derecelerde direnç gösteren alt populasyonlar bulunur. Vücuttaki herhangi bir enfeksiyonun metisilinle veya semisentetik penisilinlerle veya sefalosporinlerle tedavisi, metisiline dirençli popülasyonların predominant izolat haline gelmesine yol açar(15). Hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen KNS'ların çoğunda, metisilin direncinin yanında, diğer beta-laktamları, eritromisini, klindamisini, tetrasiklini, kloramfenikolü, TMP-SMX'lü ve aminoglikozitleri de içeren çoklu antibiyotik direnci saptanmaktadır (6).

Metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilecek antibiyotikler glikopeptid antibiyotiklerdir (vankomisin ve teikoplanin). Stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklere karşı direnç son derece seyrek. Çok nadir olması nedeni ile stafilokoklardaki glikopeptid antibiyotik direnci henüz klinikte bir problem haline gelmemiştir(12).

III. GEREÇ VE YÖNTEMLER

1- GEREÇLER

A) Bakteri :

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimine, 2000 ve 2001 yılları içinde gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen stafilokok türleri kullanıldı. 2000 ve 2001 yılları içinde izole edilen ve etken kabul edilen 145 stafilokok kökeni ve 2001 yılı içinde kan kültürü örneklerinden izole edilen ve kontaminasyon olarak değerlendirilen 30 stafilokok kökeni çalışıldı.

B) Besiyerleri :

%5 koyun kanlı agar (bio-Merieux)
Tryptic Soy Broth (Oxoid)
Brain Hearth Infusion Broth (Merck)
Agar (Merck)

C) Şekerler :

Sukroz

D) Tamponlar :

0.1M PBS (Fosfat tamponlu tuzlu su) (pH:7.2)

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.15 gr
KH ₂ PO ₄	0.4 gr
Distile su	100 ml

E) Boyalar :

Congo Red (Carlo Erba)

Safranin (Merck)

%1'lik Safranin-O boyasının hazırlanması (28)

Safranin	1gr
Distile su	100 ml

Safranin havanın içinde, her seferinde az miktarda distile su eklenerek, dövülerek çözüldü. 24 saat dinlenmeye bırakılan boya, filtre kağıdından iki kez süzüldü.

F) Araç ve gereçler :

Terazi (Analitik hassas terazi 0.0001gr, Sartorius)

Etöv (B 5042 Heraus)

Pastör fırını (Elektro-mag)

Otoklav

Su banyosu (Elektro-mag)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Arçelik)

Otomatik pipetler

Cam pipetler

Pastör pipetleri

Plastik petriler (9mm çapında,steril)

Cam balonlar

Doku kültür plakları (Greiner)

2- YÖNTEMLER :

A) Bakterilerin saklanması :

Bakteriler boncuklu stok besiyelerine depolanarak –20 °C'de saklandı. Stoklardan altı ayda bir pasaj yapılarak bakterilerin canlılığı kontrol edildi. Çalışmalarda %5 koyun kanlı agara pasajlanan stok bakteriler kullanıldı.

B) Bakterilerin identifikasyonu:

%5 koyun kanlı agarda 37 °C'de bir gece inkübe edilen pozitif kan kültürü pasajlarında üreyen, 2-3 mm boyutlarında, konveks krem renginde veya sarı renkte, mikroskopisinde gram pozitif görünen katalazı pozitif kolonilerden küçük bir miktar alınarak, 0.5 ml insan plasmasının içinde süspansiyon edildi. 37 °C'de 4 saatlik inkübasyon sonucu pıhtı oluşturan izolatlar pozitif kabul edilerek, *S. aureus* olarak isimlendirildi. Koagülaz negatif stafilokok kökenleri, Vitek otomatize sistemde Gram Pozitif İdentifikasyon paneli kullanılarak tür tayini yapıldı.

C) Antibiyotik duyarlılıklarının saptanması:

İzole edilen stafilokok kökenlerinin koyun kanlı agardaki 18-24 saatlik pasajları kullanılarak, Vitek otomatize sistemde duyarlılık testleri yapıldı. Gram pozitif hassasiyet paneli kullanıldı.

D) Slime üretiminin saptanması:

Bakterilerin slime üretimi, Kongo kırmızılı agar yöntemi ve kantitatif mikropalak test (mikrodilüsyon plak) yöntemi ile saptandı.

I. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (29, 30)

I a) Kongo Kırmızılı Agar Yönteminde kullanılan maddeler:

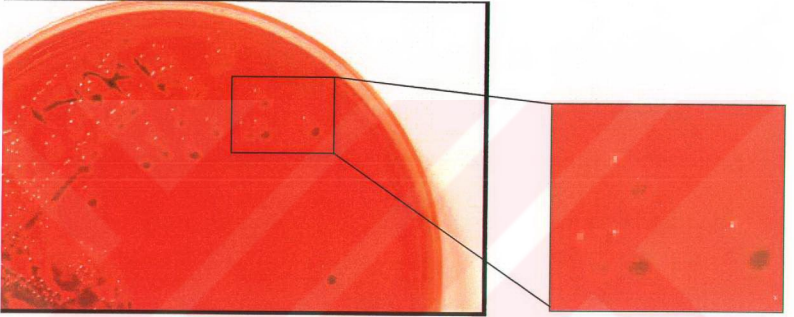
- 37 gr/l brain heart infüzyon sıvı besiyeri,
- 50 gr/l sukroz,
- 10 gr/l agar, ve
- 0.8 gr/l kongo kırmızısı

I b) Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi (29, 30)

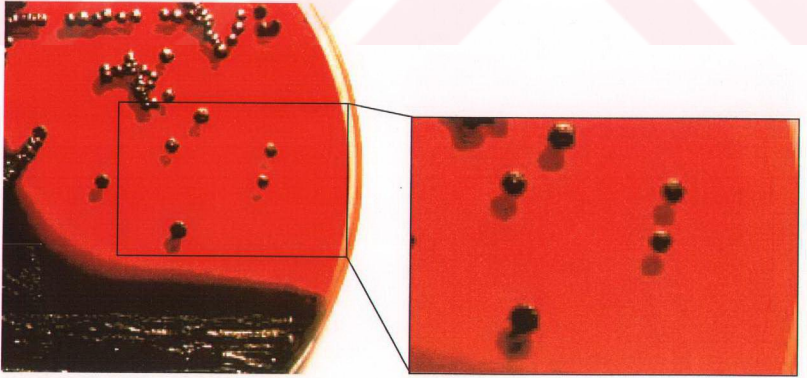
- 37 gr Brain Heart İnfüzyon besiyeri, içine 50 gr sukroz ve 10 gr agar katılarak 950 ml distile suda eritildi ve 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.
- 0.8 gr kongo kırmızısı 50 ml distile suda eritilerek 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.
- Besiyeri 55 °C ye gelinceye kadar soğutuldu ve üzerine 50 ml distile suda eritilmiş ve otoklavda sterilize edilmiş 0.8 gr kongo kırmızısı eklendi. Hazırlanan bu besiyeri, 9 mm çapındaki steril plastik petrilere 15'er ml döküldü.
- Test edilecek mikroorganizmalar, koyun kanlı agara tek koloni düşecek şekilde ekilip 24 saat 37 °C de inkübe edildi.

- Çalışılan stafilocok kökenlerinin, kongo kırmızılı agarda tek koloni oluşturacak şekilde pasajları yapıldı.

Değerlendirme: Siyah veya kırmızı renkte, kuru yüzeyli ve birbirine sıkıca yapışmış koloniler slime üreten bakteriler, düz koloni morfolojisi gösteren ve birbirine gevşekçe yapışmış koloniler slime üretmeyen bakteriler olarak tanımlandı.



Resim 1: Kongo kırmızılı agarda slime negatif KNS kolonileri



Resim 2: Kongo kırmızılı agarda slime pozitif KNS kolonileri

II. Kantitatif Mikroplak Test Yöntemi (31)

II a) Kantitatif mikroplak test yönteminde kullanılan maddeler:

- 30 gr/L Tryptic Soy Broth (TSB)
- Fosfat tamponu, pH: 7.2
- %1'lik Safranin-O boyası
- Düz tabanlı 96 kuyucuklu, gamma radyasyonla sterilize edilmiş doku kültür plakları (Greiner)
- Mikro ELISA otomatik okuyucu (ELX 800 universal microplate reader, BIO-TEK instruments inc.)

II b) Kantitatif Mikroplak Test Yöntemi (31)

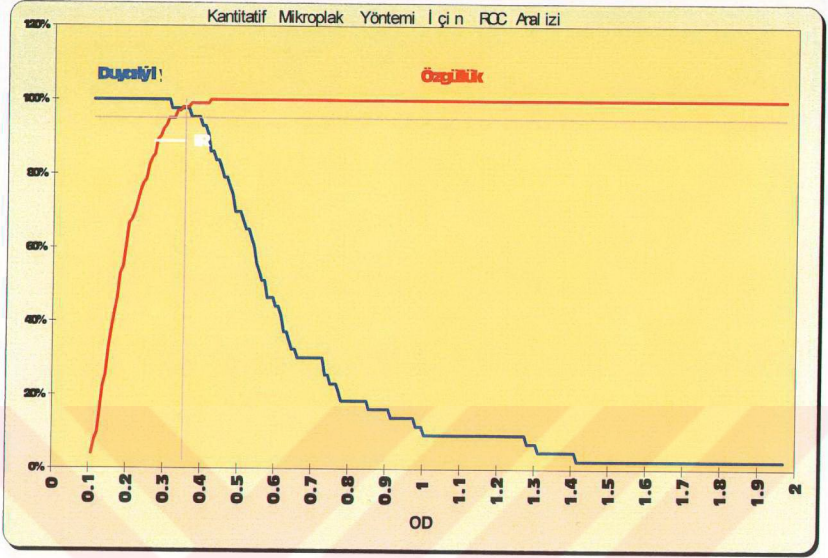
- Bu yöntemde, 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril polistiren doku kültür plakları kullanıldı.
- Test edilecek mikroorganizmalar, koyun kanlı agara tek koloni düşecek şekilde ekilip 24 saat 37 °C de inkübe edildi.
- 3 gr TSB 100 ml distile suda eritilerek, test tüplerine 5'er ml dağıtıldı ve tüplerin ağzı pamukla kapatılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.
- Koyun kanlı agardan alınan koloniler TSB'de 10^5 kob/ml olacak şekilde süspansiyon edildi.
- Bir gecelik inkübasyondan sonra sıvı kültür ortamı taze TSB ile 100 kere sulandırıldı.
- Bu süspansiyondan 0.2 ml alınarak, test edilecek her köken için en az 3 adet olmak üzere, doku kültür plağı kuyucuğuna konuldu.
- Her plakta en az 5 kuyucuğa steril TSB konuldu.
- Doku kültür plaklarının kapakları kapatılarak, buharlaşmayı engellemek amacı ile parafilmle sarılarak, 35 °C etüvde 48 saat inkübe edildi.
- 48 saatlik inkübasyondan sonra her kuyucuğun içeriği otomatik pipetle nazikçe aspire edilerek, iki kez fosfat tamponu (PBS) (pH 7.2) ile yıkandı.

- Kuyucuklar safraninle 2 dakika boyanarak, safranin aspire edildi. Kùltür plakları Micro ELİSA otomatik okuyucuda 490 nm dalga boyunda okutulurak, optik dansiteleri belirlendi. Boş okutma (safraninle boyanmış, steril TSB içeren kuyucuk) sonucu, deney kuyucuklarının sonuçlarından çıkarıldı.
- Her isolat için saptanan üç ayrı okutma değeri ortalaması alındı.

Değerlendirme : Kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime negatif bulunan kökenlerin optik dansite değerlerinin aritmetik ortalaması 0.193, standart sapması 0.065 bulundu. Aritmetik ortalamaya (0.193), 3 standart sapma (bir SS = 0.065) eklenerek, cutt-off seviyesi (0.389) saptandı. OD'si 0.389'un üzerinde olan kökenler slime pozitif, altında olanlar ise slime negatif olarak değerlendirildi. (31)

Bulunan cutt-off seviyesine 2'şer standart sapma eklenerek, slime üretimi kantitatif olarak (+), (+ +) ve (+ + +) olarak değerlendirildi. OD'si 0.389 ile 0.520 olan kökenler (+) , 0.520 ile 0.651 arasında olan kökenler (+ +), 0.651 den büyük olan kökenler ise (+ + +) olarak değerlendirildi.

Cutt-off seviyesi bulmak için, TG-ROC (version 070397e) istatistik programı kullanılarak, ROC analizi yapıldı (grafik 1). ROC analizi diagnostik testlerde en uygun cutt-off seviyesini bulmak için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu yöntemde olası cutt-off seviyeleri için testin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanır. Maksimum duyarlılık ve özgüllüğün saptandığı değer cutt-off seviyesi olarak alınır. Bizim çalışmamızda, kantitatif mikroplak test yöntemi ile belirlenen OD değerleri, kongo kırmızılı agar yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak, ROC analizi yapıldı. 0.309-0.391 OD aralığı maksimum duyarlılık ve özgüllüğün olduğu cutt-off aralığı olarak belirlendi. Aritmetik ortalamaya 3 standart sapma eklendiğinde bulunan cutt-off seviyesinin ROC analizi ile bulunan cutt-off seviyesi ile uygun olması üzerine 0.389 cutt-off seviyesi olarak belirlendi.



Grafik 1: kantitatif mikroplak yöntemi ile elde edilen OD değerlerinin ROC analizi

D) İstatistik analizler

İstatistik testleri için, InStat paket programı (LSU Medical Center 931521S) kullanılmıştır. Değerler arasındaki farklılık, anlam açısından Fisher's exact test ile değerlendirilmiştir.

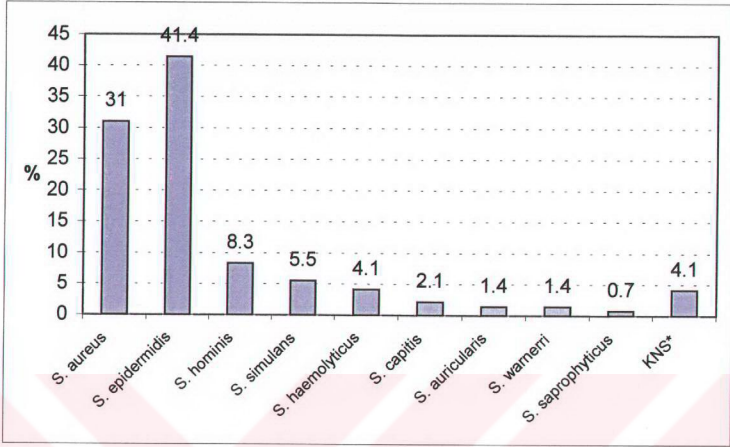
IV. BULGULAR

1- BAKTERİLER

2000-2001 yılları içinde Marmara Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji birimine gelen kan kültürü örneklerinden izole edilen etken 145 stafilkok kökeni ve 2001 yılı içinde laboratuvara gönderilen kan kültür örneklerinden izole edilen ve kontaminasyon olarak değerlendirilen 30 stafilkok kökeni çalışmaya alındı.

Tek kan kültürü şişesinde ve 48-72 saatlik inkübasyondan sonra üreme ile hastada enfeksiyon semptomları olmayışı kontaminasyon kriterleri olarak belirlendi.

Çalışılan 145 kökenden, 45 tanesi *S. aureus*, 60 tanesi *S. epidermidis*, 12 tanesi *S. hominis*, 8 tanesi *S. simulans*, 6 tanesi *S. haemolyticus*, 3 tanesi *S. capitis*, 2 tanesi *S. auricularis*, 2 tanesi *S. warneri*, 1 tanesi *S. saprophyticus* olarak saptandı. 6 tanesi tür bazında identifiye edilemedi (şekil 1)



Şekil 1: Kan kültürlerinden etken olarak izole edilen stafilokokların dağılımı

2- SLİME OLUŞUMU:

145 etken stafilokok kökeninde ve 30 kontaminant stafilokok kökeninde, iki farklı yöntemle, slime üretimi saptanmıştır.

Kongo kırmızılı agar yöntemi ile etken olan stafilokok kökenlerinin 43'ünde (% 29.7) slime üretimi saptanırken, kantitatif mikroplak yöntemi ile stafilokok kökenlerinin 41'inde (%28.3) slime üretimi pozitif bulundu. (Tablo 1)

Tablo 1: İki farklı yöntem ile stafilokok kökenlerinde belirlenen slime oluşturma sıklığı

YÖNTEMLER	Slime Negatif		Slime Pozitif		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	102	70.3	43*	29.7	145	100
Kantitatif Mikroplak Yöntemi	104	71.7	41*	28.3	145	100

* 3 stafilokok kökeninde kongo kırmızılı agar yöntemi ile pozitiflik saptanırken, kantitatif mikroplak yönteminde slime üretimi tespit edilmedi. 1 stafilokok kökeninde kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime üretimi negatif saptanırken, kantitatif plak yönteminde pozitif bulundu.

Her iki yöntem de slime üretiminin saptanması açısından uyumlu bulunmuştur.

Çalışılan etken kökenler içinde 45 *S. aureus* suşunun 11 (%24.4)'inde, 60 *S. epidermidis* suşunun 25 (41.7)'inde, 6 *S. haemolyticus* kökeninin 2 (%33.3)'sinde, 12 *S. hominis* kökeninin 2 (16.7)'sinde, 8 *S. simulans* kökeninin 2 (%25)'inde, slime üretimi pozitif bulunurken, *S. auricularis*, *S. warneri*, *S. capitis* ve *S. saprophyticus* kökenlerinde slime üretimi negatif bulundu. Tablo 2 de görüldüğü gibi, slime üretimi en yüksek % 41.7' lik oranla *S. epidermidis* kökenlerinde saptanmıştır.

Kontaminant 30 stafilokok kökeninden 4 tanesinde (%13.3) slime üretimi saptanırken 26 tanesinde (%86.6) slime üretimi saptanmadı.

Kontaminant stafilokok kökenleri ile etken olan stafilokok kökenleri arasında slime üretimi açısından anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0.05$).

Tablo 2: Stafilokok türlerine göre kökenlerin slime üretme sayı ve yüzdeleri

	Slime		Toplam sayı
	Pozitif sayı (%)	Negatif sayı (%)	
S. aureus	11 (24,4)	34 (75,6)	45
S epidermidis	25 (41.7)	35(58.3)	60
S. hominis	2 (16.7)	10 (83.3)	12
S. simulans	2 (25)	6 (75)	8
S. haemolyticus	2 (33.3)	4 (66.7)	6
S. auricularis	0	2	2
S. capitis	0	3	3
S. warnerri	0	2	2
S. saprophyticus	0	1	1
KNS	1 (16.7)	5 (83.3)	6
Toplam	43 (29.7)	102 (70.3)	145

Kantitatif mikro-plak yöntemiyle stafilokok kökenlerinin slime üretimi yöntemde belirtildiği gibi, (+), (+ +) ve (+ + +) olarak değerlendirildi. Slime üretim miktarı kökenlerin % 32.5'inde (+), % 35'inde (+ +) ve % 32.5'inde de (+ + +) olarak saptandı. Stafilokok kökenlerinin slime üretim miktarları tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Stafilokok türlerinin, kantitatif mikroplak yöntemine göre slime üretim miktarı

	Slime			Toplam sayı
	(+) sayı (%)	(++) sayı (%)	(+++ sayı (%)	
<i>S. aureus</i>	4 (36.4)	5 (45.5)	2 (18.1)	11
<i>S. epidermidis</i>	7 (30.4)	7 (30.4)	9 (39.2)	23
<i>S. hominis</i>	1 (100)	0	0	1
<i>S. simulans</i>	1 (50)	1 (50)	0	2
<i>S. haemolyticus</i>	0	1 (50)	1 (50)	2
<i>S. auricularis</i>	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	0	0	0	0
<i>S. warnerri</i>	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0
KNS	0	0	1 (100)	1
Toplam	13 (32.5)	14 (35)	13 (32.5)	40

Slime üreten *S. aureus* kökenlerinin % 36.4'ü (+), % 45.5'i (++) ve % 18.1'i (+++) slime üretirken, *S. epidermidis* kökenlerinde bu oranlar, % 30.4, %30.4 ve % 39.2 olarak saptanmıştır. Slime üretim miktarları karşılaştırıldığında, *S. epidermidis* kökenlerinin, *S. aureus* kökenlerine göre kantitatif olarak daha fazla miktarda slime ürettiği görülüyorsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

3- ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK

145 Stafilokok kökeni için, ampisilin, sulbaktam-ampisilin, eritromisin, gentamisin, klindamisin, nitrofurantoin, ofloksasin, okzasilin, penisilin, rifampisin, sefazolin, siprofloksasin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX) ve vankomisini içeren 11 antibiyotiğin direnç yüzdeleri tablo 4'te verilmiştir.

Çalışılan antibiyotiklerden vankomisine karşı direnç saptanmamışken, en yüksek direnç oranı penisilin (% 89.7) ve ampisiline (%88.3) karşı bulunmuştur.

Tablo 4: Stafilokok kökenlerinin 15 antibiyotiğe duyarlılık durumları

Antibiyotik	Direnç Yüzdesi
Penisilin	89.7
Ampisilin	88.3
Sulbaktam-ampisilin	54.5
Sefazolin	55.2
Metisilin	54.5
Eritromisin	43.4
Gentamisin	31.7
Klindamisin	29.7
Nitrofurantoin	2.8
Ofloksasin	40.0
Rifampisin	20.0
Siprofloksasin	44.8
Tetrasiklin	39.3
TMP-SMX	33.8
Vankomisin	0.0

S. aureus ve koagulaz negatif stafilocokların 15 antibiyotiğe karşı direnç yüzdeleri tablo 5'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 5: *S. aureus* ve KNS kökenlerinin 15 antibiyotiğe karşı duyarlılık durumları

Antibiyotik	Direnç Yüzdesi	
	<i>S. aureus</i>	KNS
Penisilin	86.7	91
Ampisilin	82.2	91
Sulbaktam-ampisilin	24.4	68
Sefazolin	24.4	69
Metisilin	24.4	68
Eritromisin	20.0	54
Gentamisin	20.0	37
Klindamisin	8.9	39
Nitrofurantoin	2.2	3
Ofloksasin	22.2	48
Rifampisin	20.0	20
Siprofloksasin	22.2	55
Tetrasiklin	37.8	40
TMP-SMX	4.4	47
Vankomisin	0.0	0

KNS kökenleri, *S. aureus* kökenlerine göre, bütün antiyotiklere karşı daha dirençli bulunmuştur. Metisilin direnci *S. aureus* kökenlerinde % 24.4 olarak saptanmış iken, bu oran KNS kökenlerinde % 68 olarak saptanmıştır. Özellikle sulbaktam-ampisilin, sefazolin, metisilin eritromisin ve TMP-SMX'a karşı, *S. aureus* kökenlerindeki direnç yüzdesi KNS kökenlerinin direnç yüzdesine göre, belirgin derecede az bulunmuştur ($p<0.0001$).

Slime pozitifliğinin, tekli antibiyotik direnci ile ilişkisini araştırmak için, slime pozitif ve slime negatif kökenlerde, her antibiyotik için direnç yüzdeleri belirlenerek karşılaştırıldı. Slime üreten ve üretmeyen *S. aureus* ve KNS kökenlerinin, antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6 : Slime pozitif ve slime negatif kökenlerde 15 antibiyotiğe karşı direnç durumu

Antibiyotik	S. aureus			KNS		
	Slime pozitif (%)	Slime negatif (%)	P değerleri	Slime pozitif (%)	Slime negatif (%)	P değerleri
Penisilin	100.0	82	p>0.05	93.8	89.7	p>0.05
Ampisilin	81.8	82	p>0.05	93.8	89.7	p>0.05
Sulbaktam-ampisilin	9.1	29	p>0.05	75.0	64.7	p>0.05
Sefazolin	9.1	29	p>0.05	75.0	66.2	p>0.05
Okzasilin	9.1	29	p>0.05	75.0	64.7	p>0.05
Eritromisin	18.2	21	p>0.05	59.4	51.5	p>0.05
Gentamisin	0.0	26	p>0.05	31.3	39.7	p>0.05
Klindamisin	0.0	12	p>0.05	40.6	38.2	p>0.05
Nitrofurantoin	0.0	3	p>0.05	3.1	2.9	p>0.05
Ofloksasilin	0.0	29	p>0.05	68.8	38.2	p<0.05
Rifampisin	0.0	26	p>0.05	15.6	22.1	p>0.05
Siprofloksasin	0.0	29	p>0.05	78.1	44.1	p<0.05
Tetrasiklin	18.2	44	p>0.05	40.6	39.7	p>0.05
TMP-SMX	9.1	3	p>0.05	50.0	45.6	p>0.05
Vankomisin	0.0	0	p>0.05	0.0	0.0	p>0.05

S. aureus'ta slime üreten kökenlerin penisilin ve TMP-SMX'e karşı direnç yüzdeleri slime üretmeyen *S. aureus* kökenlerine karşı yüksek bulunurken (sırayla, % 100'e karşı % 82 ve % 9.1'e karşı % 3), diğer 12 antibiyotik için

slime üretmeyen *S. aureus* kökenlerindeki direnç yüzdesi, slime üreten *S. aureus* kökenlerine oranla daha yüksek bulunmuştur.

KNS kökenlerinde gentamisin ve rifampisin hariç, diğer antibiyotiklere karşı direnç yüzdesi, slime pozitif grupta, slime negatif gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Gentamisin direnci, % 39.7 ye karşılık % 31.3 oranında ve rifampisin direnci %22.1'e karşılık %15.6 oranında, slime negatif grupta daha yüksek saptanmıştır.

KNS kökenlerinde, slime pozitif gruptaki siprofloksasin ve oflofloksasine karşı direnç, slime negatif gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

2 ve daha fazla antibiyotiğe karşı olan direnç, çoklu antibiyotik direnci olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda 5 ve daha fazla antibiyotiğe dirençli olan kökenler çoklu antibiyotik direnci olan kökenler olarak tanımlandı ve slime pozitifliğinin, çoklu antibiyotik direnci ile ilişkisini araştırmak için, slime pozitif ve slime negatif kökenlerde, çoklu antibiyotik direnç yüzdeleri belirlenerek karşılaştırıldı. Slime üreten ve üretmeyen *S. aureus* ve KNS kökenlerinin, çoklu antibiyotik direnç yüzdeleri tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7 : *S. aureus* ve KNS kökenlerinin, çoklu antibiyotiklere direnç durumu

	Slime pozitif sayı (%)	Slime negatif sayı (%)	P değeri
S. aureus	1 (% 9.1)	10 (% 29.4)	p>0.05
KNS	28 (% 90.6)	46 (%67.6)	p<0.05

Slime pozitif 11 *S. aureus* kökeninden 1 tanesinde (%9.1) çoklu antibiyotik direnci pozitif bulunmuştur. Slime negatif 34 *S. aureus* kökeninden ise 10 tanesinde (% 29.4) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır.

KNS kökenlerinde; slime pozitif gruptaki 32 kökenden 28'inde (% 90.6) çoklu antibiyotik direnci saptanırken, slime negatif gruptaki 68 kökenden 46'sında (%67.6) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır.

KNS kökenlerinde slime pozitif gruptaki çoklu antibiyotik direnci, slime negatif gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

Slime üreten KNS kökenlerinde, üretilen slime miktarının antibiyotik direnci ile ilişkisini araştırmak için, slime üretim miktarları (+), (+ +) ve (+ + +) olarak belirlenerek, 15 antibiyotiğe karşı direnç yüzdeleri karşılaştırıldı. KNS kökenlerinin slime üretim miktarları ile antibiyotik direnç yüzdeleri arasındaki ilişki tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: KNS kökenlerinin slime üretim miktarları ve antibiyotik direnç durumları

Antibiyotik	Slime üretim miktarı			
	(-)	(+)	(+ +)	(+ + +)
Penisilin	89.7	100.0	90	90.9
Ampisilin	89.7	100.0	90	90.9
Sulbaktam-ampisilin	64.7	77.8	60	81.8
Sefozolin	66.2	77.8	60	81.8
Metisilin	64.7	77.8	60	81.8
Eritromisin	51.5	66.7	60	45.4
Gentamisin	39.7	33.3	20	27.2
Klindamisin	38.2	55.6	30	27.2
Nitrofurantoin	2.9	0.0	10	0
Ofloksasilin	38.2	66.7	60	72.7
Rifampisin	22.1	22.2	10	18.1
Siprofloksasin	44.1	88.9	60	81.8
Tetrasiklin	39.7	22.2	50	54.5
TMP-SMX	45.6	55.6	50	36.3
Vankomisin	0.0	0.0	0	0

KNS izolatlarının oluşturdukları slime miktarı ile, antibiyotik direnç yüzdeleri tablo 8'de karşılaştırılmıştır. Tetrasiklin dışında çalışılan diğer antibiyotikler için slime üretim miktarı ile direnç durumu arasında bir korrelasyon saptanamamıştır.

V. TARTIŞMA

Son yıllarda yayınlanan çalışmalar koagulaz negatif stafilokokların, özellikle hastane kaynaklı bakteriyemilere en sık neden olan mikroorganizma olduğunu göstermektedir (4). KNS'lar kan kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizmadır ama bu izolatların %85'i kontaminasyondur (32). KNS'lar insan kalıcı cilt florasının en yaygın yesi oldukları için (5), genellikle kan kültürü için örnek alımı sırasında örnekleri kontamine ederler. Kontaminant olarak sıklıkla izole edilmelerine rağmen KNS'lar, günümüzde önemli hastane kaynaklı patojenler haline gelmiştir (32). Bunun nedenleri arasında, gittikçe artan sayıda ve uzun süre kullanılan intravenöz kateterler, protez kalp kapakçıkları, vasküler greftler gibi tıbbi aletlerin (32) yanısıra, vasküler kateterlere ihtiyaç duyan immün kompromize ve ntrogenik hastaların sayısında artış olması sayılabilir (4).

Böyle bir durumda, kan kültüründe koagulaz negatif bir stafilokokun üremesi halinde karar vermek gerek klinisyen gerekse mikrobiyolog için oldukça zorlařmaktadır, çünkü izole edilen mikroorganizma bakteriyemi ve/veya sepsis nedeni olabileceği gibi, kontaminasyon da olabilir. Sepsis veya bakteriyemi durumunda gecikmeden antibiyotik tedavisine bařlamak zorunlu iken, kontaminasyon durumunda tedaviye gerek yoktur.

Yukarıda belirtilen durumların ayırdedilebilmesi için çeşitli klinik ve laboratuvar parametrelerin değeri önem taşımakta ve pek çok çalışma ile de araştırılmaktadır. Günümüzde KNS'ların kontaminant mı yoksa patojen mi olduğunu anlamada řu kriterler kullanılmaktadır: [1] Genelde ilk 48 saat içinde

üreme, [2] birden fazla pozitif kan kültürü, [3] hastada enfeksiyon semptomları, [4] 3 gün veya daha fazla yerinde kalan intravenöz kateter ve [5] izole edilen KNS kökeninin çoklu antibiyotik direnci içermesi etken olduğunu gösterir (15).

Günümüzde kontaminant ve patojen ayırımı yapmada kullanılan yöntemlerin hem tanımlanması iyi yapılamamıştır, hem de yeterli değildir. Gerçek hastalık etkeni olan KNS'ların belirlenmesinde bir başka yaklaşım virulans faktörlerinin belirlenmesidir. Bu konuda en çok çalışılan ise slime üretiminin saptanmasıdır (6).

Slime üretimi Christesen metodu (kalitatif makro method), kongo kırmızılı agar yöntemi ve kantitatif mikro method olmak üzere üç farklı yöntemle saptanabilmektedir (29,31). Yapılan çeşitli çalışmalarda, Chiristesen yöntemi ile karşılaştırıldığında, diğer iki yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü % 85 ile % 100 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (29,31,33,46).

Bu çalışmada, kongo kırmızılı agar yöntemi ve kantitatif plak yöntemi kullanılarak stafilokok izolatlarında slime üretimi araştırılmıştır. 145 stafilokok kökeninin, kongo kırmızılı agar yöntemi ile % 29.7'sinin, kantitatif plak yöntemi ile % 28.3'ünün slime ürettiği saptanmıştır. Kongo kırmızılı agar yöntemi referans test olarak alındığında, kantitatif mikroplak yönteminin duyarlılığı %93 özgüllüğü ise %99 bulunmuştur. Bu iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında slime pozitifliğini belirleme açısından belirgin bir istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Mikrodilüsyon plak yönteminin avantajı değerlendirmenin objektif kriterlere göre yapılabilmesidir; kongo kırmızılı agar yönteminde olduğu gibi testi okuyan kişinin yorumuna bağlı değildir ve kantitatif bir değerlendirme yöntemidir.

Slime üretimi etkenin virulansını gösteren bir parametre olduğu için, en uygun test yönteminin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bunun için rutin

laboratuvar koşullarında yapılabilecek pratik, ekonomik ve kısa sürede sonuç alınabilecek bir yöntem ihtiyacı vardır. Çalışma sonuçlarımıza göre, kongo kırmızılı agar yöntemi rutin laboratuvarlarda kullanılabilir en uygun test olarak görülmektedir.

Bazı çalışmalarda, kandan izole edilen ve etken kabul edilen KNS'ların, gene kandan izole edilen ve kontaminant olarak düşünülen KNS'lara göre daha fazla oranda slime oluşturdıkları gözlemlenmiştir (34). Benzer şekilde çeşitli enfeksiyonlardan izole edilen stafilokok türlerinin de kontaminant olan veya normal floradan izole edilen kökenlere göre daha sık slime oluşturdıkları yayınlanmıştır (35,36).

Hastalık etkeni olma ve slime üretimi arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere, etken olduğu düşünülen 145 stafilokok kökeni ile kontaminant olarak düşünülen 30 stafilokok kökeni slime üretimi açısından araştırılmıştır. Hastalık kökeni olan stafilokokların % 29.7'sinde (KNS kökenlerinde %32, *S. aureus* kökenlerinde %24.4) kontaminant olan kökenlerin ise % 13.3'ünde slime üretimi saptanmıştır. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, kan kültürlerinden izole edilen KNS kökenlerinin kontaminant mı patojen mi olduğunu ayırmada kullanılan klinik ve laboratuvar bulgulara ek olarak slime üretiminin de kullanılabilirliğini göstermektedir.

S. aureus kökenlerinin slime üretimi konusunda literatürde çelişkili yayınlar vardır. Şöyle ki; 1993 yılında Nourizadeh ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, 50 koagülaz pozitif stafilokok kökeninde üç farklı yöntemle slime üretimi araştırılmıştır. Kullanılan üç farklı yöntemle de koagülaz pozitif stafilokok kökenlerinin hiç birisinde slime üretimi saptanamamıştır(46) buna rağmen, Çek Cumhuriyetinden bildirilen ve kan kültürü izolatlarında slime üretiminin incelendiği çalışmada *S. aureus* kökenlerinde %56.2 lik oranla slime üretimi saptanmıştır (34). Ammendolla ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, *S. aureus* kökenlerinde slime üretimi %88.9 olarak tespit edilmiştir(18). Bu çalışmada ise *S. aureus* kökenlerindeki slime üretimi %24.4

bulunmuştur. Kan kültürü örneklerinden izole edilen bütün *S. aureus* kökenleri etken olarak kabul edildiği için (15,16), *S. aureus* için kontaminant bir kontrol grubu oluşturulamamıştır. Çalışılan *S. aureus* kökenlerinin sayısının az olması, kontaminant kontrol grubu oluşturulamaması ve literatürdeki çelişkili yayınlar nedeniyle, *S. aureus* kökenleri için slime üretiminin bir virulans faktörü olup olmadığı konusunda fikrimiz olamamıştır.

Ammendola ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *S. aureus* kökenlerinde %90'a varan oranlarda slime üretiminin saptanmasının (bizim yapmış olduğumuz çalışmada %24.4 bulunmuştur), uygulanan yöntem farkından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Onların yapmış olduğu çalışmada, doku kültür plakları, PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat 60 °C'de kurutulmuş ve Hucker kristal viyole boyası ile boyanmıştır (18). Christensen ve arkadaşlarının 1985 yılında yapmış oldukları çalışmada ve benzer şekilde Steer ve arkadaşlarının 1997 yılında yapmış oldukları çalışmada, kristal viyolenin slime varlığı veya yokluğunda, bütün bakteri hücrelerini boyadığı gösterilmiştir. Her iki çalışmada da yazarlar, kristal viyole ile boyanan bakteri filmlerinin optik dansitelerinin, plaktaki slime miktarını değil, plağa yapışmış olan bakterilerin konsantrasyonlarını gösterdiğini söylemektedirler (37,38). Araştırmacılar tarafından doku kültür plaklarının Bouin fiksativi veya 60 °C havada fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanmaları, bakteri adreansı ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (37,38,39). Sonuç olarak Ammendola ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, bahsedilen çalışmalar göz önüne alındığında, slime üretimi değil, bakterinin adheransının ölçülmüş olduğunu düşünmekteyiz.

S. epidermidis kökenlerinde saptamış olduğumuz %41.7'lik slime üretimi, önceden yayınlanan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Votova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *S. epidermidis* kökenlerinde slime üretimi %26.4 saptanmıştır (34). Ammendolia ve arkadaşları bu oranı %66.7 olarak bulmuşlardır (18). Türkiye'de

farklı merkezlerde yapılan çalışmalarda KNS kökenlerinin slime üretme oranları % 18.9 ile % 53 arasında bulunmuştur(46,47,48)

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada etken KNS kökenlerindeki slime üretimi %32 bulunmuş olup bu oran kontaminant KNS kökenlerinde %13.3 olarak saptanmıştır. İstatiksel olarak anlamlı olan bu fark ($p<0.05$), slime üretiminin KNS'lar için bir virulans faktörü olduğunu göstermektedir.

Tüm dünyada KNS'lar, hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinde birinci sırada yer almaktadır (5). KNS'lar *S. aureus* ile birlikte , hastane kaynaklı bakteremilerin %43 ile %49'unu oluşturmaktadır(1,2,40). Hastane kaynaklı enfeksiyon sıklığı artmakla kalmayıp, etken olan patojenlerin antibiyotik dirençleri de gittikçe artmaktadır yani direnç gelişimi ile hastane kaynaklı enfeksiyon sıklığındaki artış arasında bir paralellik saptanmaktadır(2). Özellikle metisilin direncindeki artış hastaneler için büyük sorun teşkil etmektedir. Metisiline dirençli stafilokoklar, sadece beta-laktam antibiyotiklere değil başka pek çok antibiyotiğe de dirençlidirler (5,12,41).

Antimikrobiyal ajanlara dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve seleksiyona uğramasında, antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanılması en önemli faktördür (41). Metisiline dirençli kökenlerin neden olduğu hastane kaynaklı kan yolu enfeksiyonları için önceden aşırı derecede kullanılan antibiyotiklerin yanısıra, hastanede uzun süreli yatış, santral venöz kateter kullanımı ve MRSA ile nasal kolonizasyon da risk faktörleri arasında belirtilmiştir (1).

Amerikada Birleşik Devletleri'nde hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen KNS'ların %80'i metisiline dirençli bulunurken bu oran *S. aureus* için % 30 bulunmuştur. Sadece son yirmi yıllık süre içinde, metisilin direncindeki artış 15 kata varmaktadır (2). Ülkemizde değişik hastanelerde yapılan çalışmalarda metisilin direnci %16 ile %52 arasında saptanmıştır (12).

Bizim çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* kökenlerindeki metisilin direnci %24.4, KNS'larda ise bu oran % 68 olarak tespit edilmiştir. Penisilin, ampisilin, nitrofurantoin, rifampisin ve tetrasikline karşı direnç her iki grupta da benzer oranlarda iken, diğer antibiyotikler için KNS'lar *S. aureus*'a göre daha dirençli saptanmıştır.

S. aureus'un slime üreten ve üretmeyen kökenleri, antibiyotik dirençleri açısından karşılaştırıldığında, penisilin ve TMP-SMX 'e karşı slime üreten grupta direnç daha fazla saptanmışken, diğer antibiyotiklere karşı slime üretmeyen gruptaki kökenlerin direnç oranları daha yüksek bulunmuştur. Literatürde slime üreten *S. aureus* kökenlerinin antibiyotik direnci ile ilgili yayın olmaması ve çalışılan köken sayısının azlığı *S. aureus* kökenlerinde slime üretiminin antibiyotik direnci ile ilişkisi üzerine yorum yapmamızı güçleştirmektedir. Sonuçlarımız, *S. aureus* kökenlerinde slime üretiminin antibiyotik direnci ile ilişkisi olmadığını düşündürse de bu konuda daha fazla kökenle çalışma yapılması gerektiği açıktır.

Çeşitli çalışmalarda, KNS'larda slime üretiminin artan direnç ile korrelasyon gösterdiği bildirilerek, slime üretiminin mikroorganizmaları çevreleyen bir bariyer oluşturarak bu yolla antibiyotiklere direnç geliştiği belirtilmiştir (10,24). Boussard ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, slime üretmeyen KNS'ların test edilen bütün antibiyotiklere karşı daha duyarlı oldukları saptanırken, slime üreten kökenlerin en az yedi antibiyotiğe dirençli oldukları tespit edilmiştir (42). Kornea ülserlerinden izole edilen ve slime üreten KNS'larda, 3 veya daha fazla antibiyotiğe %82.9 oranında direnç saptanırken, bu oran slime üretmeyen kontrol kökenlerde %18.4 olarak saptanmıştır (36). Farber ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da *S. epidermidis* kökenlerinin üretmiş olduğu slime'in, glikopeptid antibiyotiklerin etkisini azalttığı gösterilmiştir (43). Benzer şekilde, Souli ve arkadaşları da KNS'ların ürettiği slime'in glikopeptid antibiyotiklerin etkinliklerini azalttığı, rifampisin, klindamisin ve makrolidlerin aktivitesinde değişiklik yaratmadığını bulmuşlardır (44). Günaydın ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, slime üreten KNS kökenlerinde

gentamisin, rifampin, norfloksasin ve siprofloksasin direnci slime üretmeyen KNS kökenlerine göre daha yüksek saptanmıştır (47).

Araştırmamızda, slime üreten KNS'larda, gentamisin ve rifampisin hariç, çalışılan diğer antibiyotiklere karşı, daha yüksek direnç oranları saptanmıştır. Antibiyotikler tek tek ele alındığında, slime üreten KNS'larda siprofloksasin ve ofloksasine karşı olan direnç oranları, slime üretmeyen KNS'lara karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.004$). Diğer antibiyotiklere karşı olan direnç, slime üreten grupta yüksek bulunsa da fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Slime üreten ve üretmeyen KNS'ların çoklu antibiyotik dirençleri (5 ve daha fazla antibiyotiğe karşı direnç) karşılaştırıldığında, slime üreten grupta %90 bulunan çoklu antibiyotik direnci slime üretmeyen grupta % 67.6 bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p=0.027$)

Souli ve arkadaşları, biofilm üreten bakterilerin antibiyotiklere karşı azalmış olan hassasiyetlerinin nedeninin tam olarak bilinmemesine rağmen, biofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı bir diffüzyon bariyeri oluşturduğunu, ve düşük üreme hızı ve bu hücrelerin atipik fenotipine bağlı olarak, bakterilerin değişen fizyolojisinin antibiyotik direncini artırdığını ileri sürmektedirler. Yapmış oldukları çalışmada, bazı antibakteriyel ajanlara karşı oluşan dirençte, stafilokokların üretmiş olduğu slime'in sorumlu olduğunu bulmuşlardır (23). Benzer şekilde, Farber ve arkadaşları, stafilokoklarda vankomisine karşı in-vitro direncin çok nadir olmasına rağmen yabancı cisim enfeksiyonlarının vankomisinin tedavisine iyi cevap vermediğini belirterek, vankomisine karşı in-vivo azalmış duyarlılığın, ekstrasellüler slime'in içinde yer alan polisakkaritlere bağlı olduğunu öne sürmektedirler(43).

Yapmış olduğumuz çalışmada kantitatif olarak slime üretim miktarları ile antibiyotik dirençlerini karşılaştırdığımızda, tetrasiklin dışında çalışılan diğer antibiyotikler için, artan slime üretim miktarları ile antibiyotik direnci arasında bir

korrelasyon saptanamamıştır. (+ + +) slime üreten kökenlerin antibiyotiklere olan direnç yüzdesi çoğu zaman (+) ve/veya (+ +) slime üreten kökenlerin direnç yüzdelerinden düşük bulunmuştur. Her ne kadar çalışılan köken sayısı bu karşılaştırmayı yapacak kadar fazla değilse de, sonuçlarımız antibiyotik direnci gelişmesinde (özellikle çoklu antibiyotik direnci) mikroorganizmanın sadece slime üretmesinin yeterli olduğunu göstermektedir. Bu yüzden rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında pratik, ucuz ve kısa sürede sonuç alınabilmesi bakımından, kongo kırmızılı agar yönteminin kullanılabileceğini, kantitatif slime tespitinin gerekli olmadığını düşünmekteyiz.



SONUÇ:

2000-2001 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesine gelen kan kültürü örneklerinden izole edilen 145 etken stafilocok kökeni ile 30 kontaminant stafilocok kökeni çalışılmıştır.

Kan kültürü izolatlarında *S. epidermidis* %41.4'lük oranla ilk sırada yer almaktadır, bunu % 31'lik oranla *S. aureus* takip etmektedir.

Slime üretimi *S. aureus* kökenlerinde %24.4 ile düşük düzeyde saptanmışken, *S. epidermidis* kökenleri %41.7 ile en sık slime üreten stafilocok türü olarak saptanmıştır.

Kontaminant KNS kökenlerinde slime pozitifliği %13.3 olarak saptanmış ve etken stafilocok kökenleri ile karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Kontaminant *S. aureus* kökenleri ile karşılaştırma olanağı olmadığından ve sayı azlığından, slime üretiminin *S. aureus* kökenleri için bir virulans faktörü olup olmadığı konusunda herhangi bir karara varılamamıştır.

Slime üretimi iki farklı yöntemle çalışılmıştır ve kullanılan yöntemler arasında slime pozitifliğini saptamak açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$)

Bu yöntemlerden kongo kırmızılı agar yöntemi, kısa sürede sonuç vermesi ve pratik olması nedeni ile rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek bir test olarak değerlendirilmiştir.

Antibiyotiklerden siproloksasin ve ofloksasine karşı direnç slime üreten grupta, slime üretmeyen gruba karşı daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Slime üreten KNS'lar, slime üretmeyen kökenlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede çoklu antibiyotik direncine sahiptir.

VI. ÖZET

Günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonların etkenleri arasında stafilocoklar başta gelmektedir. Gittikçe artan sayılarda protez tıbbi aletlerin ve kataterlerin kullanılması, yabancı cisime bağlı enfeksiyonların da artmasına yol açmıştır. KNS'ların gerçek enfeksiyon etkeni ya da kontaminant olup olmadığının belirlenmesi önemli bir problem olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen stafilocok türleri kullanılarak, stafilocokların ürettiği slime'in, etken ve kontaminant ayrımında kullanıp kullanılmayacağı belirlenmeye çalışılmış, slime üretiminin antibiyotik direnci üzerindeki etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

Çalışmaya 145 etken stafilocok kökeni ve 30 kontaminant KNS kökeni alınmıştır. Slime üretimi kongo kırmızılı agar ve kantitatif mikropalak yöntemi ile çalışılmıştır. Yöntemler arasında slime üretimini saptama açısından bir fark saptanmamıştır.

Kan kültürlerinden etken olarak izole edilen stafilocok kökenleri arasında slime üretimi % 29.7 (*S. epidermidis* kökenlerinde %41.7, *S. aureus* kökenlerinde %24.4) olarak saptanmıştır. Kontaminant kökenlerde bu oran %13.3 olarak saptanmıştır. Etken stafilocok kökenleri ile kontaminant stafilocok kökenleri arasında, slime üretimindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Slime üreten KNS kökenlerinde ofloksasin ve siprofloksasine karşı anlamlı derecede artmış direnç saptanmıştır. Diğer antibiyotikler için aradaki fark anlamlı bulunmamıştır.

S. aureus kökenlerinde slime üretimi ile antibiyotik direncini arasında korrelasyon saptanmaz iken, slime üreten KNS kökenlerindeki çoklu antibiyotik direnci istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

VII. SUMMARY

Staphylococci are the most common microorganism isolated from nosocomial infections. Due to increasing use of prosthetic medical devices and catheter, prosthetic device related infections and nosocomial bacteremia become major problem in hospitals. Due to the fact that, coagulase negative staphylococci (CNS) are members normal body flora, it is difficult to make a decision whether the isolated microorganism is mere contaminant or a real pathogen.

In this study, blood culture isolates of staphylococcus species are used for determination of slime production and it is examined whether slime production can be used for discrimination between contaminant and true pathogen and relationship between slime production and antibiotic sensitivity were studied.

145 pathogen Staphylococcus species and 30 contaminant CNS species were studied. Slime production was determined by congo red agar method and quantitative micro-plate method. We could not find any difference between two methods.

Slime production was found 29.7 % (it is 41.7% for *S. epidermidis* and 24.4% for *S. aureus*) among pathogen blood culture isolates of staphylococci whereas slime production was found just 13.3% of contaminant CNS. For slime production a statistically significant correlation was found between contaminant and pathogen staphylococci species ($p < 0.05$).

Ofloxacin and ciprofloxacin resistance in slime producing CNS species was significantly increased compared to non-slime producing species. For other antibiotics, the difference was not significant.

Although no correlation was detected between slime production and antibiotic resistance for *S. aureus*, multi drug resistance in slime producing CNS was significantly increased.

VIII. KAYNAKLAR

1. Karchmer W. Adolf : Nosocomial Bloodstream infections : Organisms, Risk Factors, and Implications. Clin. Infect. Dis. 2000: 31(suppl 4): 139-143
2. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP : Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a 3-year analysis. Clin Infect. Dis 1999: 29: 239-244
3. Drozenova J, Petras P. Characteristics of coagulase negative staphylococci isolated from hemocultures. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2000 Apr: 49(2): 51-58
4. Issam R, Amin A, Kenneth R : Staphylococcus epidermidis: Emerging resistance and need for alternative agents. Clin Infect Dis. 1998; 26: 1182-7
5. Archer GL : Staphylococcus epidermidis and other coagulase negative staphylococci: Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practice of infectious disease. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R: 1995 4th edition 1777-84. Churchill Livingstone
6. Rupp ME, Archer GL: Coagulase negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin.Infect. Dis 1994; 19: 231-245
7. Weinstein MP, Towns ML, Qarthey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB : 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
8. Zaidi AKM,Harrel LJ, Rost JR, Reller LB : Assessment of similarity among coagulase negative staphylococci from sequential blood cultures of

- neonates and children by pulse-field gel electrophoresis. J Infect Dis 1996; 174: 1010-4
9. Baldassarri L, Simpson WA, Donelli G, Christensen GD: Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. Eur J Clin Microbiol Infect Dis : 1993; 12: 866-868
 10. Rodney MD : Biofilm formation : A clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis. 2001 ; 33 :1387-92
 11. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD: Staphylococci. Lippincott's Illustrated Microbiology. Harwey AR, Champe PA: Lippincott Williams and Wilkins. 2001 :137-145
 12. Ünal S, Akhan S A : Stafilokok infeksiyonları. İnfeksiyon Hastalıkları. Topçu A W, Söyletir G, Doğanay M : Nobel Tıp Kitabevi.1996 : 773-781
 13. Waldvogel FA : Staphylococcus aureus (including toxic shock syndrome). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practice of infectious disease. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R: 1995 4th edition 1754-76. Churchill Livingstone 1754-76
 14. Silva HL, Strabelli TM, Cunha ER, Neres SF, Camargo LF, Uip DE: Nosocomial coagulase negative staphylococci bacteremia: five year prospective data collection. Braz J Infect Dis. 2000 ; Dec; 4(6) : 271-4
 15. APP 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases, 25th ed. 2000.
 16. Jain A, Daum RS: Staphylococcus infections in children: part 1. Pediatrics in Review 1999; (20): 6: 183-191

17. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM : Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.
Clin Microbiol Rew 2000 ; jan 16-34
18. Ammendolia M G, Rosa R, Montanaro L, Arciola C R, Baldassarri L: Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. J Clin Microbiol 1999; Oct : 3235-3238
19. Deresiewicz L, Parsonnet J: *Staphylococcus* infections. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th edition Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JD, Kasper DL, Hauser, Mc Graw Hill : 1998 s.875-885
20. Raad I, Darouiche R, Hachem R, Sacilowski M, Bodey GP : Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. Antimicrob Agents Chemother. 1995 : Nov ; 2397-2400
21. Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, Nguyen T : Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 193-99
22. Raad II : The pathogenesis and prevention of central venous catheter-related infections. Middle East J Anesthesiol 1994 ; Feb 12(4) : 31-403
23. Rupp ME, Hamer KE: Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrobiol Chemotherapy 1998; 41: 155-161
24. König C, Schwank S, Blaser J: Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 20-26

25. Noble MA, Grant SK, Hajen E: Characterization of a neutrophil inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1990; 162: 909-913
26. Patrick CC, Plaunt MR, Hetherington SV, May SM : Role of *Staphylococcus epidermidis* slime layer in experimental tunnel tract infections. *Infect Immun* 1992; Apr : 1363-67
27. Handersen DK : Bacteremia due to percutaneous intravascular devices : Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practice of infectious disease. Fourth edition. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds.) Churchill Livingstone, New York. 1995, 2587-2599
28. Sonnenwirth AC: Stains and staining procedures: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Sonnenwirth AC, Jewitt L: 1980 8th edition 1378-1380. Mosby Company
29. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT: new method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872-874
30. Baselga R, Albizu I, Cruz M, Cacho E, Barberan M, Amorena B : Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun* 1993; Nov: 4857-4862
31. Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barret M, Koontz F, Massanari RM: Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase negative staphylococci. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1988; 30-33
32. Weinstein MP, Mirret S, Pelt LV, McKinnon M, Zimmer B, Kloos W, Reller BL: Clinical importance of identifying coagulase negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of microscan rapid and dried

- overnight gram positive panels versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7), July 2089-2092
33. Woznicova V, Votava M, Skalka B : Comparision of 2 methods of detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1993; Jun: 42(2) :51-53
34. Votava M, Woznicova V : Production of slime by staphylococcal isolates from blood cultures. *Cent Eur J Public Health* 2000; feb : 8(1):18-20
35. Vegh Z, Gacs M : correlation of slime production and pathogenicity of coagulase negative staphylococci. *Orv Hetil* 1990 ; Feb :4: 131(5) : 231-4
36. Nayak N, Satpathy G: Slime production as a virulence factor in *Staphylococcus epidermidis* isolated from bacterial keratitis. *Indian J Med Res* 2000; Jan; 111:6-10
37. 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* 1985; Dec :996-1006
38. 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* 1997; 37: 305-316
39. Rupp ME, Hamer KE: Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 1998; 41: 155-161

40. Richards M J, Edwards J R, Culver D H, Gaynes R P: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. Crit Care Med 1999; 27(5): 887-893
41. Smith T, Jarvis W R: antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus. Microbes and Infect : 1999; 795-805
42. Boussard P, Pithsy A, Devleeschouwer M J: Relationship between slime production, antibiotic sensivity and the phagetype of coagulase-negative staphylococci. J Clin Pharm Therap 1993; 18: 271-274
43. Farber B F, Kaplan M H, Clogston A G: Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. J Infect Dis 1990; 161: 37-40
44. Souli M, Giamarellou H: Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1998; Apr : 939-941
45. Quine PG, Belani KK: Coagulase negative staphylococcal adherence and persistence. J Infect Dis 1987; 156(4): 543-547
46. Nourizadeh E, Sultan N: Koagulaz negatif stafilokoklarda slaym(slime) faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi. Enfeksiyon Dergisi 1993; 7(1-2): 31-34
47. Günaydın M. Leblebicioğlu H, Saniç A, Prinççiler M: Koagulaz-negatif stafilokoklarda slime yapımı ve antibiyotik direnci ile ilişkisi. Mikrobiyoloji Bülteni 1995; 29 (1): 26-31

48. Fındık D, Tuncer İ, Kalođlu G: Çeşitli klinik örneklere izole edilen koagula negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve slime faktör üretimine karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bilteni 1996; 30 (1): 19-24

