

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOAGÜLAZ NEGATİF
STAFİLOKOKLARDA SLİME YAPIMININ
ARAŞTIRILMASI

Nuray YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2003

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOAGÜLAZ NEGATİF
STAFİLOKOKLARDA SLİME YAPIMININ
ARAŞTIRILMASI

Nuray YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

GEBZE
2003

ÖZET

Bu çalışmada; koagülaz negatif stafilokokların (KNS) slime üretiminin antimikrobiyal ajanlar üzerindeki etkisini incelenmesi amaçlanmıştır.

KNS büyüme esnasında çevreye devamlı slime maddesi salgılar. Aslında bu viskoz polisakkarit slime bakterinin etrafını sarar.

KNS'ların slime üretimi ve adezyonu implantlarda ve prostetik kalp kapakcıklarında, vasküler greft ve invaziv vasküler kateterlerinde, serebrospinal fluid şantlarda, ortopedik implant, peritoneal diyaliz kateterlerinde, göğüse ait protezlerde ve idrar yollarında enfeksiyonlarında gözlemlenir. Slime üreten KNS suşlarının daha virulans, antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli oldukları açıklanmıştır.

Bu çalışmada çeşitli klinik numunelerden izole edilen KNS'larda slime üretimini araştırılmıştır. Değerlendirmeye alınan KNS'ların 25'i (% 27,8) idrar, 39'u (% 43,3) kan, 15'i (% 16,7) kateter, 4'ü (% 4,4) deri, 1'i (% 1,1) abse, 4'ü (% 4,4) boğaz, 1'i (% 1,1) burun ve 1'i (% 1,1) mayi numunelerinden izole edilmiştir.

Slime üreten suşlar; Kongo kırmızısı yöntemi ile % 84,4, makro-tüp yöntemi ile % 75,6 ve mikrolept yöntemiyle % 75,6 oranında saptanmıştır. Bu üç yöntem arasında duyarlılık ve özgüllük açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Antibiyotiklere karşı dirençlilik oranı slime pozitif gruplarda, slime negatif gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Bazı antibiyotiklerde bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Yalnız üç antibiyotikte dirençlilik oranı slime pozitif suşlarda, slime negatif suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu antibiyotikler şunlardır; oksasilin, kloramfenikol ve levofloksasin antibiyotikleridir ($p<0.05$).

SUMMARY

The aim of this study to examine the effect of slime production on antimicrobial agents by CNS.

CNS secreted slime substance continuously into their environment during growth. The viscous secreted polysaccharide slime surrounds the bacteria in fact.

Slime production and adhesion of CNS is major cause infections associated with implants and medical devices such as prosthetic heart valves, vascular grafts and invasive vascular catheters, cerebrospinal fluid shunts, orthopedic implants, urinary tract and peritoneal dialysis catheters and mammary prostheses. Slime factor positive CNS strains were reported more virulent and resistant to antimicrobial agents.

We investigated slime production of Coagulase Negative Staphylococci (CNS) isolated from different clinical samples. A total of CNS with consist of 25 (27,8 %) urine, 39 (43,3 %) blood, 15 (16,7 %) catheter, 4 (4,4 %) skin, 1 (1,1 %) abscess, 4 (4,4 %) throat, 1 (1,1 %) nose and 1 (1,1 %) liquid.

The rate of slime factor production was found as 84,4 % with congo red agar 75,6 % with macro-tube method and 75,6 % with microplate method. No statistically significant difference in sensitivity and specificity has been found among the methods.

Higher resistance rates were observed in slime positive groups than that of slime negative groups. In some antibiotics, there isn't statistically significant difference between slime positive strains and slime negative strains by resistance to antibiotics ($p > 0,05$). But, statistically significant difference in resistance to three antibiotics has been founds between slime positive strains and slime negative strains ($p < 0,05$). These antibiotics; oxacillin, chloramphenicol and levofloxacin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince, bana gerekli tüm kolaylıkları sağlayan, yol gösteren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN'e, Bölüm Başkanı Hocam Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım diğer hocalarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

GATA İstanbul, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı Uzm. Dr. Tbp. Kd. Alb. Ali Erdemoğlu'na tezimin hazırlamamda laboratuvar imkanlarını kullanmama müsaade ettikleri için, Lab. Şerife Yıldız'a, Lab. Banu Erişen'e, Svl. Memur Efendi Yük'e yardımlarından dolayı, burada adı geçmeyen diğer tüm laboratuvar doktor ve personeline manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
 1. GİRİŞ	 1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Stafilocok Cinsi	3
2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.4. Dirençlilik	5
2.5. Antijen Yapıları ve Faj Tipleri	6
2.6. Hastalandırıcı Özellikler	8
2.6.1.Toksin Niteliğindeki Maddeler	8
2.6.1.1. Sitolitik Toksinler	8
Alfa Toksin	9
Beta Toksin	9
Gama Toksin	9
Delta Toksin	9
2.6.1.2. Lökositin	9
2.6.1.3. Enterotoksinler	9
2.6.1.4. Epidermolitik Toksin (Eksfoliatif Toksin =Eksfoliatin)	10
Toksik Şok Sendromu Toksini	11
2.7. Enzim Yapısındaki Maddeler	11
2.7.1. Koagülaz	11

2.7.2. Deoksiribonükleaz	13
2.7.3. Lipazlar	13
2.7.4. Hiyalüronidaz	13
2.7.5. Stafilokinaz	13
2.7.6. Betalaktamaz	14
2.8. Antifagositik Maddeler	14
2.8.1.Slime Maddesi	14
2.9. Stafilokokların Oluşturdukları Belli Başlı Enfeksiyonlar Şunlardır	18
2.9.1. Deri ve Mukoza Lokalizasyonları	18
2.9.2.Yaygın Deri Döküntüleriyle Seyreden Enfeksiyonlar	18
2.9.3. Sepsis ve Endokarditler	18
2.9.4. Sistem ve Organ Enfeksiyonlar	18
2.9.5. Besin Zehirlenmeleri	19
2.10. Bağışıklık	19
2.11. Epidemiyoloji ve Korunma	19
3. KONUS İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR	21
4. MATERYAL VE METOD	31
4.1. Materyal Toplama	31
4.1.1. Stafilokokların İzolasyonu	31
4.1.1.1. Kanlı Agar	31
4.1.1.2. Mannitollü Tuzlu Agar (Chapman Besiyeri)	31
4.2.2. Stafilokokların İdenfikasyonu	32
4.2.2.1. Gram Boyama	32
4.2.2.2. Pigment Oluşumu	32
4.2.2.3. Katalaz Deneyi	32
4.2.2.4. Koagülaz Deneyi	33
4.2.2.5. Üreaz Testi	34
4.2.2.6. Stafilokokların Şekerlere Etkisi	35
4.2.2.7. Novobiyosin Duyarlılık Deneyi	36
4.2.2.8. Basitrasin Duyarlılık Testi	36
4.2.2.9. Alkalen Fosfataz Testi	37
4.2.2.9. Nitrat Buyyonu ve Nitrat redüksiyon Deneyleri	38
4.2.2.11. API Analitik Profile Index	40

4.3. Antibiyotik Duyarlıklarının Araştırılması	41
4.4. Slime Yapımı ve Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması	42
4.4.1. Slime Maddesi	42
4.4.2. Çeşitli Klinik Numunelerin Kültürlerinden İzole Edilen KNS Suşların Slime Faktör Sentezlemesinin Üç Farklı Yöntemle Araştırılması	42
4.4.2.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	43
4.4.2.2. Makro-Tüp Yöntemi	44
4.4.2.3. Mikropleyt Yöntemi	45
İstatistiksel İncelemeler	46
5. BULGULAR	47
6. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MRSA	: Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRS	: Methicillin Resistant Staphylococci
TSB	: Trypticase Soy Broth
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
CNS	: Coagulase Negative Staphylococci
O.D.	: Optik Dansite
MHB	: Muller Hilton Broth
MHA	: Muller Hilton Agar
NB	: Nutrient Broth
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
cfu	: coliform unit (koliform unit)
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PIA	: Polysaccharide Intercellular Adhesin
PCR	: Polimerase Chain Reaction
ELİSA	: Enzyme–Linked Immunosorbent Assay
kDa	: Kilodalton
ml	: mililitre
nm	: nanometre
M	: Mortalite
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ŞAB	: Şekerli Ana Besiyeri
mm.	: milimetre
g	: gram
p-NPP	: p-Nitrophenyl Phosphate
PPP	: Phenol Phtalein Phosphate
N	: Normalite
API	: Analytic Profile Index
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
ESS	: Ekstrasellüler Slime Substansı

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>S. aureus</i> Fajları ve Başlıca Tipleri	8
2.2. Stafilokok Türlerinin Karakteristik İdenfikasyonu	12

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
5.1. Çalışma Kapsamına Alınan KNS Suşlarının Üç Yönteme Göre Slime Oluşturma Durumları	48
5.2. Üç ayrı yöntemle göre KNS suşlarında slime oluşturma dağılımı	50
5.3. KNS suşlarında türlere göre slime oluşturma dağılımı	52
5.4. KNS suşlarının izole edildikleri kültürlerinin numune tipine göre dağılımı	53
5.5. Slime pozitif ve slime negatif KNS suşlarında çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik ve duyarlılık durumları	54

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
5.1. Üç ayrı yöntemle göre KNS suşlarında slime oluşturma dağılımı	50
5.2. Numunelerden izole edilen KNS'lerin türlere göre dağılımı	51
5.3. KNS suşların izole edildikleri kültürlerinin numune tipine göre dağılımı	53
5.4. Tüm dirençli suşlarda slime durumuna göre oksasilin, kloramfenikol ve levofloksasin antibiyotiklerine karşı dirençlik dağılımı	55
5.5. 90 KNS suşunun antibiyotik çeşitlerine göre dirençlilik ve duyarlılık dağılımı	55
5.6. Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime pozitif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayılarına göre dağılımı	57
5.7. Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime negatif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayılarına göre dağılımı	58

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.Stafilokok cinsinin kanlı agarda yaptığı β hemolizin görülmesi	5
2.2.Elektron Mikroskopta (a) <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 suşunu slime üretimi (b)Slime negatif HAM892 (d) M187 suşunun slime üretiminin gösterilmesi	16
4.1.Stafilokokların üreaz besiyerine etkisi	34
4.2. Stafilokokların şekerlere etkisi;	35
4.3. Stafilokok suşlarının nobiyosine duyarlılık testi	36
4.4. p-NPP agarda alkalen fosfataz testi	38
4.5. Nitrat redüktaz testi	40
4.6. ID Staph API paneli	41
4.7. Kongo kırmızılı agar besiyerinde KNS'larda slime üretiminin gösterilmesi	43
4.8. Makro-Tüp yöntemiyle slime oluşturan ve oluşturmayan KNS suşların değerlendirilmesi	44
4.9. Mikropleyt yöntemiyle KNS'larda slime yapımının araştırılması	46

1. GİRİŞ

Deri florasının dominant üyesi olan koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lar son 20 yılda etyolojide önem kazanmış mikroorganizmalardır. Hastane kaynaklı veya toplumdan kazanılmış, üriner sistem enfeksiyonlarında, immün düşkün kişilerde oluşan bakteriyemilerde, osteomyelit, postoperatif endoftalmitis gibi enfeksiyonlarda sıklıkla etken olarak izole edilmektedir [Aydınlı ve ark., 1997].

Günümüzde tıpta tedavi olanaklarının ve invaziv metodların gelişmesi ile birlikte kateter uygulamaları ve diğer damar içi girişimler giderek çoğalmıştır. Bu ilerlemeler başta enfeksiyon olmak üzere beraberinde bir çok problemin ortaya çıkmasına sebep olmuştur [Aygen ve ark., 1996]. Sürekli damar içi kateter bulundurulmuş hastalarda ve hemodiyaliz uygulamalarında deri yüzeyindeki mikroorganizmaların giriş kapısından başlayarak sepsise varan enfeksiyonlar oluşturmaları sıklıkla görülür [Bilgehan, 1995].

Memeli protez ve peritoneal diyaliz kateterlerinde, ortopedik implantlar, prostetik kalp kapakçıklarında, suprapubik kateterlerinde, eklem protezi, serebrospinal şant, invaziv vasküler kateterlerinde, insan vücudunda idrar yollarında KNS'lar büyük enfeksiyonlara sebep olmaktadır [Pfaller et al., 1988; Yazgı ve ark., 1997; Aydınlı ve ark., 1997; Gerke et al., 1998; Nayak et al., 2001].

Virulans faktörleri arasında yer alan slime, ekstrasellüler bir madde olup, bakterinin plastik ve metal yüzeylere aderansını artırmakta, antibiyotiklerin difüzyonunu inhibe ederek mikroorganizmaya ulaşmalarını, mitojenlere karşı lenfoproliferatif cevabı, kemotaksis gibi polimorf nükleer lökosit fonksiyonların ve bakterinin fagozite olmasını engellemektedir [Aydınlı ve ark., 1997; Williams et al., 1997; Heinzelmann et al., 1997; Henke et al., 1997].

Bu çalışmada KNS'ların slime üretilip-üretmediği Kongo kırmızısı, makro-tüp ve mikroplyt yöntemleriyle araştırılmıştır. Çalışmamızda ele alınan 90 KNS'ların hepsine antibiyogram uygulandı. Slime pozitif olan KNS'lar ile slime negatif KNS'lar karşılaştırılarak, slime faktörün KNS'ların antibiyotik duyarlılıkları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen stafilokok cinsi bakterileri ilk defa 1878 yılında Koch tarafından irinde görülmüştür ve ilk stafilokok adı 1881 yılında İskoçyalı Ogston tarafından kullanılmıştır. O tarihlerde stafilokoklar çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. Staphylus eski Yunanca'da üzüm anlamına gelmekte olup, bu bakterilerin üreme esnasında birbirlerinden ayrılmayarak üzüme benzer kümecikler yaptıkları için bu deyim kullanılmıştır. Stafilokoklar ilk defa 1884'de Rosenbach tarafından izole edilmiştir [Bilgehan, 2000].

1928 yılında Alexander Fleming, dikkatsizce açık bıraktığı petri kabının hava ile kontamine olması sonucu oluşan fungus kolonilerin etrafında, stafilokok kolonilerin lizise uğradığını görmüştür. Daha sonra Fleming, bu fungusu *Penicillium notatum* suşu olarak tanımlamıştır. Bu fungus türünün stafilokoklar üzerinde bakteriyolitik etkisi olan bu maddesini penisilin diye adlandırmıştır. Penisilinin, Florey ve Chain tarafından 1940 yılında saflaştırılması ve yaygın olarak üretiminin başlanması ile stafilokok enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1943'te gramisidin, trosidin, streptomisin ve daha sonra klortetrasiklin gibi antibiyotikler üretilmeye başlanmıştır. Ancak penisilinin yaygın olarak kullanımı ile birlikte, penisilini parçalayan stafilokok suşlarının ortaya çıkışı gecikmemiştir [Koneman et al., 1997].

Penisilini parçalayan penisilinaz enzimi, ilk olarak 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından *Escherichia coli*'de saptanmıştır [Koneman et al., 1997]. İlk penisilinaz üreten stafilokoklar ise, 1944'te Kirby tarafından bildirilmiştir [Diler, 1997].

1960'lı yıllarda β -laktamaz dirençli yarısentetik penisilinler (metisilin, oksasilin ve nafsilin) stafilokok enfeksiyonlarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu antibiyotikler, penisiline duyarlı stafilokoklar üzerinde daha etkili olmuştur. β -laktamaz dirençli penisilinlerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra dirençli suşlar saptanmıştır [Dündar ve Dündar, 2002].

1970’li yıllarda stafilokoların metisilin ve diğer sentetik penisilinlere dirençli olması sebebiyle, vankomisin gibi gikopeptid grubundaki antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır [Domaracki et al., 1998]. 1980’li yıllardan günümüze kadar, hemen tüm dünyada stafilokoklar ile oluşan nozokomiyal enfeksiyonların oranında sürekli bir artış gözlemlenmiştir. Vankomisine dirençli KNS’lardan sonra, vankomisine dirençli *S. aureus* suşu ilk defa 1997’de Japonya’da bildirilmiştir [Sönmez ve ark., 2000].

2.2. Stafilokok Cinsi

Genel karakterleri olarak stafilokoklar yuvarlak, 0,5–1,5 µm çapında; çoğu kez düzensiz kümeler, bazen tedrad bazen de ikiyeşerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülen gram olumlu bakterilerdir. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünden çoğaldıklarından, üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Tipik üzüm salkımı görünümü vermeyen stafilokokları, kok şeklindeki streptokoklardan ayırt etmek için, katalaz testinden yararlanılır. Katalaz testi stafilokoklarda pozitif olduğu halde, streptokoklarda negatiftir. Hareketsizdirler. Fakültatif anaerop (yalnız *S. saccharolyticus* anaerop) olup daha çok aerop üremeyi tercih ederler. Genellikle % 10 NaCl’lü ortamda ve 18-40 °C’ler arasında üreyebilirler. Bir çok türlerde karotenoid pigmenti bulunabilir. Glikozun parçalanması sonucu oluşturulan esas ürün laktik asit olup aerop koşullarda asetik asit ve CO₂ oluşturabilirler. Lizostafin stafilokokları eritir ancak lizozime dirençlidirler [Bilgehan, 2000].

Stafilokok türleri DNA /DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler [Bilgehan, 2000]:

Staphylococcus epidermidis grubunda;

S. epidermidis

S. capitis

S. warneri

S. haemolyticus

S. saccharolyticus

S. hominis

Staphylococcus saprophyticus grubunda;

S. saprophyticus

S. cohnii

S. xylosus

Staphylococcus simulans grubunda;

S. simulans

S. carnosus

Staphylococcus sciuri grubunda;

S. sciuri

S. lentus

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* ve *Staphylococcus caseolyticus* herhangi bir gruba sokulmamıştır.

2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerinde ürerlerse de kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. Fakültatif anaeropturlar. Oksijenli ortamda üremeyi tercih etselerde, az miktarlarda oksijenli ve hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler [Bilgehan, 2000].

Optimal olarak 37 °C’de ve pH 7,4’de ürerler. Jeloz besiyerinde bolca ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yaparlar. Uygun ortamda koloniler 6-8 mm çapına ulaşabilirler.

Besiyerlerine glikoz, kan, serum, haben sıvısı gibi maddeler konularak zenginleştirilirse üreme daha çabuk ve kolay olur. Kanlı jeloz plaklarında üretilen stafilokoklardan çoğu, kolonilerin etrafında tam (β) hemoliz yaparlar (Resim 2.1). Alfa hemoliz yapan stafilokoklar tesbit edilmemiştir. % 10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda iyi, % 15 NaCl’lü ortamda zayıf ürerler. Çoğu kökenleri 10-45 °C (optimal 30-37 °C) de ve pH 4,2–9,3 (optimal 7,0-7,5) sınırlarında üreyebilirler. Stafilokoklar başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratları parçalarlar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Fakat gaz yapmazlar. Nitratları nitrite indirgerler.

Resim 2.1. Stafilokok cinsinin kanlı agarda yaptığı β hemolizin görülmesi

2.4. Dirençlilik

Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 °C’de 30 dk. bekletilmekle öldükleri halde, stafilokoklar bir saat süre sonra bile canlılıklarını koruyabilmektedirler. Aynı şekilde sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklılıkları fazladır. İrin içerisinde kurutulursa haftalarca canlı kalabilirler. NaCl’ün % 9-10 yoğunluğunda bile üremelerini sürdürebilirler. Bazı dezenfektanların alışagelmış konsantrasyonlarına dayanabilirlerse de kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların düşük konsantrasyonları onları öldürürler [Bilgehan, 2000].

Genel olarak sülfonamid ve antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre dayanıklıdırlar. Her yeni çıkan antibiyotikler başlangıçta etkili oldukları halde zamanla ona karşı direnç kazanırlar. Bu olay özellikle kemoterapötiklerin en çok kullandığı hastane ortamında gelişir. Stafilokoklarda direnç plazmidlerinin bir kısmı büyük plazmidler olup, bunlardan başta betalaktamaz direnç geni ile birlikte çeşitli ağır metal direnç genleri bulunur. Bunların bir hücredeki kopya sayıları da sınırlıdır. Bir kısmı plazmidler ise küçük plazmidler halinde olup yalnızca bir antibiyotik

direnç geninden sorumludur. Tetrasiklin direnç plazmidleri bu şekildedir. Stafilokoklar arası direnç aktarımı bakteriyofaj aracılığı ile transdüksiyon ya da bakteriyofaj konjugasyonu ile olur.

Penisilin, metisilin gibi antibiyotiklerin karşısında stafilokokların L kolonileri meydana gelir. Stafilokoklar arasında gittikçe metisilin direnci artmaktadır. Metisiline dirençli stafilokoklar in vitro testlerde sefalosporinlere duyarlı olsalar bile, in vivo olarak bu antibiyotiklere direnç gösterirler. Hastaya sefalosporinler verildiğinde bu hususta dikkat edilmelidir [Mulder, 1997; Domaracki et al., 1998; Bilgehan, 2000].

Bir kısım kökenlerin üredikleri ortamlara bazı tür bakteriler için antibiyotik etkisi gösteren bazı maddeler yaydıkları saptanmıştır. Stafilotoksinler de bunlardan biridir. Bu toksin başta difteri basili olmak üzere, stafilotoksin yapmayan diğer stafilokoklar üzerinde etkili oldukları görülmüştür [Bilgehan, 2000].

Stafilokoklar lizostafine duyarlı oldukları halde, lizozime dirençlidirler [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.5. Antijen Yapıları ve Faj Tipleri

Antijen yapısı bakımından stafilokoklar kesin bir özellik göstermezler. Stafilokoklarda antijen özelliği gösteren 30'dan çok madde vardır. Bunlardan bazıları şunlardır ;

Teikoik asit stafilokokların hücre duvarında bulunan antijenik yapıda bir maddedir. Bu madde *S. aureus*'da ribitol teikoik asit, *S. epidermidis*'deki yapısı ise gliserol teikoik asit yapısındadır. Erişkin insanların çoğunda teikoik asite karşı erken tipte bir aşırı duyarlılık ve kanlarında düşük düzeyde presipitan antikorlar rastlanılmaktadır [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Endokarditlerde ve metastatik fokal abseli süregelen hastalarda bu antikorların düzeyi daha yüksek olur.

S. aureus yüzeyinde peptidoglikana bağlı olarak bulunan protein A'nın bilinen antijen-antikor ilişkisinde çok, belirli IgG sınırlarının Fc kısımlarına bağlanma özelliği vardır. Bu madde kemotaktik, antikomplemanter ve antifagositik etki gösterir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000]. İlk kez "Protein A" 1940 yılında Verwey tarafından açıklanmıştır. Bakterinin kolonize olmasında katkıda bulunurlar. Protein A, IgG₃ haricindeki IgG'leri ve bazı IgM ve IgA₂'leri Fc kısımlarından bağlanabilmektedir. Bu şekilde bağlanan antikorların fab uçları serbest kaldığında özgül antijenler ile birleşebilirler. Bu özelliği nedeniyle Protein A taşıyan stafilokoklar koagülünasyon deneyleri ile bilinmeyen bir antijen veya antikoru tesbit etmede kullanılabilmektedir [Yazgı ve ark., 1997].

Aynı şekilde *S. aureus*'un kümeleştirici faktörü antijenik özelliktedir. Yine kapsüllü *S. aureus*'larda daha çok, fakat kapsülsüz görünenlerde de bulunan kapsül polisakkaritleri antijenik yapıda olup bunların antifagositik etkileri bakteri virulansında etkili olur [Bilgehan, 2000].

Bugün *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde, faj tiplendirilmesinden yararlanılmaktadır. Özellikle epidemiyolojik amaçlar için, sorumlu kökenlerin izlenmesinde faj tiplendirilmesinin önemi büyüktür. Her stafilokoklarda bir ya da bir çok profaj bulunduğu bilinmektedir [Bilgehan, 2000].

Faj tiplendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün kabul ettiği yaklaşık 24 standart stafilokok fajı kullanılarak yapılmaktadır. Bu bakteriyofajlar her birisinin konuk olduğu özgül duyarlı *S. aureus*, konak kökenlerinde denenecek stafilokok kökenlerinin onları eritmelerine göre tiplendirilmektedirler. Sonunda incelenen stafilokok kökeni, duyarlı olduğu fajın grup ve tipine göre isimlendirilmektedir. Birden çok faj varsa hepsi birlikte gösterilmekte, bu nedenle faj modelleri çıkmaktadır. Örneğin; 29, 52/52A, 3C/66 faj modelleri gibi. Stafilokokların faj tiplendirmesinde kullanılan fajlar ve saptanan belli başlı stafilokok fajları Çizelge 2.1'de verilmiştir [Bilgehan, 2000].

Çizelge 2.1. *S. aureus* Fajları ve Başlıca Faj Tipleri

Faj Grubu	Fajlar	Başlıca Staf. Faj Tipleri
I	29, 52, 52A, 79, 80	29, 52/52A/80/81, 80
II	3A, 3B, 3C, 55, 71	3A/3B/3C/55 vb.
	6, 7, 42E, 47, 53, 54	6/7/47/53/75/77....vb.
III	75, 77, 83A, 84, 85	
IV	42D	
Sınıflandırılmamış	81, 87, 94, 95, 96, 187	

2.6. Hastalandırıcı Özellikler

Organizmaya giren stafilokoklar yoğun ve karışık bir savunma mekanizması ile karşılaşılır. Opsoninler ve komplemanın C₃, C₄ parçaları, lökosit ve makrofajların fagositoz aktivitesini artırır. Bu mekanizmada olabilecek herhangi bir eksiklik stafilokokların enfeksiyon riskini artırır [Heinzelman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Stafilokoklar organizmaya girdikleri yerde yerel olarak üremek ve süpürasyonlara neden olmak suretiyle hastalık yapabildikleri gibi dokular arasına ve kana yayılmak suretiyle, buralarda çeşitli ekstrasellüler maddeler oluşturarak değişik klinik tablolara neden olabilirler. Hastalandırıcı etkisi olan çeşitli maddeler şunlardır:

2.6.1 Toksin Niteliğindeki Maddeler

2.6.1.1 Sitolitik Toksinler

Sıvı besiyerlerinde üretilmiş stafilokokların kültür süzüntülerinde ekzotoksin niteliğinde maddelerin bulunduğu ve bunların eritrosit ve çeşitli hücrelerin üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü nekrotik etkilerin bulunduğu bilinmektedir. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bunlar; alfa, beta, gama ve delta toksinleridir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Alfa Toksin: Alfa hemolizinde geniş bir biyolojik etkinlik alanı vardır. Hemolitik, dermatolojik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkiler yaparlar. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi varsa da monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları duyarlı olup bunların üzerinde tahribat yaparlar. Bu toksinin geninin bir transpozona bağlı olduğu kabul edilmektedir.

Beta Toksin: (Stafilokok Sfingomiyelinazı). Soğukta ve sfingomiyelin üzerine etki etmek suretiyle eritrositleri eriten bir toksindir. Çeşitli eritrositlerinin beta toksine karşı duyarlılıkları değişiktir.

Gama Toksin: Belirgin bir hemolitik etkisi vardır. Etki mekanizması bilinmemektedir. Özellikle stafilokoklar bağlı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu tür hastalıkların oluşmasında etkili olduğu kanısını vermektedir.

Delta Toksin: Termolabil yüzeye etkin bir toksin olup deterjanlara benzer bir etki ile hücre membranını bozar. Geniş bir biyolojik etkinliği var olup eritrositleri, makrofajlar, lenfositler, ve trombositler üzerinde litik etkileri vardır. Bunların yanında ileumda su absorpsiyonunu inhibe eder. Adenozin monofosfat birikimini stümüle eder ve kobay ileumda iyon permeabilitesini değiştirir.

2.6.1.2. Lökosidin

S. aureus tarafında oluşturulan lökosidinin polimorf nüveli lökositler ve makrofajların üzerinde litik etkisi vardır. Diğer hücreleri etkilemezler. Birbirlerine sinerjik etki yaparak hücre erimesini oluşturan S ve F diye adlandırılan iki komponentden oluşmaktadır. Bu komponentlerden her birisi iyi antijen yapısında olup, her ikisinden ayrı toksoid elde edilmiştir. Hücre zarında gözeneklerin açılmasını sağlayarak, potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırarak etkili olurlar [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.6.1.3. Enterotoksinler

S. aureus tarafında oluşturulan, suda erir, termostabil (kaynamaya 30 dk. dayanıklı) özel antijen yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li ortamda

karbonhidrat ve proteince zengin besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. A, B, C1, C2, D ve E olmak üzere serolojik olarak 6 grup stafilokok enterotoksinleri ayrılmıştır. *S. aureus* kökenlerinin % 35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. Bir stafilokok kökeni bu toksinlerden yalnız birisini oluşturabildiği gibi bir kaçını birden de oluşturabilir. Stafilokok enterotoksinlerinin etki mekanizması kesin olarak belli değildir. Bu toksinler insanlar dışında maymunlara da etkili olup, diğer deney hayvanlarında bir etkileri olduğu saptanamamıştır. Kusturucu etkilerinin mide ve bağırsaklardaki reseptörler aracılığıyla vagus ve sempatik sinirler yoluyla kusma merkezin iletilen stimulus ile olduğu bilinmektedir. Sürgün oluşturmaları, bağırsak lümeninden su absorpsiyonun engellenmesi ve mukozdan bağırsak boşluğuna sıvı boşaltılmasının artması yoluyla olmaktadır [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Enterotoksinlerin, bir süper antijen gibi etkili olarak T lenfosit mitojenleri gibi T lenfosit aktivitelerini hızlandırdıkları, bunda MHC-II (Major Histocompatibility Complex II) moleküllerinin de rol aldığını ayrıca bu enterotoksinlerin makrofajları da stümile ederek tümör nekroz faktörü oluşturmalarına yönelttiği ortaya konmuştur.

2.6.1.4. Epidermolitik Toksin (Eksfoliatif Toksin =Eksfoliatin)

S. aureus tarafından oluşturulan, insanlarda veziküler ve eksfoliatif deri lezyonlarından sorumlu toksindir. Özellikle bakteriyofaj grup II kökenleri tarafından oluşturulur. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından en az iki farklı eksfoliatin bulunduğu saptanmıştır. Eksfoliatif Toksin-A (ETA) ve Eksfoliatif Toksin-B (ETB) diye adlandırılan bu toksinlerden birincisinin kromozomal, ikincisinin plazmide bağlı genlerce oluşturulduğu saptanmıştır. Yeni doğan farelerde insanlarınkine benzer deri lezyonları oluştururlar. Derinin granüler katmanı hücreleri arasındaki litik etkileri ile lezyon oluştururlar fakat yangısal tepkime oluşturmazlar ve primer olarak hücre ölümüne yol açmazlar. Bu toksinin bir sfingomiyelinaz niteliğinde fakat stafilokok beta toksininden farklı olduğu şeklinde belirtiler vardır. Özellikle T lenfositleri üzerinde mitojen etkilidirler [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Toksik Şok Sendromu Toksini

Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-1 grubunda bulunan 29 ve 52 tiplerindendir. Bunların çoğunluğu toksik şok sendromu toksin-1 oluştururlar. Bu toksinin ayrı immunolojik etkileri vardır. Bunlar; interleukin-2 reseptör oluşturulmasını başlatmak ve monositlerce IL-1'in oluşumuna stümüle etmektir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.7. Enzim Yapısındaki Maddeler

2.7.1. Koagülaz

İnsan veya tavşan plazması ile temasta bırakılan stafilokoklar veya bunların kültür süzüntüleri bir süre sonra plazmayı pıhtılaştırır. Bu tip stafilokoklar girdikleri organizmada koagülazları sayesinde bir fibrin zırhı ile kapanarak fagositoza karşı korundukları gibi normal serumun bakterisid aktivitesini de önlendiklerinden patojenite özelliği kazanmış olurlar [Isenberg et al., 1992; Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Koagülaz, stafilokoklardan başka *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* gibi birçok bakteriler tarafından meydana getirilebilir [Bilgehan, 2000]. Protein bileşiminde ve özel antijen yapısındadır. Koagülaz, plazmada bulunan bir aktivatör ile birleştikten sonra onu pıhtılaştırabilmektedir [Isenberg et al., 1992; Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Tellüritli besiyerlerinde üretilen koagülaz pozitif stafilokoklar siyah koloni meydana getirirler. Koagülaz deneyi *S. aureus*'un araştırılmasında en güvenilir deneydir. Koagülaz olumsuz bulunan kökenler için Çizelge 2.2'de belirtilen özellikler araştırılır. *S. intermedius* ve *S. hyicus* da koagülaz olumlu stafilokoklardır [Bilgehan, 2000].

Çizelge 2.2. Stafilokok Türlerinin Karakteristik İdenfikasyonu

TÜRLER	Koagülaz	Alkalın Fosfataz	Ornitin Dekarboksilaz	Aseton üretimi	Nitrat Redüktaz	Üreaz	Basitrasin	Novobiyosin	Maltoz	Fruktoz	Sukroz	Mannoz	D-trehaloz	D-ksiloz	Laktoz
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	V	S	S	+	+	+	+	+	-	+
<i>S. anaerobius</i>	+	+	Na	-	-	Na	Na	S	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	+	V	+	+	-	S	S	+	+	+	+	-	-	V
<i>S. heamolyticus</i>	-	-	-	+	+	-	R	S	+	V	+	-	+	-	V
<i>S. hominis</i>	-	-	-	V	V	+	S	S	+	+	+sl	-	V	-	V
<i>S. caprae</i>	-	+sl	-	+	+	+	S	R	Vsl	-	-	+	+	-	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	-	+	+	S	R	V	+	+	+	+	-	V
<i>S. ssp. capitis</i>	-	-	-	V	V	-	S	S	-	+	+sl	+	-	-	-
<i>S. capitis ssp. uretiolyticus</i>	-	-	-	V	+	+	Na	S	+	+	+	+	-	+	V
<i>S. warneri</i>	-	-	-	+	V	+	S	S	+sl	+	+	-	+	-	V
<i>S. auricularis</i>	-	-	-	-	V	-	S/R	S	+sl	+	V	-	+	-	-
<i>S. simulans</i>	-	V	-	V	+	+	S	S	+sl	+	+	V	V	-	+
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	+	+	V	V	S/R	S	+	+	+	+	V	-	+
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	Na	Na	+	Na	Na	S	-	Na	-	+	-	Na	-
<i>S. xylosus</i>	-	V	-	V	V	+	S	R	+	+	+	+	+	+	V
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+	-	+	S/R	R	+	+	+	-	+	-	V
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	V	-	-	S/R	R	V	+	+	V	+	-	-
<i>S. pasteurii</i>	-	-	-	V	V	+	Na	R	V	Na	+	-	+	-	V
<i>S. sciuri</i>	-	+	-	-	+	-	R	R	V	+	+	V	+	Vsl	Vsl
<i>S. lentus</i>	-	+sl	-	-	+	-	S	R	V	+sl	+	+	+	+sl	V

* “+” ≥ % 90 pozitif, “-” ≥ % 90 negatif, “Na” uygun veri yok, “+sl” reaksiyon ≥ % 90 pozitif fakat yavaş, “Vsl” % 11-89 reaksiyon pozitif, “V” değişken, “R” dirençli, “S” duyarlı [Koneman et al., 1997].

2.7.2. Deoksiribonükleaz

Çoğu koagülaz olumlu stafilokoklar DNA'z oluştururlar. Çeşitli özellikleri ile (alfa toksin oluşturma, stafilokinaz, hiyarulonidaz yapma, *S. aureus* fajları ile erime vb.) *S. aureus* oldukları anlaşılan stafilokokların nadir bazı kökenleri koagülaz olumsuz bulunurlar. Bunların, DNA'z deneyi ile olumlu bulunmaları *S. aureus* oldukları kanıt sayılır. DNA'z deneyi, içinde % 0.2 DNA içeren besiyerlerine ekilen stafilokokların üredikleri yerde ve çevrelerindeki DNA'yı eritmelerini araştırmak suretiyle yapılır. Bu plaklarda stafilokoklar 18 h sonra üretildikten sonra besiyerine normal HCI döküldüğünde DNA'nın erimeği yerlerde presipitasyon ile bulanıklık oluşurken DNA'z olumlu stafilokokların üredikleri bölgeler saydam olarak kalır. Özellikle *S. aureus*'un besin maddelerinde saptanması için DNA'z deneyinden yararlanılır [Isenberg et al., 1992; Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

Stafilokoklar bazı antibiyotiklere duyarlılık deneyi ile ayırt edilebilir. Besiyerine 75 µg/ml polimiksin B'nin eklenmesi ile *S. aureus* 24 saatte üreme gösterir. Buna karşın, diğer KNS'lar, mikrokoklar ve gram negatif bakterilerin çoğunun üremesi önlenir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.7.3. Lipazlar

Bu maddeler plazma ve deri yüzeyinde biriken yağlı maddeler üzerinde etkilidir. Ayrıca deri ve deri altı yerleşiminde yağ dokusu üzerindeki etkileri önemli rol oynarlar [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.7.4. Hiyalüronidaz

Yine *S.aureus*'ların % 90'ında bulunan bir enzimatik aktivedir. Bağ dokusunun yapısında bulunan hiyarülonik asitin depolimerizasyonu ve bu suretle stafilokokların doku içerisine yayılmasını sağlar. Antijen özelliği olan bir maddedir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.7.5. Stafilokinaz

Streptokoklarda olduğu gibi stafilokoklarda da fibrinolitik etki vardır. Burada bakteriler tarafından salınan kinazlar plazmada bulunan plazminojen veya

profibrinolizin isimli maddeyi aktive ederek plazmin (fibrinolizin) oluştururlar. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur. Bir faj genomu yönetimindedir. Patojenlikteki rolü kesin değildir [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 2000].

2.7.6. Betalaktamaz

Betalaktamaz (Penisilinaz) oluşturan bakteriler penisilin ve analoglarının betalaktam halkasındaki amid bağını hidrolize edip, penisiloik asit oluştururlar. Stafilokoklar salgıladıkları bu enzim ile betalaktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelir. Bu durum patojenite artışına yol açar [Bilgehan, 1995].

2.8. Antifagositik Maddeler

Stafilokokların yüzeyinde bulunan protein A ve kapsül niteliğindeki polisakkarit maddelerin bakteriyi fagositozdan koruyucu etkileri vardır. Bu şekilde patojenliğin artmasına neden olurlar.

2.8.1. Slime Maddesi

Günümüzde tıpta tedavi olanaklarının ve invaziv metodların gelişmesi ile birlikte kateter uygulamaları ve diğer damar içi girişimler giderek çoğalmıştır. Bu ilerlemeler başta enfeksiyon olmak üzere beraberinde birçok problemin ortaya çıkmasına sebep olmuştur [Aygen ve ark., 1996]. Sürekli damar içi kateter bulundurulan hastalarda ve hemodiyaliz uygulamalarında deri yüzeyindeki mikroorganizmalar giriş kapısından başlayarak sepsise varan enfeksiyonlar oluşturmaları sıklıkla görülür. *S. epidermidis*, *S. aureus*, gram negatif basiller, *Candida*, *Corynebacterium JK* grubu, *Aspergillus* türleri, *Mycobacterium chelonae* sık görülen enfeksiyon etkenleri arasındadır [Bilgehan, 1995]. KNS'lar, damar grefti, memeli protez ve peritoneal diyaliz kateterlerinde, ortopedik implantlarında, prostetik kalp kapakcıklarında, subrapubik kateterlerinde, eklem protezlerinde, serebrosipinal şant, invaziv vasküler kateterlerinde, idrar yollarında büyük enfeksiyonlara sebep olmaktadır [Pfaller et al., 1988; Jone et al., 1992; Aydın ve ark., 1997; Williams et al., 1997; Yazgı ve ark., 1997].

Virulans faktörleri arasında yer alan slime faktör, ekstrasellüler bir madde olup, bakterinin plastik ve metal yüzeylere aderansını artırmakta, antibiyotiklerin difüzyonunu inhibe ederek mikroorganizmaya ulaşmalarını, mitojenlere karşı lenfoproliferatif cevabı, kemotaksis gibi polimorf nükleer nötrofil fonksiyonlarını ve bakterinin fagosite olmasını engellemektedir. Bu özelliklerinden dolayı slime maddesi, KNS'larda gerçek bir patojenite faktörüdür. Bu özelliklerinden dolayı slime faktör, KNS suşların daha virulan ve çok sayıda antibiyotiğe dirençli oldukları birçok araştırmacı tarafından doğrulanmaktadır [Aydınlı ve ark., 1997].

Ekzopolisakkarit tipleri üzerinde (kapsül, mikrokapsül, psödokapsül slime) geniş bir araştırma yapılmıştır. Kapsül stabil bir ekzopolisakkarit tabaka olup, bakteriye oldukça yakındır ve birçok yıkama ile kaybolmaz. Oysa slime gevşekçe hücre yüzeyine yapışmış, ikinci olarak tek bir hücreyi değil, eş zamanlı birçok hücreyi çevrelemiştir (Resim 2.2). Yıkamalarla kolayca kaybolur. Slime üreten varyantların, aynı suşların slime üretmeyen varyantlarından daha çok kolonizasyon kapasitesi olduğu görülmüştür [Kotilainen et al., April 1990; Aguilar et al., 2001].

KNS'larda slime üretimi ilk defa 1972 yılında Baysten ve Penny tarafından bildirilmiştir [Kulaksız, 1998]. Christensen ve arkadaşları tarafından, herhangi bir bakteri suşunun slime üretimini teşhis etmek için 1985 yılında kantitatif model olan spektrometrik (mikropleyt yöntemi) metod açıklanmıştır [Pfäller et al., 1988].

Ekstrasellüler tabakasının ilk kez elde edilmesi, Ludwicka ve arkadaşları tarafından 1984'de gerçekleştirilmiştir. Bakteri, % 1 glukoz, % 3 kasaminoasit içeren nutrient agarda 37 °C'de 48 h inkübe edilmiştir. Sonikasyon ve filtrasyon işlemlerinden sonra elde edilen ekstrasellüler ekstrakt, combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry (CGC-MS) ile analiz edilmiştir. Ekstrasellüler ekstraktın büyük çoğunluğunun, galaktoz, glukoz ve riboz içerdiği görülmüştür [Kotilainen et al., December 1990].

PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) maddesi, medikal aletlerde kolonizasyon yapmada önemli bir faktördür. PIA üretimini kodlayan gen, *icaABDC* operonu tarafından düzenlenir. Stafilokok türlerinin geniş hücre salgımları oluşturması ya da biyofilm (slime) oluşturması demek, PIA biyosentezi

gerçekleştiriyor demektir (Gerke et al., 1998]. Bazı *S. epidermidis* suşları, etraflarını çevreleyen, PIA denen yapışkan madde oluştururlar. Üzüm salkımı görünümünde koloniler oluşur. *S. epidermidis*'in özellikle plastik protez, kateter ve şant gibi yabancı cisimlerin bulunduğu ortama ilgileri büyüktür. Bu cisimlerin etrafı, organizma tarafından kaplanan fibronektin, fibrinojen, vitronektin gibi proteinler, stafilokokların kolayca yapıştığı konakçı proteinlerdir. Bu şekilde yabancı cisimlerin etrafına yayılarak biyofilm oluşturan *S. epidermidis*'in oluşturdukları glikokaliks (ekstrasellüler slime substansı) içerisinde kalarak, kendilerini antibiyotiklerden ve organizmanın hücresel bağışıklık yanıtından korurlar [Kotilainen et al., April 1990; Koneman et al., 1997; Gerke et al., 1998., Bilgehan, 2000].

Resim 2.2 Elektron mikroskopta (a) *S. epidermidis* ATCC 35984 suşunun kuvvetli slime üretimi (b) Slime negatif HAM892 ve (d) Slime negatif M187sn3'ün (c) M187 suşunun slime üretiminin görülmesi, çizgiler, 1µm. [Baldassarri et al., 1997].

PIA iki yapıdan oluşur; homoglukan ve polisakkarit I ve II (en az 130, 2-deoksi 2-amino-D-glukopyranozi birimden oluşmuştur). Bu birimlerin çoğunluğu N-asetillenmiştir (% 80). Bu birimler, β -1-6 bağlarıyla birbirlerine bağlanmışlardır [Gerke et al., 1998].

Ekstrasellüler slime tabakası, ard arda gelen iki basamaktan oluşur. Önce hücre-hücre adezyonu gerçekleşir, sonrada bakterinin katı yüzeylere adezyonu gerçekleşir. İntersellüler adezyon için *ica* geni tarafından kodlanan N-asetilglukozaminiltransferaz enzimi ile, UDP-N-asetilglukozaminden sentezlediği lineer β -1-6 bağlı glukozaminilglukanlardan PIA sentezlenir [Gerke et al., 1998; Allignet et al., 2001]. PIA aynı zamanda, kapsüler polisakkarit antijeni (PS/A) diye de adlandırılır [Allignet et al., 2001]. *ica* operonunda *icaA* ve *icaD* genlerinin koekspresyonu ile PIA sentezi gerçekleşir. Yalnız *icaA* ekspresyonu enzim aktivitesini düşürmektedir [Gerke et al., 1998; Arciola et al., 2001]. Bakterinin konakçı proteinlere (fibronektin, fibrinojen ve kollajen) adezyonundan sorumlu genleri ise *fbaA*, *clfA*, *altE* ve *fbc* genleridir [Allignet et al., 2001].

Ekstrasellüler slime substantsında (ESS), N-asetilglukozamin yanısıra gliserol fosfat, D-alanin de içerir. Slime üretimi ortam şartlarına (pH, CO₂), büyüme ortamının kalsiyum, magnezyum, fosfat, glukoz, agar ve protein içermesine de bağlıdır [Koneman et al., 1997].

Bakterinin bir yüzeye yapışmasında, hirofobik etkileşimler, elektrostatik çekim kuvvetlerin varlığı ve elektrostatik iteleme kuvvetlerinin yokluğu da önemli rol oynar [Van der mei et al., 1997]

KNS'lerde slime faktörünü saptamada, mikrolept yöntemi, makro-tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılmaktadır. Kongo kırmızılı agar yöntemi ilk kez 1989'da Freeman ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir [Aydınlı ve akr. 1997]. Slime üretimi, aynı zamanda scanning (SEM) ve transmission electron microscopy (TEM), mannose-specific lectin agglutination testleri ile de tesbit edilmektedir [Kotilainen et al., April 1990].

Slime maddesini sadece stafilokok türleri değil, *Pseudomonas*, *E. coli* ve *Listeria monocytogenes* gibi bakteriler de üretirler.

2.9. Stafilokokların Oluşturdukları Enfeksiyonlar Şunlardır

2.9.1. Deri ve Mukoza Lokalizasyonlar

Stafilokoklar, deride fronkül (sivilce), sikozis (sakal kıl kökleri yangısı), karbonkül (kan çıbanı), panaris (dolama), deri altı abseleri, hidroadenit (ter bezi yangısı), blefarit (göz kapağı yangısı), hordeolum (arpacık), çevreye yayılmak suretiyle oluşturdukları flegmon, çocuklarda bülloz impetigo v.b. enfeksiyonlar oluştururlar. Yeni doğanlarda ve doğum yapanlarda enfeksiyonlar oluştururlar [Bilgehan, 1995].

Mukozalarda; tonsilit, farinjit, peritonsiller abse ve diğer mukoza altı abseleri yaparlar.

2.9.2. Yaygın Deri Döküntüleriyle Seyreden Enfeksiyonlar

Bu tür enfeksiyonlarda stafilokoklar, vücudun belirli bir bölgesinde lokalize olmuşlardır. Güçlü epidermolitik toksinlerinin yayılması ile deride tipik döküntü ve lezyonlar oluşur. Daha çok bebeklerde ve bazen çocuk ve erişkinlerde görülen haşlanmış deri sendromu, yine çocuklarda ve özellikle hiper absorban vaginal tampon kullanan kadınlarda görülen toksik şok sendromu bunlardandır.

2.9.3. Sepsis ve Endokarditler

Direnci kırılmış kimselerde stafilokoklar tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır.

2.10.4. Sistem ve organ enfeksiyonlar

Direnci kırılmış kimselerde stafilokoklar tarafından oluşturulan bu tip enfeksiyonların içerisinde, stafilokok pnömönileri, akciğer abseleri, periostit, periartrit, bursit, tromboflebit otitis media, menenjit, sinüzit, idrar yolları enfeksiyonları, prostatit, perinefrik abse gibileri bulunur. *S. saprophyticus*'un idrar yolları epiteline afinitesi olup kadınlarda bu tip enfeksiyonlara rastlanılmaktadır.

2.9.5. Besin Zehirlenmeleri

Enterotoksin yapan stafilokokların pasta, süt, krema, et vb. besin maddelerinde üreyerek bu toksinlerini bırakmaları ve bu maddelerin yenilmesi ile oluşan gastrointestinal intoksikasyonlardır [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 1995].

2.10. Bağışıklık

Stafilokokların enfeksiyonlarında açıkça bağışıklık ortaya çıkmaz. Gerek doğal ve gerekse sonradan kazanılan dayanıklılık hümodal olmaktan çok sellüler olup daha çok mikroorganizmaların fagositozuna bağlıdır [Koneman et al., 1997; Bilgehan, 1995].

2.11. Epidemiyoloji ve Korunma

Stafilokoklar ortam koşullarına karşı dayanıklı mikroorganizmalar olup doğada çok yaygın bulunurlar. Enfeksiyon yapan patojen stafilokokların kaynağı daha çok insandır. Normal insan topluluğunda % 10-40 oranında stafilokok taşıyıcılığı vardır. Stafilokoklar nazofarinks ve daha çok burun deliklerine yakın burun mukozası ön kısmına yerleşirler. Buradan öksürük ve aksırık damlacıkları aracılığı ile yayılarak taşıyıcı kimselerin derisine, başka kimselerin deri ve üst solunum yollarına bulaşır. Özellikle mukus parçacıkları içinde kuruduklarını zaman uzun süre canlı kalırlar. Yatak, çarşaf, kapı tokmağı ve çevreye yayılırlar. Perineumda önemli bir taşıma bölgesidir [Bilgehan, 2001].

Stafilokokların epidemiyolojisinde en önemli ortam hastane ortamıdır. Bu yerlerde fazla kemoterapötik kullanılmaktadır. Hastalardan personele ve personelden hastalara bulaşan stafilokoklar gittikçe direnç kazanırlar. Bu dayanıklı kökenlerin devamlı taşıyıcıları, onların nazofarinkslerinde ve burun mukozalarında taşıyan sağlık personelidir. Özellikle doğum, premature, cerrahi ve kanser sağaltım servislerinde yatanların, bebeklerin ve loğusa kadınların enfeksiyonunda bu bulaşım yolu önemlidir. Faj tiplendirmesi suretiyle yapılan incelemeler, hastanelerde zaman zaman çıkan salgınların, aynı tipteki ve çalışan personelin nazofarinkslerinde ve burun mukozalarında bulunan stafilokoklar tarafından meydana getirildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu salgınlarda çoğu kez 80 ve 81 faj tipindeki stafilokoklar elde

edilmiştir. Stafilokok enfeksiyonların sağaltımında, iki noktanın göz önünde bulundurulması gerekmektedir:

1-Bu bakteriler kemoterapötiklere karşı hızla direnç kazanırlar. Bu nedenle bugün enfeksiyon getiren stafilokokların çoğunluğu ve hastanelerden izole edilen kökenlerin çoğu hemen hepsi bir veya birkaç antibiyotiğe dirençlidir. Bu nedenle kullanılacak antibiyotiğe karar vermeden önce, izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri yapılmalıdır.

2-Stafilokokların enfeksiyonlarının sağaltımında göz önünde tutulması gereken ikinci nokta ise bu enfeksiyonların niteliğidir. Bir kısım enfeksiyonlarda lezyonlar tam lokalize ve etrafı kan dolaşımının kolaylıkla aşamadığı fibrin zırhı ile çevrilidir. Bu tip enfeksiyonlarda genel yoldan uygulanacak kemoterapötik maddenin lezyonun ortasındaki bakterilere yeterli konsantrasyonda ulaşabileceği kuşkulu olup, genel kemoterapiye ayrıca cerrahi tedavinin ve lokal kemoterapinin eklenmesi gerekmektedir.

Hastanede çalışan sağlık personellerden sık sık burun ve nazofarinks sürüntülerinin alınması, taşıyıcı olanların maske kullanmaları, burun deliklerine basitrasın ve klorheksidin krem sürmeleri önerilmektedir. Yeni doğanların derisine sürülen hekzofloren benzeri antiseptikler, bulaşım etkisi azaltır. Sık sık el yıkamak ve metisiline dirençli stafilokokların kontamine olmuş malzemelerin (pansuman mal. vs.) kapalı yerde taşınıp sterilize edilmesi, stafilokok enfeksiyonların yayılmasını önlemede etkili olur.

3. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

Memeli protez ve peritoneal diyaliz kateterlerinde, ortapedik implantlar ve prostetik kalp kapakcıklarında, suprapubik kataterlerde, eklem protezi, serebrosipinal şant, invaziv vasküler kateterlerinde, insan vücudunda idrar yollarında, KNS'lar büyük enfeksiyonlara sebep olmaktadır [Ishak et al., 1985; Pfaller et al., 1988; Aydın ve ark., 1997; Yazgı ve ark., 1997; Van der Mei et al., 1997; Gürdoğan ve ark., 1999].

Hidrofilik mikroorganizmalar, elektrostatik itelemelerin eksikliğini veya varlığını dikkate almaksızın, hidrokarbonlara yapışmazken, hidrofobik mikroorganizmalar ise yalnızca, elektrostatik itelemeler azaldığında veya yokluğunda hidrokarbon fazlara yapıştığı gözlemlenmiştir [Van der Mei et al., 1997].

Medikal aygıtlarda sık sık kullanılan silikon ve kauçuğun KNS'ların kolonizasyon yapmasına eğilimli olduğu bildirilmiştir. Kanla temas halinde olan implant veya aletler kullanıldığında silikon ve kauçuk, plazma proteinleri üzerine çektiği için KNS'un adezyonundan önce bir tabaka oluşmaktadır. Bu tabakalardaki albumin ve fibrinojen proteinlerin, KNS'ların adezyonunu sitümüle ettiği açıklanmıştır [Van der Mei et al., 1997].

Amorena ve arkadaşları (1999), *S. aureus* suşlarında slime üretiminin, antibiyotik duyarlılıkları üzerindeki etkilerini ATP bioluminescence yönteminden yararlanılarak araştırmışlardır. Bu yöntem canlı hücrelerin ATP (Adenosine Triphosphate)'ı hidrolize etmesi esasına dayanmaktadır. TSB'da rifampisin ve novobiyosinin biyofilm oluşumunu azalttığı ($p<0.01$), sefazolin, vankomisin, penisilin, siprofloksasin, tobramisin, fosfomisin, sefuroksimin, bakterilerin biyofilm oluşturması üzerinde daha az etkili oldukları tesbit edilmiştir. Gentamisin ve eritromisinin ise etkili olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada biyofilm oluşumu, bakterinin antibiyotik direncinin olumlu yönde etkilediği saptanmıştır.

Gatermann ve Meyer (1995) tarafından, *S. saprophyticus*'un iki majör proteini açıklanmıştır. Bunlardan bir tanesi bakterinin adezyonundan sorumlu hemaglutinin proteini, diğeri ise *S. saprophyticus*'un yüzeyinde bulunan Ssp (*S. saprophyticus* surface-associated proteini)'dir. Anaerobik şartlar altında hemaglutinasyon titresi ve fibronektin bağlama artarken, Ssp proteinin üretimi bastırılmıştır [Atmaca et al., 2000].

Atmaca ve arkadaşları (2000), Gatermann ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya dayanarak, oksijenin slime oluşumunda rolünü belirtmek için, 14 *S. saprophyticus* suşunu kullanmışlardır. Bakterilerin slime üretimi mikrolept yöntemiyle ölçülmüştür. Anaerobik koşullar ise anaerobik jarda 24 h 37 °C'de inkübasyon yapılarak sağlanılmıştır. *S. saprophyticus*'un slime üretimi anaerobik şartlar altında indirgendiği görülmüştür. Aerobik ve anaerobik şartlar altındaki slime üretimi arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bir farklılık görülmüştür ($p<0.005$).

Meme iltihabına sebep olan *S. aureus* suşlarının çoğunluğunun, slime tabakasıyla çevrili olduğu tesbit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda *S. aureus*'un sebep olduğu meme iltihabı aşılarının, bu ekzopolisakkarit tabakalarını içerdiği açıklanmıştır [Aguilar et al., 2001].

Aguilar ve arkadaşları (2000), *S. aureus* suşları ve koyun cinsinden MGEC (Mammary Gland Epithelial Cell) hücreleri arasındaki etkileşimde slime maddesinin etkisini incelemiştir. Bakterinin aderansını artırmak için tripsin ile muamele edilen MGEC hücreleri, radyoaktif olarak işaretlenen bakteri süspansiyonu içine bırakılmıştır. Slime maddesine karşı antikorların sentezlenmesi için, slime maddesi Freund adjuvantları ile birlikte tavşan derisi altına enjekte edilmiştir. Tavşan serumundaki anti-slime antikorlar diğer immünglobulinlerden affinity chromatography ile ayırt edilmiştir. 50 µg/ml anti-slime IgGs, bakteri-hücre süspansiyonu ile 30 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. β counter (LKB Wallac) sisteminden yararlanılarak slime maddesine karşı antikorların anlamlı bir şekilde, slime kaplı *S. aureus* suşlarının MGEC hücreleri ile etkileşimini inhibe ettiği tesbit edilmiştir.

Baldassarri ve arkadaşları (2001), ortamdaki düşük seviyedeki demir konsantrasyonunun ya da besiyerine sonradan karbonhidrat eklenmesinin *S. aureus* suşlarının slime üretimini anlamlı bir şekilde artırdığını saptamışlardır ($p < 0.002$). *S. aureus* suşlarının ürediği ortamda demir konsantrasyonunu azaltmak için, Triptik Soy Broth, imidoasetik asit kenetleyici rezin ile muamele edilmiştir. Slime üretimini mikrolept yöntemiyle saptanmıştır.

Baldassarri ve arkadaşlarının çalışmalarını destekleyen başka bir çalışma 1991 yılında Wilcox ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Wilcox ve arkadaşları, HPD (Human Peritoneal Dialysate)'da demir konsantrasyonunun azaltılmasının, KNS suşlarının membran proteinlerinin profillerine etkisini araştırmışlardır. Hipertonik rafinoz solusyonunda lizostafin ile KNS'ların hücre duvarı ve stoplazmik membran komponentleri bakterinden ayrılmıştır. Hücre duvarı ve sitoplazmik membran proteinleri, % 12,5 SDS-PAGE jelde ayırt edilmiştir. HPD (Human Peritoneal Dialysate) ve NB (Nutrient Broth)'ta üreyen KNS'ların sitoplazmik membran proteinlerin profillerini araştırmışlardır. Immunoblotting tekniği, HPD'da büyüyen *S. epidermidis* türlerinde proteinlerin 40 kDa'dan 56 kDa'a kadar değişen yığınlarında olmasına rağmen, 32 ve 36 kDa IRMP (Iron- Repressible Membran Proteins)'ler yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur.

IRMP'lerin NB (Nutrient Broth)'da büyüyen KNS'larda iyi ekspresyonu yapılmadığı görülmüştür. Fakat NB ortamına EDDA (Etilen-Diamin Di-o-Didroksifenilasetik Asit) gibi sentetik demir kenetleyicisi eklenince bu proteinlerin indüklendiği görülmüştür. HPD yalnız ferrik demir (Fe^{3+}) içermediği gibi, aynı zamanda serum demir-bağlayıcı glikoprotein transferrin de içerir [Wilcox et al., 1991; Lindsay et al., 1994]. Yaşam için hayati önemi olan demirin, oksijen taşınmasında, elektron transferi, DNA sentezi, immün sistem gibi birçok fonksiyonda görevi vardır [Uysal ve ark., 1998; Uysal, 1999].

Amnendolia ve arkadaşları (1999), kliniklerden topladıkları stafilokok suşlarında slime üretimi ve SAA (Slime-Associated-Antijen) ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bakteri tarafından yapılan SAA ekspresyonu, double immunodiffusion yöntemiyle tesbit edilmiştir. Slime üretimi mikrolept yöntemiyle

ölçülmüştür. SAA ekspresyonu yapan stafilocoklarda, SAA negatif stafilocoklara göre kuvvetli slime üretimi görülmüştür. SAA pozitif stafilocokların slime üretiminin optik dansitesi (O.D.)'si (1.550 ± 0.99) ile SAA negatif stafilocokların slime üretiminin O.D.'si (0.588 ± 0.66) arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu çalışmada 115 stafilocok suşunun 45'i (% 39) Slime (+) SAA (+); 31'i (% 27) Slime (+) SAA (-); 39'u (% 34) Slime (-) SAA (-) çıkmıştır. Bu çalışmada slime (-) SAA (+) olan suşlar görülmemiştir. Stafilocokların bir yüzeye ilk önce aderans yapmasında kapsüler polisakkarit antijeni (PS/A) antijeni sorumlu iken, bakterilerin çoğalması sonucu oluşan daha sonraki yığılmadan SAA antijeni sorumludur. SAA'da PS/A gibi bir ekzopolisakkarittir.

Ayrıca bu çalışmada, bakterilerin büyüme ortamına % 1 glukoz eklenmesi sonucu slime üretiminin yüzde olarak % 34,7'den % 80,3'e yükseldiği görülmüştür ($p < 0.001$). Çalışmalarında glukoz eklenmesinin, sadece 3 stafilocok suşunda biyofilm üretiminde anlamlı bir etkisi görülmemiştir [Ammenedolia et al., 1999].

Baldassarri ve arkadaşları (1993), çeşitli kimyasal maddelerin, mikrolept yöntemiyle *S. epidermidis* suşunun slime üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bazı reaktifler tamamen slime tabakası oluşumunda etkisiz kaldığını, bazıları ise değişik etkilerde bulunduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmaya göre; % 10 formalin ve % 25 formalin, glutaraldehid ve FAAA (formalin-etanol %80 glasiyal asetik asit, 1:9:5) biyofilm oluşumunda etkisiz kalmıştır. Metanol, Carnoy solusyon (etanol-kloroform-glasiyal asetik asit, 15:5:1), ve Bouin fiksative (suyla doydurulmuş pikrik asit solusyon-formalin-glasiyal asetik asit, 15:5:1) slime oluşumunu artırmıştır.

Deighton ve arkadaşları (1993), büyüme ortamına EDDA (Etilen-Diamin Di-o-Hidroksifenol Asetik Asit) ekleyerek, ortamdaki demir konsantrasyonunun azaltılmasının, slime olumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Triptik Soy Broth, EDDA ile konsantrasyonları 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml olacak şekilde muamele edilmiştir. Mikrolept yöntemiyle, stafilocokların slime üretimi ölçülmüştür. Kuvvetli slime üreten stafilocokların slime üretimi 14, 18 ve 24 h'lik inkübasyonlarda, inkübasyon süresinin artmasına paralel olarak slime üretiminin

arttığı, inkübasyon süresi artıkça (48 h-72 h) slime üretiminin azaldığı görülmüştür. Zayıf slime üreten stafilokoklarda ise 14, 18 ve 24 h'lik periyodlarda anlamlı bir şekilde slime artışı görülmemiştir. 48 h ve 72 h'lik periyodlarda inkübasyon süresinin artmasına paralel olarak slime üretiminin arttığını görülmüştür.

Souli ve arkadaşları (1998), 22 mikrobiyal ajanlarının Muller Hilton Agar besiyerinde slime mevcudiyeti üzerindeki etkisini araştırmak için yarı kantitatif yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada; slime tabakasının varlığında perfloksasin, teikoplanin ve vankomisin etkilerinde göze çarpacak şekilde, sırasıyla % 30, % 52, % 63 oranında azalma görülmüştür. Slime mevcudiyetinin rifampisin üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır. Slime'in klindamisin üzerindeki etkisi minimum seviyede olmuştur. Diğer kullanılan kloksalin, amoksilin-klavulanik asit, imipenem, siprofloksasin, sefpirom, roksitromisin ve fusidik asit etkilerinin üzerinde az (<% 15) azalma görülmüştür.

Allignet ve arkadaşları (1999), 14 *S. caprae* suşunun, fibronektin ve kollajene aderansını araştırmışlardır. Her iki yanı PMMA (Polymethylmethacrylate) ile kaplı olan diskleri, içinde 0.5, 1 ve 2 µg insan fibrinojen ml⁻¹, bovine tip II kollajen olan bir soluyonla 37 °C 60 dk muamele edilmiştir. Bakteriler içinde [metil-³H] timidin olan MHB (Mueller Hinton Broth)'da inkübe edilerek, radyoaktif olarak işaretlenmiştir. Radyoaktif hesaplamalar ile *S. caprae*'nin fibronektine olan aderansı, kollajene olan aderansından yüksek olduğu görülmüştür.

Baldassarri ve arkadaşları (1997), slime maddesinin *S. epidermidis*'in cansız yüzeylere tutunmasındaki bakteriyel moleküllerin öneminin gizlediğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada *S. epidermidis*'in fibronektin, fibrinojen ve kollajen tip II'e bağlanma yeteneği değerlendirilmiştir. *S. epidermidis*'in fibronektin, fibrinojen ve kollajene bağlanması Gattermann ve Meyer (1994) tarafından anlatılan, teknikle yapılmıştır. Bakterilerin hidrofoik etkileşimleri Rosenberg ve arkadaşları (1980) tarafından anlatılan, teknikle ölçülmüştür. Slime defektif ya da slime negatif mutantları, slime pozitif parental suşlardan türetilmiştir. *S. epidermidis* ATCC 35984 ya da *S. epidermidis* M187 slime üreten suşlardır. HAM892 ve D9 slime negatif suşlar, ATCC 35984'den acryflavin mutagenesis ile türetilmiştir. M187'den transposon mutagenesis ile M187sn3 türetilmiştir.

M187'in mutanlığı M187sn3 fibronektine adezyonunda, fibronektin immobilize olsun-olmasın, 25-30 kat artış görülmüştür. Kollajene adezyonda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

ATCC 35984 ve onun slime-negatif slime türevi arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. ATCC 35984'ün mutanlarının fibronektine adezyonunda 6 kat artış görülmüştür. Kollajen adezyonu bakımında anlamlı bir fark bulunmamıştır. M187 ve ATCC 35984 ve onların türevleri arasında kollajene adezyonda anlamlı bir farklılık görülmemesinin sebebi, M187 ve ATCC 35984'ün kollajen reseptörlerinin bulunmamasıdır. Mutant-parental suşlardan elde edilen bilgileri doğrulamak için, klinik orjinli 53 izolat toplanmıştır. Bu çalışmada konakçı proteinlerin immobilize olmasının, çok iyi olmazsa bile bakterilerin adezyonunu başlattığı görülmüştür.

Pérez-Giraldo ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan çalışmada, değişik konsantrasyonlarında NAC (N-acetylcysteine)'in 15 *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşumunda, etkisini incelemişlerdir. NAC antibiyotik olmayan bir maddedir. Mukus içinde disülfid bağlarını parçalayan mukolitik ajandır. Sekresyon viskozitesini indirger. NAC farklı konsantrasyonlarda Triptik Soy Broth ile muamele edilmiştir. Mikropleyt yöntemiyle slime üretimi ölçülmüştür. NAC konsantrasyonu 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/ml artıkça biyofilm olumunda azalma görülmüştür. NAC, çok düşük konsantrasyonlarda bile (0.015-0.12 mg/ml) biyofilm oluşumunu indirgemıştır.

Williams ve arkadaşları (1997), *S. aureus* suşlarının silikon yüzeye aderans yaptıkları zaman, antibiyotik duyarlıklarını incelemişlerdir. Silikon kateter yüzeylere yapıştığı zaman *S. aureus*'un tetrasiklin, benzilpenisilin ve vankomisine duyarlılığı 2-10 kat azalmıştır. Bu çalışmada planktonik ve aderant olarak iki bakteri kültürü yapılmıştır. Bu iki bakteri kültürü arasındaki fark, aderant kültürlerinin içinde, kateter disklerinin olmasıdır. Aderant hücrelerde rifampisin ve fusidik asit duyarlılığında anlamlı değişiklik olmamıştır. Aderant bakterilerin planktonik kültürlerde üreyen bakterilere göre daha yavaş büyüdüğü görülmüştür. Aderansın artmasıyla antibiyotiklere karşı duyarlıklarının azaldığı görülmüştür.

König ve arkadaşları (2001), slime üreten *S. epidermidis* RP62A ve onun izojenik mutanları olan slime üretmeyen *S. epidermidis* M7'nin dört farklı kemik çimentosu diski üzerindeki durumunu araştırmışlardır. Bu kemik çimentosu diskleri şunlardır;

- 1-Palakos R: PMMA (Polymethylmethacrylate)'dan oluşmuştur.
- 2-Refobasin Palakos R: PMMA ve gentamisinden oluşmuştur.
- 3-Genta-Klinda: PMMA, gentamisin ve klindamisinden oluşmuştur.
- 4-Osteopal HA: PMMA ve Granüle HA (Hydroxyapatite)'den oluşmuştur.

Bakteriyel adezyonu incelemek için, sterilize edilmiş kemik çimentosu (1,5 cm çapında ve 1 mm kalınlığında) disklerini, TSB süspansiyonların içine yerleştirilmiştir. 24 h inkübasyondan sonra, RP62A suşları, en çok Palakos R diskleri üzerine (1.10×10^9 cfu/ml) yığılma yapmıştır. Oysaki M7 suşları, ilk aderansını ($4,35 \times 10^7$ cfu/ml) gentamisin/klindamisin disklerine yapmışlardır.

König ve arkadaşları, farklı kemik çimento disklerini kanlı agar pleytlerine yerleştirmişlerdir. 37 °C 48 h inkübasyondan sonra, Refobasin R, Osteopal HA ve Refobasin Palakos disklerinin etrafında, RP62A ait büyüme inhibisyon zonu oluşmamıştır. Fakat gentamisin/klindamisin disklerinin etrafında büyüme inhibisyon zonu oluşmuştur.

Kotilainen ve arkadaşları (December, 1990) yaptıkları çalışmada, 108 KNS suşlarından, Ludwicka ve arkadaşları (1984) tarafından açıklanan teknikle elde edilen ekstrasellüler eksraktın, combined gas liquid chromatography-mass spectrometry yöntemiyle, başlıca komponentler olarak mannoz, galaktoz, glukoz ve ribozu içerdiğini saptamışlardır. *S. hominis* ve *S. epidermidis* suşlarında aynı tür dahilinde aderant olsun-olmasın, monosakkaritlerin göreceli konsantrasyonları aynı çıkmıştır. Bu sonuç, KNS'ların aderansı ve analiz edilen dört monosakkaritin herhangi birisinin ekstrasellüler üretimi arasında bir ilişki bulunmadığını göstermiştir. Glukozun göreceli konsantrasyonu *S. epidermidis* ve *S. hominis* suşlarında aynı olmasına rağmen, *S. hominis* suşlarının içerdiği mannoz, galaktoz ve riboz miktarı daha fazla çıkmıştır .

Gerke ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan çalışmada, *S. epidermidis* suşlarında PIA biyosentezinde bulunan genlerin bireysel aktivitesi sonucu, N-asetilglukosaminiltransferazın aktivitesini nasıl etkilendiği araştırılmıştır. PIA üretimi ve proteinleri, immunoblot yöntemiyle saptanmıştır. Yalnız *icaA* geni ekspresyonu düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi göstermiştir. *icaA* ve *icaD* koekspresyonu yapması, aktivitede anlamlı bir artış göstermiştir. Son yıllarda *icaD*'nin *icaA* ve *icaB* arasında olduğu fakat bu genlerle üst üste olduğu tesbit edilmiştir. *icaD*'nin başlangıcı *icaA*'nın son 37 nükleotiti ile üst üste gelmektedir. *icaD*'nin son kısmı *icaB* geninin başında bulunan 4 nükleotiti ile üst üste gelmektedir. *icaAD* tarafından oluşturulan oligosakkaritin uzunluğu ince tabaka kromatografisi tarafından 20 birim kadar olduğu görülmüştür. Oysa PIA en azından tam uzunluğu 130 birim kadardır. Yalnız *icaA* ve *icaD*, *icaC* ile birlikte ekspresyon yaparsa, PIA-spesifik antiserumlarla birlikte reaksiyon gösterirse oligomer zincirler sentezlendiği görülmüştür.

Allignet ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, *S. caprae*'nin *ica* operonundaki genleri, *S. aureus* ve *S. epidermidis* türlerinin *ica* operonundaki genlerle karşılaştırıldığında, *icaA*, *icaB* ve *icaD* genleri açısından ($\geq$ % 68) oranında benzerlik, *icaC* genleri açısından ($\geq$ % 73) oranında, *icaR* (Repeat) genleri açısından ($\geq$ % 70) oranında benzerlik görülmüştür.

Klonitsiou ve arkadaşları (2000), slime üreten *S. epidermis* suşlarında, 80 kDa peptidoglikan ve teikoik asit gibi maddelerin özgüllüğünü ve onların immünoaktivitesini araştırmışlardır. Tavşanlarda bu komponentlere kaşı yükseltilen immünooglobulinler, Sephadex G-25 gel chromatography ile saflaştırılmıştır. Antiserumların imünolojik analizi ELISA yöntemiyle yapılmıştır. 20 kDa PS'ler, 80 kDa peptidoglikan ve teikoik asit gibi moleküllerden daha az immünojenik, teikoik asite karşı olan antikorların yeterince koruyucu olmadığını görülmüştür. Bunun sebebi olarak, onların slime tabakasının içinde gömülmüş olmasıdır. 20 kDa PS'ye karşı olan antikorlar hem insanda hem de in vitro olarak görülmüştür ki, daha etkili ve koruyucudur.

Kotilainen ve arkadaşları (April, 1991), aderant ve slime üreten stafilok suşlarında slime maddesinin immünokimyasal analizini yapmışlardır. 168 stafilokok

suşundan izole ettikleri ham slime maddesini tavşanlarda immünize etmişlerdir. Bakterilerin slime tabakasına yerleşmiş antikörlerin hedef antijenleri, immunoelectron microscopy ile gösterilmiştir. Antijenleri immünoblotting tekniğiyle karakterize edilmiştir. 80 kDa'dan daha yüksek moleküler yığınlar ve çoğunluğu 30 kDa'dan daha yüksek moleküller yığınlar bulunmuştur. Slime faktörü, tüp testi ile araştırılmıştır. 110 *S. epidermidis* 106'sının (% 96) 30 kDa antijen ekspresyonu yaptığı tesbit edilmiştir. 30 kDa antijen pozitif antijenlerde 58'i tüp testi pozitif ve 48'i tüp testi negatif çıkmıştır. 30 kDa antijen negatif olan *S. epidermidis* suşlarında tüp testi negatif çıkmıştır. Tüp testi ile yüksek moleküler yığınlar arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Heinzelmann ve arkadaşları (1998), *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984) ve onun slime negatif varyantın insan polimorf nükleer nötrofillerinde (PMNs) fagositoz edilmesini flow cytometry sistemiyle araştırmışlardır. Fagositozis deneylerde slime üreten *S. epidermidis* RP62A, slime üretmeyen *S. epidermidis* RP62A-NA'dan yüksek fagositozis indeks göstermiştir ve bu farklılık fagositoz sırasında 2., 5., 10. ve 30. dk'da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Fagositozis indeksleri, bakterinin sindirimini değerlendirebilirken, süperoksit üretimi gibi mikrobiyal öldürücü alt basamakları belirleyememektedir. Bunun için aynı numunelerden izole edilen bakterilerin, flüoresans olmayan HE (Hydroethidine)'nin flüoresans EB (Ethidium Bromide)'e dönüşmesinden yararlanarak, süperoksit üretimi ölçülmüştür. RP62A'nın PMNs tarafından fagositoz edilmesi sırasında süperoksit üretimi, slime negatif *S. epidermidis* suşlarının fagositozis edilmesi sırasında süperoksit üretiminden istikrarlı olarak yüksek bulunmuştur. RP62A-NA'nın fagositozis edildikten sonra süperoksit üretimi, RP62A ile kıyaslandığı zaman 2dk geç başlamıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

S. epidermidis RP62A ve RP62A-NA arasındaki hidrofobik farklılıklar, modified hydrophobic interaction chromatography ile belirlenmiştir. *S. epidermidis* RP62A'nın süspansiyon içinde fagositozu artarken, hidrofobisitesi artmıştır. *S. epidermidis* RP62A'nın hidrofobisitesi, RP62A-NA'nın hidrofobisitinden düşük

çıkıştır. Hidrofobisiti, bakterinin genellikle PMNs tarafından fagositozu artmasıyla ve virulansının artmasıyla korelasyon halindedir.

Heinzelmann ve arkadaşlarının buldukları sonuçlar, Kristinsson ve arkadaşlarının (1988), buldukları sonuçlardan farklı çıkmıştır. Kristinsson ve arkadaşları 43 planktonik stafilokok suşu üzerinde, luminol-dependent chemiluminescence yöntemiyle opsonofagositozis üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Kristinsson ve arkadaşlarına göre; ekstrasellüler slime (sadece 20 suş slime üretmiştir) tabakasının ne opsonizasyon üzerinde ne de opsonisasyon için gereken maddeler üzerinde etkisi yoktur ve bakteriyel öldürücülerin slime üreten bakteriler üzerinde farklı bir etkisi olmamıştır.

Cramton ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada, in vitro olarak *ica* lokusunda delesyonların stafilokok suşlarında PIA üretiminde, biyofilm oluşturma yeteneğinde kayıplara sebep olduğu görülmüştür. *S. aureus* ATCC 35556'dan kromozomal DNA, primer SA11 v SA12 kullanılarak, amplifiye edilmiştir. pBT₅ vektörünün KpnI sitlerinin içine klonlanmıştır. 5862 nükleotitin 2132 nükleotitin delesyonuna uğramış, pSC18 plazmidin bir kısmını amplifiye etmek için SA14 ve SA15 primerleri kullanılmıştır. pT181mcs plazmidinde tetrasiklin rezistans kasetini amplifiye etmek için tet-6 ve tet-2 primerleri kullanılmıştır. *S. aureus* ATCC suşlarında, *ica* geni pT181 plazmidinde tetrasiklin kasetiyle yer değiştirerek, sıcaklık duyarlı pSC23 plazmidi yapılmıştır. ATCC 35556 *ica* Δ::tet suşu yaratılmıştır. *ica* operonunda delesyona uğramış *S. aureus* mutantlarında, artık PIA üretimi görülmemiştir.

Arciola ve arkadaşları (2001), stafilokok suşlarındaki *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı ile Kongo kırmızılı agar yöntemi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. *icaA* ve *icaD* genleri PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR karışımı agaroz jele yüklenilmiştir. 91 stafilokok (68 *S. epidermidis* ve 23 *S. aureus*) suşunu çalışma kapsamına alınmıştır. *S. aureus* suşlarının % 61'i *icaA* ve *icaD* genlerini taşıdığı aynı zamanda Kongo kırmızılı agarda slime ürettiği görülmüştür. *S. epidermidis* suşlarının % 49'u *icaA* ve *icaD* genlerini taşıdığı ve Kongo kırmızılı agarda slime ürettiği görülmüştür.

4. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışmada; GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde laboratuvara gönderilen örneklerden ve Haydarpaşa Numune Devlet Hastanesi (yatan hastalar için olan) Mikrobiyoloji laboratuvarından elde edilen 90 KNS (Koagülaz Negatif Stafilokok) suşu incelemeye alınmıştır.

4.1. Materyal Toplama

Stafilokoklar çok değişik doku, organ ve sistemlerde kolonizasyon oluşturup enfeksiyonlara yol açabildiği için, laboratuvara gelen tüm numuneler stafilokoklar yönünden incelenmiştir.

4.1.1. Stafilokokların İzolasyonu

İdrar, boğaz, hemokültür, burun, apse, deri ve mayi gibi gaita dışındaki tüm numuneler kanlı agara ekildi. 24 h 37 °C'de etüvde inkübe edildi.

4.1.1.1. Kanlı Agar

Genel kullanım amaçlı bir besiyeridir.

Brain Heart Infusion Broth (Biolife)	38 gr
Distile su	1000 ml

Karıştırılarak eritildi. 120 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi. 50 °C'ye kadar soğutuldu. Defibrine koyun kanı ya da insan kanından 75 ml ilave edildi. Karıştırılıp plaklara döküldü.

4.1.1.2 Mannitollü Tuzlu Agar (Chapman Besiyeri)

Karışık flora bakterisi içeren materyalden stafilokokların ayırt edilmesi için kullanılan ayırt edici ve seçici bir besiyeridir. İçerdiği tuz miktarı nedeniyle bir çok gram negatif ve gram pozitif bakterilerin üremeleri baskılanır. Ayrıca *Staphylococcus aureus* mannitollü fermante ederek besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayırıcının rengini sarıya çevirir.

Sığır Eti Ekstresi	1 g
Pepton	10 g
NaCl	75 g
D-Mannitol	10 g
Fenol Kırmızısı	25 mg
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

Maddeler ısıtılarak eritildi. Bir iki dakika kaynatıldı. 120 °C’de 15 dk otoklavda steril edildi. Plak ya da yatık olarak katılaştırmak üzere tüplere dağıtıldı. Ekimler 18-24 h sonra incelendi.

4.2.2 Stafilokokların İdenfikasyonu

4.2.2.1. Gram Boyama

Üreme saptanan petri kaplarındaki bakteri kolonilerine gram boyama yapıldı. Gram boyama yapıldıktan sonra, hazırlanan preparat ışık mikroskopunda incelendiği zaman, gram pozitif (mor renkte) ve üzüm salkımı morfolojisinde görülen bakterilere katalaz testi uygulandı. Katalaz pozitif olan bakteriler stafilokok cinsinden, katalaz negatif olan bakteriler streptokok cinsinden suşlar olarak değerlendirildi. Ancak eski kültürlerinde, boyayı bırakmasına bağlı olarak gram negatif görünüm verebilirler. Bu nedenle boyamaların taze kültürlerden yapılmasının önemi vardır.

4.2.2.2. Pigment Oluşumu

Stafilokoklarda pigment oluşumu idenfikasyonda büyük değer taşımaz. Ortam koşulları pigment oluşmasında önemli etki yaparlar. Pigment oluşu 25 °C’de 37 °C’ye göre daha iyi olur. Pigment oluşumu koloni incelemesiyle anlaşılamadığında, beyaz bir süçgeç kağıdı ile koloniden alınarak yayılmış ve kuruduktan sonra açıkça görülür [Bilgehan, 1995].

4.2.2.3. Katalaz Deneyi

Stafilokok ve mikrokokların, streptokok üyelerinden ayırt edici bir deneydir. İçerisinde kan bulunmayan besiyerlerinde (jeloz v.b.) üretilmiş kolonilerden öze ile alınıp bir lamin üzerine konuldu. Üzerine bir iki damla H₂O₂ (hidrojen peroksit)

damlatıldı. Katalaz olumlu bakteriler gaz kabarcıkları oluştururlar. Stafilokoklar katalaz pozitif, streptokoklar katalaz negatif bakterilerdir.

4.2.2.4.Koagülaz Deneyi

S. aureus'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Koagülaz deneyi tüp yöntemiyle yapıldı.

Tüp deneyi: Burada besiyerlerinde üreyen stafilokokların oluşturdukları ve besiyerine saldıkları bağımsız koagülaz araştırıldı. Bu enzim niteliğindeki madde plazmada bulunan bir faktör olan CRF (Coagulase Reacting Factor) ile ilişki kurar ve fibrojeni pıhtılaştırır. Bu işlem için kalsiyum iyonlarına gereksinim yoktur [Bilgehan, 1995].

1. Steril bir deney tüpüne 2,5 cc'lik serum fizyolojik tuzlu su koyuldu.
2. 24 h inkübasyondan sonra kanlı agar plakında oluşmuş bir koloni öze ile alınıp, fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edildi.
3. Bu süspansenin üzerine 250 µl insan kanı plazması ya da tavşan kanı plazması eklendi.
4. Deney tüpü içeriğiyle iyice çalkalandı. 37 °C'de 24 h inkübe edildi.

24 h inkübasyondan sonra pıhtı oluşması pozitif ve oluşmaması da negatif sonuç olarak kabul edildi.

S. aureus dışında bazı bakteriler örneğin *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve özellikle *S. faecalis* gibi bazı enterokoklar koagülaz aktiviteleriyle değil sitratı metabolize etmek suretiyle plazmayı pıhtılaştırıp yanlış olumlu sonuçlar vereceklerinden plazmanın pıhtılaştırmasını önleyici olarak sitrat yerine, EDTA kullanılması tercih edilir. Bu yöntemle göre; 1ml kan içine için 1 mg hesabı ile EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid =Versene) ile alınıp pıhtılaşması engellenen insan ya da tavşan kanından santrifüjleyerek plazma ayrılır [Bilgehan, 1995].

Koagülaz negatif çıkan stafilokoklara, tür tayini yapmak için çeşitli testler uygulandı. Bu testler; üreaz testi, çeşitli şekerlerden asit üretimi, novobiyosin

duyarlılık testi, basitrasin duyarlılık testi, alkalen fosfataz testi ve nitrat redüksiyon testleridir.

4.2.2.5. Üreaz Testi

Bu test üreyi amonyağa hidrolize edebilme yeteneğindeki stafilokokların ayırımında kullanılmıştır.

Substrat :

Urea Agar Base	24 g
Distile su	950 ml

Tüm maddeler karıştırıldıktan sonra pH 7'ye ayarlandı, otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. Filtrasyon ile sterilize edilen 10,4 ml % 20'lik üre, substrata ilave edildi ve daha önceden sterilize edilen cam tüplere 5 ml olmak üzere dağıldı. Test yapılacağı zaman agar plağında bir öze dolusu bakteri alınarak tüpe inoküle edildi ve 37 °C'de 24 h inkübe edildi. Üre besiyerinin somon rengi, pembe- kırmızı renge dönüştüğünde üreaz aktivitesinin varlığını ve pozitif sonucu gösterir (Resim 4.1.).

Resim 4.1. Stafilokok suşlarının üreaz besiyerinde verdiği renk değişimleri; pembe renk üreaz pozitif, somon sarısı renk üreaz negatif olarak değerlendirildi.

4.2.2.6. Stafilokokların Şekerlere Etkisi

Şeker Ana Besiyeri (ŞAB) :

Phenol Red Broth (Difco)	15 gr
Distile su	1000 ml

Bu karışım tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı ve otoklavda 121 °C’de steril edildi.

Çalışmak istediğimiz şeker	5 gr
Distile su	50 ml

Bu karışım Benmari’de üç gün üst üste 60 °C’de 60 dk tutularak tinalize edildi ve steril hale getirildi.

Daha sonra:

4,5 ml ŞAB + 0.5 ml test edilecek şeker (maltoz, sükroz, fruktoz, ksiloz, laktoz vs.) karıştırılarak steril tüplere dağıtıldı. Türünü belirtmek istediğimiz bakterinin kolonilerinden öze ile alınarak tüplere ekim yapıldı ve 37 °C’de 24 h sonra incelendi. Bakterinin asit oluşturmasına bağlı olarak tüpteki kırmızı rengin sarıya dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Resim 4.2).

Resim 4.2. Stafilokokların şekerlere etkisi; kırmızı renk negatif, sarı renk pozitif olarak değerlendirildi.

4.2.2.7. Novobiyosin Duyarlılık Deneyi

1. Mc Farland 0.5 bulanıklığında homojen bakteri süspansiyonları hazırlandı.
2. Bir eküvyon çubuğu ile süspansiyondan alınarak Muller–Hilton Agar besiyerinin yarısına yaymak suretiyle ekim yapıldı.
3. Yüzey kuruduktan sonra ekimin ortasına 5 µg novobiyosin diski yerleştirildi ve 37 °C’de 18-24 h bekletildi.
4. Oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçüldü. 16 mm ve daha küçük inhibisyon zonu oluşturan bakteriler dirençli olarak kabul edildi. 16 mm’den büyük olanlar duyarlı kabul edildi (Resim 4.3.).

Resim 4.3. Stafilokok suşları novobiyosine duyarlı olduğundan, diskin etrafında zon oluşmuş.

4.2.2.8. Basitrasin Duyarlılık Testi

1. Mc Farland 0.5 bulanıklığında homojen bakteri süspansiyonları hazırlandı.
2. Bir eküvyon çubuğu ile bu süspansiyondan alınarak Muller-Hilton Agar besiyerinin yarısına yaymak suretiyle ekim yapıldı.
3. Yüzey kuruduktan sonra ekiminin ortasına 0,04 U basitrasin diski yerleştirildi ve 37 °C’de 18-24 h bekletildi.

4. Oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçüldü. 10 mm ve daha küçük inhibisyon zonu oluşturan bakteriler dirençli olarak kabul edildi.

Stafilokokların mikrokoklardan ayırımı basitrasin testi ile yapıldı. Stafilokoklar 0,04 U basitrasine dirençli oldukları halde mikrokoklar duyarlıdır [Bilgehan, 1995; Koneman et al., 1997].

4.2.2.9. Alkalen Fosfataz Testi

Bu test için p-NPP (p-Nitrophenyl Phosphate) agar kullanıldı [Geary and Stevens, 1989; Koneman et al., 1997].

p-NPP Agar:

Muller Hilton Agar (Oxoid)	16 g
Anhydrous Sodyum Karbon	2,5 g
Sodyum Bikarbonat	1,1 g
Distile su	500 ml

Bu maddelerin hepsi karıştırıldı. HCl ile pH: 5,6-5,8'e ayarlandı. Bu içerik 120°C'de otoklavda steril edildi. Daha sonra 45 °C'ye kadar soğutuldu. 500 ml'ye 300 mg Sigma'nın p-nitro fenil fosfat (tris formu) eklendi. Daha sonra bu besiyeri petri kaplarına döküldü. Besiyeri donduktan sonra + 4 °C'de saklandı [Geary et al., 1989].

Öze ile kanlı agardan aldığımız bakteri kolonisini p-NPP agara ekildi. 37 °C'de 18-24 h sonra inkubasyondan sonra eğer parlak sarı renk olursa alkalen fosfataz testi pozitif, beyaz renkte bir üreme görülürse alkalen fosfataz testi negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 4.4).

Bazı bakteriler gerek katı gerekse sıvı besiyerlerinde fosfataz enzimi oluşturabilirler. Bu aktivitenin tayini özellikle patojen stafilokok türlerinin idenfikasyonunda önemlidir. Keza bazı enterik bakteriler özellikle *Proteus*, *Providencia* suşları fosfataz oluştururlar [Bese, 1974].

p-NPP agar ilk kez 1989 yılında C. Geary ve M. Stevens tarafından stafilokok türleri tarafından fosfataz üretimini bulmada yeni bir yöntem olarak açıklanmıştır. Daha önce alkalin fosfataz enziminin varlığı için PPP-agar (Phenol Phtalein Phosphate Agar) kullanılıyordu [Bese, 1974]. Fakat PPP-agarda sonuç için 7 gün beklemek gerekmektedir. Ayrıca PPP-agarda sonuç alabilmek için besiyerine amonyak eklenmesi de gerekmektedir. p-NPP-agar ise PPP-agar besiyerine göre daha avantajlıdır. PPP-agarda reaksiyon yavaş gelişmektedir. p-NPP agarda ise sonucu görmek için 18-24 h yeterlidir. PPP-agar zayıf-şüpheli reaksiyonlar vermekte iken, p-NPP agar ise daha güvenilir ve kuvvetli sonuçlar vermektedir. p-NPP agarda, PPP agar gibi sonuç değerlendirmede amonyak damlatılmasına gerek yoktur. p-NPP agar, az madde içerdiği için PPP-agar gibi pahalı bir yöntem değildir. p-NPP agarın pH'ı, fosfataz üretimi için optimum şartları sağlamıştır (pH: 5,6 – 5,8) [Geary and Stevens, 1989]

Resim 4.4. p-NPP agarda alkalin fosfataz testin pozitif (sarı) ve negatif (beyaz) olduğu üremelerin görülmesi

4.2.2.10. Nitrat Buyyonu ve Nitrat redüksiyon Deneyleri

Bakterilerin nitratları redükleyip nitrit ve daha ileri ürünlerin ortaya çıkması başta Enterobacteriaceae'lerin tanınmasında önemli özelliklerdir. *Enterobacter agglomerans*'ın bazı biyotipleri ve *Erwinia* türlerinde bazıları dışında tüm

Enterobacteriaceae bakterileri nitratları redükte ederler. Bu deneylerle *Haemophylus neisseria* ve *Branhemella* 'larında tanınmasında yararlanılır [Bilgehan, 1995].

Besiyerleri :

Nitrat buyyonu:

Sığır Eti Özütü	3 g
Pepton	5 g
Potasyum Nitrat (KNO ₂)	1 g
Saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. pH'sı; 7.0 olmalıdır.	

Sıcak su banyosunda ısıtılarak eritildi. 121 °C 15 dk steril edildi. Tüplere dağıtıldı.

A ayırıcı	: Alfa naftilamin	0,5 g
	Asetik asit (5N) % 2.20	100 ml
B ayırıcı	: Sülfanilik asit	0,8 g
	Asetik asit (5N) % 2.20	100 ml
C ayırıcı	:Çinko tozu	

Saf kültür halindeki incelemekte olan bakteriden bir öze miktarı, nitrat buyyonuna ekildi. 37 °C 18-24 h inkübe edildi. Bu süre sonunda bu kültürlerle sırası ile önce A sonra, B ayırıcı damlatıldı. Otuz saniye içerisinde kırmızı bir renk oluşması ortamda nitritlerin varlığını yani bakterilerin nitratları redükte etmiş olduğunu gösterir (Resim 4.5.).

Otuz saniye içerisinde renk oluşmaz ise besiyerine bir miktar çinko tozu döküldü. Çinko, nitratları nitritlere redükte eder. Tozun eklenmesi ile otuz saniye içerisinde kırmızı renk oluşursa o zaman besiyerindeki nitratların bakteriler tarafından redükte edilmemiş olduğu, eklenen çinko tarafından redükte edildiği anlaşılmıştır ve nitrat redükte deneyi olumsuz kabul edilmiştir. Çinko eklenmesine karşın yine renk oluşmaz ise bu kez ortamda nitrat kalmadığı, nitratların bakteriler tarafından nitritlerden öteye amonyak, NO, NO₂ ve N gazlarına dönüştürülmüş olduğu anlaşılmıştır. Bu durumda bakterinin nitrat redüksiyonu yine olumlu olarak değerlendirildi.

Kontrol organizmaları olarak her yeni besiyeri ve ayıraç yapıldığında olumlu kontrol için *E. coli*, olumsuz kontrol olarak da *Acinetobacter calcoaceticus* kullanıldı [Bilgehan, 1995].

Resim 4.5. Nitrat redüktaz testinde kırmızı renk pozitif olarak, kırmızı renk yoksa negatif olarak değerlendirildi.

4.2.2.11. API (Analytic Profile Index)

Yukarda sayılan testler yapıldığı halde Çizelge 2.2'ye (Bkz.) göre idenfikasyonu yapılamayan stafilocok suşlarının türünü son yıllarda geliştirilmiş API Staph sistemi ile tesbit edilmiştir. API Staph sistemi tür tayini yaparken, stafilocok suşlarının çok sayıda test gerçekleştirme olanağı, okuyucu makinesiyle de değerlendirme kolaylığı sağlamaktadır. Bu çalışmada ID 32 Staph API sisteminden (bio Mérieux, France) yararlanıldı (Resim 4.6.).

Tür tayini yapılamamış stafilocok suşlarının Mc Farland ayarı 0.5'e ayarlandı. Mc Farland (bulanıklık) ayarı yapılırken, bakteri API sisteminin özel solusyonlarında süspense edildi. Daha sonra API panellerinin her kuyucuğuna bu süspansiyondan 55 µl ilave edildi. 24 h etüvde inkübasyondan sonra, kuyucuklarında bakteri süspansiyonunu taşıyan API panellerinin soldan ilk 3 kuyucuğuna sırasıyla Fast

mavisi, Nitrit 1 ve Nitrit 2 ayrıçaları damlatıldı. 5 dk bekletildikten sonra API sisteminin optik okuyucusunda (bio-Mérieux, Seri no: IN S001719, France) paneli okutuldu. Bakterinin türü tesbit edildi.

Resim 4.6. Resimde ID Staph API paneli görülmektedir.

4.3. Antibiyotik Duyarlıklarının Araştırılması

Türü tanımlanan stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) standartlarına uygun olarak disk agar difüzyon testi ile belirlenmiştir.

a) Muller Hilton Agarın Hazırlanması:

Muller-Hilton Agar (Biolife)	36 g
Distile su	1000 ml

1-Muller-Hilton Agar distile suda eritilmiş, pH 7.4'e ayarlanarak otoklavda steril edildi.

2-Besiyerleri 9 mm çapındaki steril petrilere 4 mm derinlik olacak şekilde dökülmüş ve kontaminasyon kontrolü yapılmıştır.

b) Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri:

Çalışmada; vankomisin, teikoplanin, oksasilin, penisilin, kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, levofloksasin, norfloksasin, trimetoprim sülfametaksazol ve nitrofurantoin antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılmıştır. Antibiyotik diskler, + 4 °C’de saklanmıştır.

c) Disk agar difüzyon testinin uygulanması:

2,5 ml serum fizyolojik içeren tüplerde Mc Farland’ı 0.5 bulanıklığında olacak şekilde bakteriler süspanse edilmiştir. Bakteri süspansiyonu eküvyon yardımıyla Muller-Hilton Agar besiyerine sürüldükten sonra antibiyotik diskleri steril pens yardımıyla yerleştirilmiş ve 37 °C’de 24 h inkübe edilmiştir.

d) Sonuçların değerlendirilmesi:

Disklerin etrafındaki bakteri büyüme inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüş ve NCCLS standartlarına uygun olarak değerlendirilmiştir.

4.4. Slime Yapımı ve Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması

4.4.1. Slime Maddesi

Virulans faktörlerinde yer alan slime faktör, ekstrasellular bir madde olup, bakterinin plastik ve metal yüzeylere aderansını artırmakta, antibiyotiklerin difüzyonunu inhibe ederek mikroorganizmaya ulaşmalarını, mitojenlere karşı lenfoproliferatif cevabı, kemotaksis gibi polimorf nükleer lökosit fonksiyonlarını ve bakterinin fagosit olmasını engellemektedir [Aydınlı ve ark., 1997; Heinzelmann et al., 1997; Henke et al., 1997]

4.4.2.Çeşitli Klinik Numenelerin Kültürlerinden İzole Edilen KNS

Suşların Slime Faktör Sentezlenmesinin Üç Farklı Yöntemle Araştırılması

4.4.2.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi

Agar	10 g (Difco)
Sükroz	12,5 g
Brain Heart Infusion Broth	9 g (Biolife)
Kongo Kırmızısı	0,2 g

Tüm maddeler karıştırıldı 250 ml suda eritildi, otoklavda steril edildi. Petri kaplarına döküldü. + 4 °C’de saklandı.

Kongo kırmızılı agara bakteriler ekildi. Besiyerini karatan KNS’lar slime pozitif olarak kabul edildi. Pembe ya da kırmızı renkteki üremeler ise slime negatif olarak kabul edildi (Resim 4.7.) [Aydınlı ve ark., 1997; Gürdoğan ve ark., 1999; Arciola et al., 2001].

Resim 4.7. Kongo kırmızısı agar besiyerinde KNS’larda slime üretiminin gösterilmesi 1-Siyah koloniler, slime pozitif 2-Kırmızı koloniler, slime negatif olarak değerlendirildi.

4.4.2.2.Makro-Tüp Yöntemi

İçinde 5ml Trypticase Soy Broth (37 g/L) (Merc) içeren tüplere tüplere Mc Farland'ı 1 bulanıklığında ekimler yapıldı. Tüpler 37 °C'de 48 h saat inkübe edildi. Tüpler ters çevrilerek içerikleri yavaşça döküldü. % 1'lik safranin solusyonu eklendi. 5 dk çalkaladıktan sonra içerikleri boşaltıldı. Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bekletildi. Ertesi gün ya da tüpler kuruduktan sonra, okumalar yapıldı. Tüplerin üzerindeki biyofilm tabakasının yoğunluğuna göre (+), (+ +), (+ + +) ve ya (-) olarak değerlendirmeler yapıldı. Tüpün iç yüzeyinde halka oluşması slime pozitif olarak kabul edildi. Eğer tüpün kurutma kağıdına gelen ağzında halka oluşmuşsa, slime negatif olarak kabul edildi (Resim 4.8.) [Pfaller et al., 1988; Aygen ve ark., 1996; Gürdoğan ve ark., 1999].

Resim 4.8. Makro-Tüp yöntemiyle slime oluşturan ve oluşturmayan KNS suşlarının değerlendirilmesi

1. Negatif sonuç: Tüpün çevresinde belirgin biyofilm tabakası oluşmamıştır.
2. (+) ve (+ +) sonuç: Tüp üzerinde oluşan biyofilm tabakasının yoğunluğunun derecesini bildirmektedir.
- 3.(+ + +) sonuç: Tüp yüzeyinde yoğun bir biyofilm tabakası oluşmuştur. Bu bakterinin kuvvetli slime üreticisi olduğunu gösterir.

4.4.2.3. Mikropleyt Yöntemi

Trypticase Soy Broth (37 g/ml) içeren tüplere Mc Farland ayarı 1 olan ekimler yapıldı ve mikropleyt kuyucuklarına 200 µl aktarıldı (Resim 4.9.). Mikropleytin 5 kuyucuğuna steril Trypticase Soy Broth (TSB) koyuldu. 37 °C’de 48 h etüvde inkübe edildi. Mikropleyt çukurları mikroeliza cihazında fosfat tamponuyla (PBS) ile 2 defa yıkandı. % 0.25’lik safranin solusyonu pastör pipeti yardımıyla mikropleyt kuyucuklarına ilave edildi. 30 dk. bekletildi. Daha sonra mikropleyt kuyucukları mikroeliza cihazında distile su ile bir veya iki defa yıkamayla, safranin boyası giderildi. Kuyucuklar mikroeliza cihazında (Humareader, microelisa, seri no: 200770, USA) 492 nm dalga boyunda optik dansiteleri (O. D) okundu. Sadece TSB (steril) koyulan 5 kuyucuğun O. D.’lerinin ortalaması alındı. Bu değerler üzerinde olan kuyucuklardaki bakteriler slime pozitif, bu değerlerin altında olan kuyucuklardaki bakteriler slime negatif olarak kabul edilmiştir [Pfäller et al., 1988; Deighton and Borland, 1993; Aygen ve ark., 1996; Gürdoğan ve ark., 1999]. Mikropleyt yöntemi için gerekli olan fosfat tamponlu tuzlu suyun hazırlanması [Bilgehan, 1995] aşağıda anlatılmıştır.

FOSFAT TAMPONLU TUZLU SU:

A eriği:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g

% 4’lük fenol kırmızısından 5 ml

800 ml saf su ile tamamlandı, 121 °C’de otoklavda steril edildi.

B eriği:

MgCl ₂	0,1 g
Distile su	100 ml

Eritildi. 121 °C’de otoklavda steril edildi.

C eriği:

CaCl ₂	0,1 g
Distile su	100 ml

Eritildi. 121 °C’de otoklavda steril edildi.

Kullanma eriği: 8 kısım A + 1 kısım B + 1 kısım C eriyikleri karıştırıldı.

Resim 4.9. Mikropleyt yöntemiyle KNS'larda slime yapımının araştırılması

İSTATİSTİKSEL İNCELEMELER:

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlardan olan frekans dağılımlarının yanısıra niteliksel verilerin karşılaştırılması ise Ki-Kare testi ve Fisher Exact Ki-Kare testi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

5. BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan stafilokokların slime üretimi üç yöntemle göre tesbit edilmiştir ve neticeleri Tablo 5.1’de açıklanmıştır.

No	Numune Tipi	Üreyen bakteri türü	SLİME FAKTÖRÜ				
			Mikropleyt		KONGO		TÜP
			O. D.	P/N	Renk	P/N	
1.	İdrar	<i>S. hominis</i>	0,746	P	Siyah	P	+4
2.	İdrar	<i>S. hominis</i>	0,375	P	Bordo	P	+1
3.	Mayi	<i>S. warneri</i>	0,426	P	Siyah	P	+1
4.	İdrar	<i>S. auricularis</i>	1,017	P	Pembe	N	-
5.	Kan	<i>S. hominis</i>	0,635	P	Pembe	N	+1
6.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	3,290	P	Siyah	P	+4
7.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,540	P	Siyah	P	+4
8.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,418	P	Siyah	P	+2
9.	İdrar	<i>S. haemolyticus</i>	0,369	P	Bordo	P	+2
10.	İdrar	<i>S. simulans</i>	0,388	P	Bordo	P	+1
11.	Kateter	<i>S. warneri</i>	0,589	P	Bordo	P	+2
12.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,488	P	Bordo	P	+2
13.	Yara	<i>S. caprae</i>	0,345	N	Açık siyah	P	+2
14.	Cilt altı	<i>S. epidermidis</i>	0,847	P	Siyah	P	+4
15.	Kateter	<i>S. saccharolyticus</i>	0,482	P	Pembe	N	-
16.	Kateter	<i>S. sciuri</i>	0,860	P	Bordo	P	+2
17.	Kateter	<i>S. cohnii</i>	0,898	P	Bordo	P	-
18.	Kateter	<i>S. epidermidis</i>	0,527	P	Siyah	P	-
19.	Kan	<i>S. saprophyticus</i>	0,504	P	Bordo	P	+2
20.	İdrar	<i>S. haemolyticus</i>	0,787	P	Bordo	P	+2
21.	Kan	<i>S. xylosus</i>	0,597	P	Pembe	N	+2
22.	Kateter	<i>S. lentus</i>	0,627	P	Açık siyah	P	+1
23.	Kan	<i>S. capitis</i>	0,696	P	Bordo	P	+1
24.	Kan	<i>S. haemolyticus</i>	0,437	P	Bordo	P	+1
25.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,480	P	Siyah	P	-
26.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,522	P	Siyah	P	+1
27.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,444	P	Bordo	P	+1
28.	Kan	<i>S. auricularis</i>	0,424	P	Bordo	P	+1
29.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,438	P	Siyah	P	+1
30.	İdrar	<i>S. simulans</i>	0,358	N	Bordo	P	+1
31.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,707	P	Siyah	P	+4
32.	Kan	<i>S. warneri</i>	0,449	P	Bordo	P	+2
33.	Kateter	<i>S. haemolyticus</i>	0,371	P	Bordo	P	+2
34.	Kateter	<i>S. hominis</i>	0,935	P	Açık siyah	P	+3
35.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,597	P	Bordo	P	+2
36.	Yara	<i>S. epidermidis</i>	0,476	P	Açık siyah	P	+2
37.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,542	P	Açık siyah	P	+2
38.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,582	P	Bordo	P	-
39.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	2,599	P	Siyah	P	+3

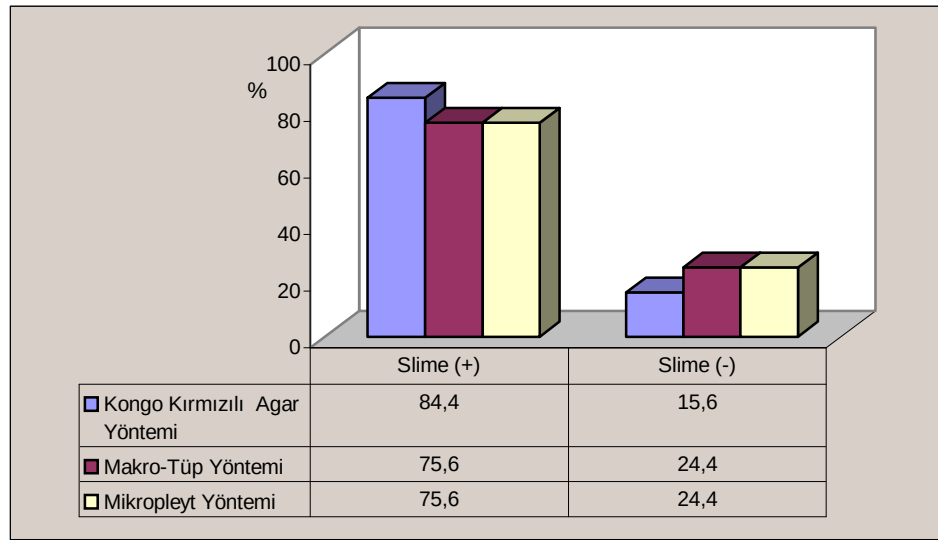
40.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,362	P	Bordo	P	-
41.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,364	P	Bordo	P	-
42.	Kan	<i>S. xylosus</i>	0,393	P	Pembe	N	+2
43.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,590	P	Bordo	P	-
44.	Kateter	<i>S. haemolyticus</i>	0,666	P	Bordo	P	+2
45.	Boğaz	<i>S. epidermidis</i>	0,429	P	Bordo	P	+2
46.	Burun	<i>S. caprae</i>	1,092	P	Pembe	N	+2
47.	Kan	<i>S. xylosus</i>	0,460	P	Bordo	P	+2
48.	İdrar	<i>S. simulans</i>	0,366	P	Bordo	P	+1
49.	Boğaz	<i>S. epidermidis</i>	0,697	P	Bordo	P	-
50.	Apse	<i>S. epidermidis</i>	0,378	P	Bordo	P	+1
51.	Boğaz	<i>S. haemolyticus</i>	0,827	P	Bordo	P	+2
52.	Kan	<i>S. lugdunensis</i>	0,423	P	Bordo	P	+1
53.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,346	N	Bordo	P	-
54.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	1,568	P	Açık siyah	P	+2
55.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,505	P	Açık siyah	P	+2
56.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,500	P	Bordo	P	+1
57.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,382	P	Bordo	P	+1
58.	Kateter	<i>S. epidermidis</i>	0,273	N	Bordo	P	+1
59.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,214	N	Siyah	P	+1
60.	Kateter	<i>S. haemolyticus</i>	0,153	N	Pembe	N	-
61.	İdrar	<i>S. haemolyticus</i>	0,238	N	Bordo	P	-
62.	Yara	<i>S. capitis</i>	0,355	N	Açık siyah	P	+1
63.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,291	N	Bordo	P	-
64.	İdrar	<i>S. simulans</i>	0,673	P	Açık siyah	P	+3
65.	İdrar	<i>S. cohnii</i>	0,498	P	Siyah	P	+1
66.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,397	P	Bordo	P	-
67.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,342	N	Açık siyah	P	-
68.	Kan	<i>S. warneri</i>	1,086	P	Açık siyah	P	+3
69.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	1,897	P	Siyah	P	+3
70.	Kateter	<i>S. epidermidis</i>	0,417	P	Bordo	P	+1
71.	Kateter	<i>S. lugdunensis</i>	0,488	P	Bordo	P	-
72.	Kateter	<i>S. epidermidis</i>	0,139	N	Bordo	P	-
73.	İdrar	<i>S. auricularis</i>	0,611	P	Siyah	P	+3
74.	Kan	<i>S. warneri</i>	0,273	N	Siyah	P	+3
75.	Boğaz	<i>S. epidermidis</i>	0,251	N	Bordo	P	-
76.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,269	N	Bordo	P	-
77.	Kan	<i>S. epidermidis</i>	0,190	N	Bordo	P	+1
78.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,264	N	Bordo	P	-
79.	Kateter	<i>S. cohnii</i>	0,319	N	Bordo	P	+1
80.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,330	N	Pembe	N	+3
81.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,346	N	Pembe	N	+2
82.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,404	P	Pembe	N	+2
83.	İdrar	<i>S. sciuri</i>	0,398	P	Bordo	P	+2
84.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,428	P	Pembe	N	+1
85.	Kan	<i>S. lugdunensis</i>	0,317	N	Bordo	P	+3
86.	Kan	<i>S. cohnii</i>	0,388	P	Pembe	N	-
87.	Kan	<i>S. haemolyticus</i>	0,332	N	Pembe	N	+1

88.	Kan	<i>S. haemolyticus</i>	0,368	P	Bordo	P	+1
89.	İdrar	<i>S. epidermidis</i>	0,347	N	Pembe	N	+1
90.	İdrar	<i>S. haemolyticus</i>	0,518	P	Bordo	P	+2

* **O. D.**= Optik Dansite **P**= Pozitif **N**= Negatif O. D > 0,359 ise Slime Pozitif O. D. < 0,359 ise Slime Negatif

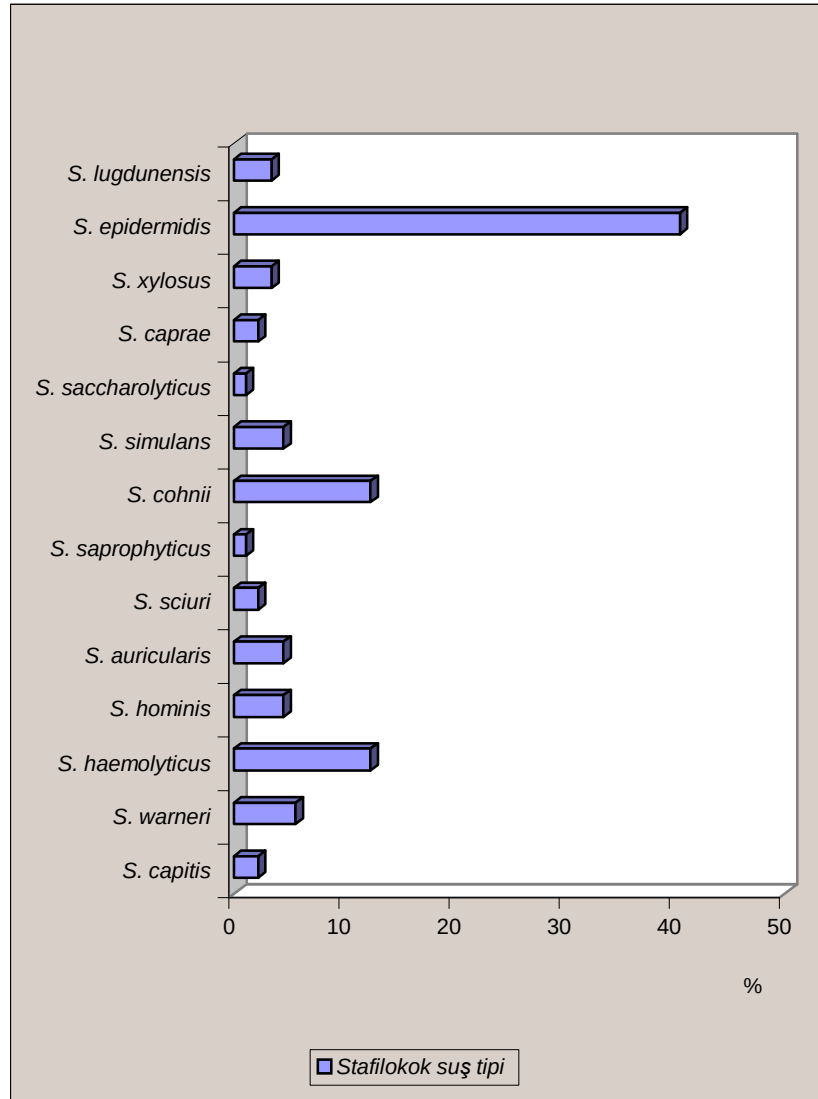
Tablo 5.2. Üç ayrı yöntemle göre KNS suşlarında slime oluşturma dağılımı

	Pozitif	Negatif	Toplam
Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	76 (% 84,4)	14 (%15,6)	90 (% 100)
Makro-Tüp Yöntemi	68 (% 75,6)	22 (% 24,4)	90 (% 100)
Mikropleyt Yöntemi	68 (% 75,6)	22 (% 24,4)	90 (% 100)



Grafik 5.1. Üç ayrı yöntemle göre KNS suşlarında slime oluşturma dağılımı

Grafik 5.1’de görüldüğü gibi 90 KNS suşunun Kongo kırmızılı agar yöntemine göre 76’sı (% 84,4), makro-tüp yöntemine göre 68’i (% 75,6), mikropleyt yöntemine göre 68’i (% 75,6) slime pozitif bulunmuştur. Kongo kırmızılı agar yöntemine göre 14’ü (% 15,6), makro-tüp yöntemine göre 22’si (% 24,4) ve mikropleyt yöntemine göre 22’si (% 24,4) slime negatif bulunmuştur. Slime faktörünü bulmada kullanılan üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Grafik 5.2. Numunelerden izole edilen KNS'lerin türlere göre dağılımı

Tablo 5.3'de ve Grafik 5.2.'de görüleceği gibi çeşitli numunelerden izole edilen 90 KNS suşunun 2'si (% 2,2) *S. capitis*, 5'i (% 5,6) *S. warneri*, 11'i (% 12,2) *S. haemolyticus*, 4'ü (% 4,4) *S. hominis*, 4'ü (% 4,4) *S. auricularis*, 2'si (% 2,2) *S. sciuri*, 1'i (% 1,1) *S. saprophyticus*, 11'i (%12,2) *S. cohnii*, 4'ü (% 4,4) *S. simulans*, 1'i (% 1,1) *S. saccharolyticus*, 2'si (% 2,2) *S. caprae*, 3'ü (% 3,3) *S. xylosus*, 36'ı (% 40) *S. epidermidis*, 3'ü (% 3,3) *S. lugdunensis* olarak saptanmıştır.

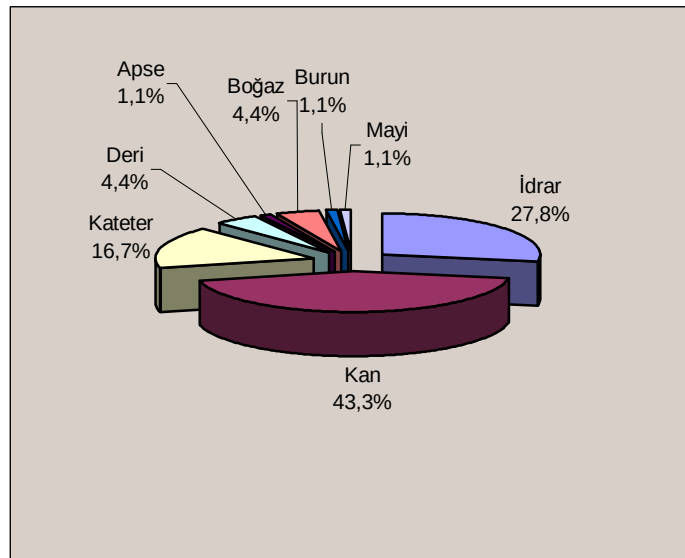
Tablo 5.3. KNS suşlarında türlerine göre slime oluşturma dağılımı

Stafilokok türleri	SLİME (+)	SLİME (-)	TOPLAM
<i>S. capitis</i>	2 (% 2,7)	-	2 (% 2,2)
<i>S. warneri</i>	5 (% 6,7)	-	5 (% 5,6)
<i>S. haemolyticus</i>	9 (% 12)	2 (% 14,3)	11(% 12,2)
<i>S. hominis</i>	2 (% 2,7)	2 (% 14,3)	4 (% 4,4)
<i>S. auricularis</i>	4 (% 5,3)	-	4 (% 4,4)
<i>S. sciuri</i>	2 (% 2,7)	-	2 (% 2,2)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (% 1,3)	-	1 (% 1,1)
<i>S. cohnii</i>	7 (% 9,3)	4 (% 28,6)	11 (% 12,2)
<i>S. simulans</i>	4 (% 5,3)	-	4 (% 4,4)
<i>S. saccharolyticus</i>	1 (% 1,3)	1 (% 7,1)	1 (% 1,1)
<i>S. caprae</i>	1 (% 1,3)	1 (% 7,1)	2 (% 2,2)
<i>S. xylosus</i>	1 (% 1,3)	2 (% 14,3)	3 (% 3,3)
<i>S. epidermidis</i>	34 (% 45,3)	2 (% 14,3)	36 (% 40)
<i>S. lugdunensis</i>	3 (% 4)	-	3 (% 3,3)

Tablo 5.3.'de görüleceği gibi, *S. capitis* (% 2,7), *S. warneri* (% 6,7), *S. auricularis* (% 5,3), *S. sciuri* (% 2,7), *S. saprophyticus* (% 1,3), *S. simulans* (% 5,3) ve *S. lugdunensis* (% 4) suşlarının hepsi slime pozitif çıkmıştır. Diğer geri kalan slime pozitif suşlardan; 9'u (% 12) *S. haemolyticus*, 2'si (% 2,7) *S. hominis*, 7'si (% 9,3) *S. cohnii*, 1'i (% 1,3) *S. saccharolyticus*, 1'i (% 1,3) *S. caprae*, 1'i (% 1,3) *S. xylosus*, 34'ü (% 45,3) *S. epidermidis* çıkmıştır. Slime negatif suşlardan; 2'si (% 14,3) *S. haemolyticus*, 2'si (% 14,3) *S. hominis*, 4'ü (% 28,6) *S. cohnii*, 1'i (% 7,1) *S. saccharolyticus*, 1'i (% 7,1) *S. caprae*, 2'si (% 14,3) *S. xylosus* ve 2'si (% 14,3) *S. epidermidis* çıkmıştır.

Tablo 5.4. KNS suşlarının izole edildikleri kültürlerinin numune tipine göre dağılımı

Numune tipi	n	%
İdrar	25	27,8
Kan	39	43,3
Kateter	15	16,7
Deri (Cilt altı + yara)	4	4,4
Apse	1	1,1
Boğaz	4	4,4
Burun	1	1,1
Mayi	1	1,1



Grafik 5.3. KNS suşlarının izole edildikleri kültürlerinin numune tipine göre dağılımı

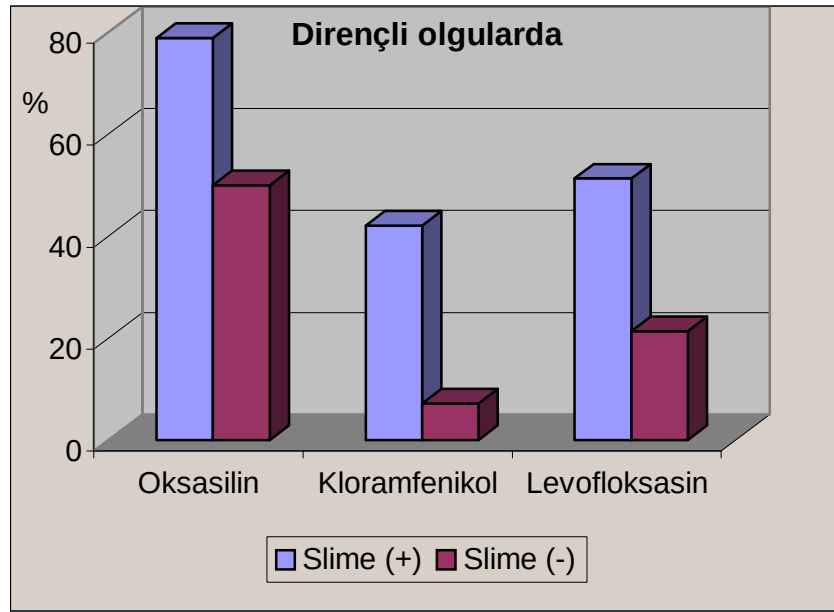
90 KNS suşunun 25'i (% 27,8) idrar, 39'u (% 43,3) kan, 15'i (% 16,7) kateter, 4'ü (%4,4) deri, 1'i (% 1,1) apse, 4'ü (% 4,4) boğaz, 1'i (% 1,1) burun ve 1'i (% 1,1) mayi kültürlerinden izole edilmiştir.

Tablo 5.5. Slime pozitif ve slime negatif KNS suşlarında çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik ve duyarlılık durumları

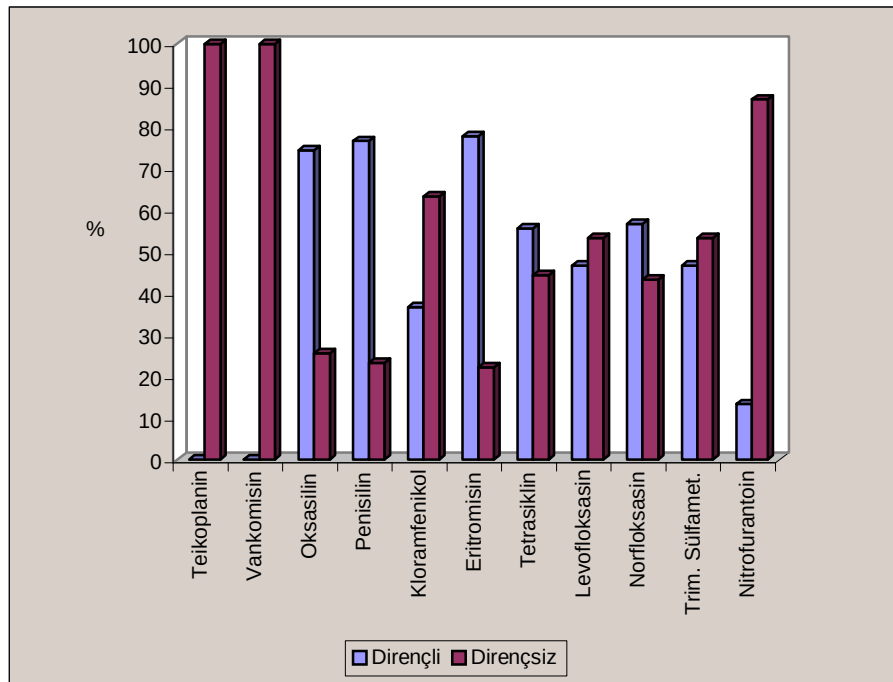
Antibiyotikler	SLİME POZİTİF		SLİME NEGATİF		TOPLAM		P
	Dirençli	Dirençsiz	Dirençli	Dirençsiz	Dirençli	Dirençsiz	
Teikoplanin	0	76 (%100)	0	14(%100)	0	90 (%100)	
Vankomisin	0	76 (%100)	0	14(%100)	0	90 (%100)	
Oksasilin	60 (%78,9)	16 (%21,1)	7 (% 50,0)	7 (%50,0)	67 (%74,4)	23 (%25,6)	0,022*
Penisilin	59 (% 77,6)	17 (% 22,4)	10 (% 71,4)	4 (% 28,6)	69 (% 76,7)	21 (% 23,3)	0,614
Kloramfenikol	32 (42,1)	44 (% 57,9)	1 (% 7,1)	13 (% 92,9)	33 (% 36,7)	57 (% 63,3)	0,013*
Eritromisin	61 (% 80,3)	15 (% 19,7)	9 (% 64,3)	5 (% 35,7)	70 (% 77,8)	20 (% 22,2)	0,186
Tetrasiklin	45 (% 59,2)	31 (% 40,8)	5 (% 35,7)	9 (% 64,3)	50 (% 55,6)	40 (% 44,4)	0,104
Levofloksasin	39 (% 51,3)	37 (% 48,7)	3(% 21,4)	11 (% 78,6)	42 (% 46,7)	48 (% 53,3)	0,039*
Norfloksasin	46 (% 60,5)	30 (% 39,5)	5 (% 35,7)	9 (% 64,3)	51 (% 56,7)	39 (% 43,3)	0,085
Trimetoprim Sülfametaksazol	38 (% 50,0)	38 (50,0)	4 (% 28,6)	10 (% 71,4)	42 (% 46,7)	48 (% 53,3)	0,140
Nitrofurantoin	11 (% 14,5)	65 (% 85,5)	1 (% 7,1)	13 (% 92,9)	12 (% 13,3)	78 (% 86,7)	0,458

* p<0.05 anlamlı fark vardır

Çalışma kapsamına alınana tüm KNS'larda, teikoplanin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençli suş bulunmamıştır. Slime pozitif suşlarda **oksasiline** karşı direnç oranı slime negatif suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Slime pozitif ve negatif suşlarda penisiline karşı direnç oranı birbirine yakın bulunmuş olup anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Slime pozitif suşlarda **kloramfenikole** karşı direnç oranı slime negatif suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Eritromisin ve tetrasikline karşı direnç oranları slime durumuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Slime pozitif suşlarda **levofloksasine** karşı direnç oranı slime negatif suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Norfloksasin, trimetoprim sülfametaksazol ve nitrofurantoin antibiyotiklerine karşı direnç oranı ise slime durumuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0.05$).



Grafik 5.4. Tüm dirençli suşlarda slime durumuna göre oksasilin, kloramfenikol ve levofloksasin antibiyotiklerine karşı dirençlilik dağılımı

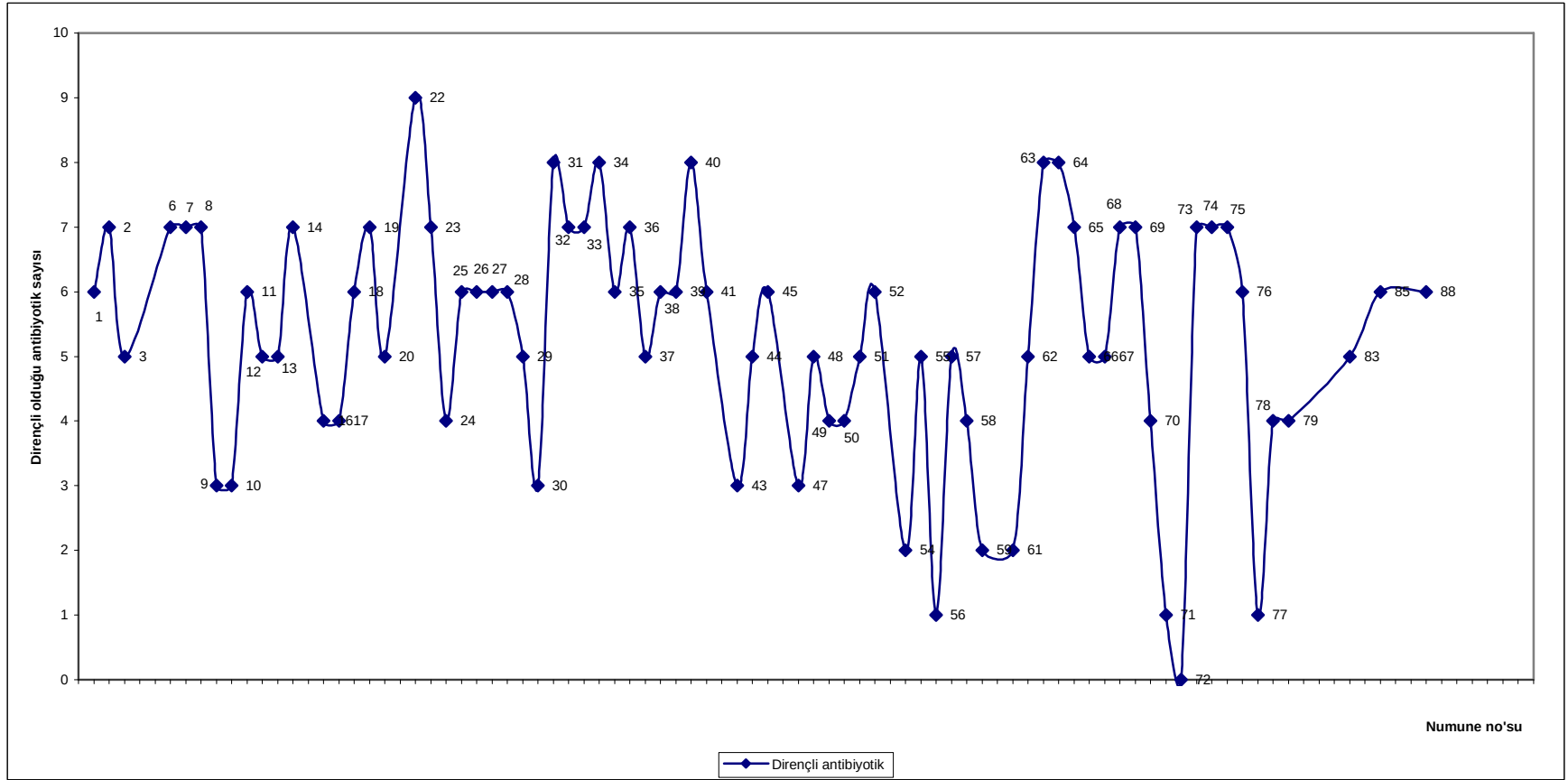


Grafik 5.5. 90 KNS suşunun antibiyotik çeşitlerine göre dirençlilik ve duyarlılık dağılımı

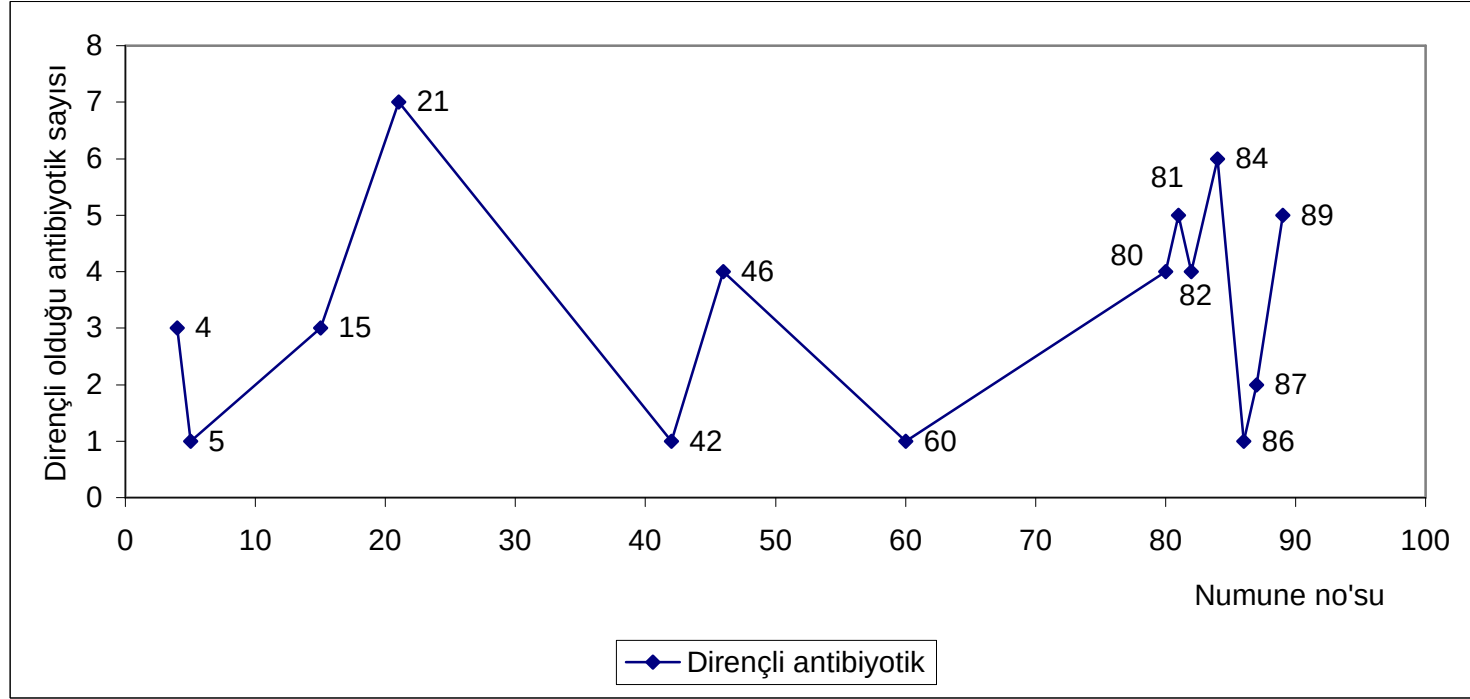
90 (% 100) KNS suşlarının tümü vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine dirençsiz çıkmıştır. 67'si (% 74,4) oksasiline dirençli ve 23'ü (% 25,6) oksasiline duyarlı çıkmıştır. 69'u (% 76,7) penisiline dirençli ve 21'i (% 23,3)'ü duyarlı

çıkılmıştır. 33'ü (% 36,7) kloramfenikole dirençli ve 57'si (% 63,3) kloramfenikole duyarlı çıkmıştır. 70'i (% 77,8) eritromisine dirençli ve 20'si (% 22,2) duyarlı çıkmıştır. 50'si (% 55,6) tetrasikline dirençli ve 40'ı (% 44,4) duyarlı çıkmıştır. 42'si (% 46,7) levofloksasine dirençli ve 48'i (% 53,3) duyarlı çıkmıştır. 51'i (% 56,7) norfloksasine dirençli ve 39'u (% 43,3) duyarlı çıkmıştır. 42'si (% 46,7) trimetoprim sülfametaksazola dirençli ve 48'si (% 53,3) duyarlı çıkmıştır. 12'si (% 13,3) nitrofurantoine dirençli ve 78'i (% 86,7) duyarlı çıkmıştır.

İstatistik sonuçlarına ve Grafik 5.5.'e bakılırsa, stafilokok suşları, en çok teikoplanin, vankomisine ve nitrofurantoine duyarlı çıkmıştır. Tüm stafilokok suşlarının en çok dirençli olduğu antibiyotikler oksasilin, penisilin ve eritromisin antibiyotikleridir.



Grafik 5.6. Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime pozitif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayılarına göre dağılımı



Grafik 5.7. Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime negatif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayılarına göre dağılımı

Grafik 5.6.'da Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime pozitif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayılarına göre dağılım grafiği yapılmıştır. Grafik 5.6. ve Grafik 5.7'de kategori (X) ekseninde bulunan ‘*numune no'su*’ Tablo 5.1.'deki ‘*No*’ sütununa göre yapılmıştır. Grafik 5.6.'ya baktığımız zaman slime pozitif olan ve dirençli olduğu antibiyotik sayısının en az olduğu, 3 suş görülmektedir. Bunlar; Tablo 5.1. ve Grafik 5.6.'ya göre numune no'su 56, 72 ve 77 olan suşlardır. Mikropleyt yöntemi, Kongo kırmızılı agar yöntemi ve makro-tüp yöntemine göre sırasıyla şu değerler elde edilmiştir. 56 numune no'lu suş için; 0,500, Bordo, ve (+1), 72 numune no'lu suş için; 0,139, Bordo ve (-), 77 numune no'lu suş için; 0,190, Bordo ve (+1)'dir. Görüldüğü gibi 3 suşunda üç yöntemle göre slime üretimi ya negatif çıkmıştır ya da düşük pozitif (zayıf slime üretimi) çıkmıştır.

Grafik 5.7.'de Kongo kırmızılı agar yöntemine göre slime negatif çıkan suşlarda dirençli antibiyotik sayılarına göre dağılım grafiği yapılmıştır. Grafik 5.7.'de Kongo kırmızı yöntemine göre slime negatif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayısına göre, en yüksek olan 21 numune no'lu suşun dirençli olduğu antibiyotik sayısı 7 çıkmıştır. 21 numune no'lu suş için Tablo 5.1'e baktığımızda, mikropleyt yöntemi, Kongo kırmızılı agar yöntemi ve makro-tüp yöntemine göre sırasıyla şu değerler elde edilmiştir; 0,597, Pembe ve (+2) çıkmıştır. Üç yöntemin en az ikisinde de yüksek slime üretimi görülmüştür.

Grafik 5.6.'ya baktığımızda slime pozitif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayısı (3-7) aralığında yoğunlaşmaktadır. Grafik 5.7.'ye baktığımızda slime negatif suşlarda dirençli olduğu antibiyotik sayısı (1-4) aralığında yoğunlaşmaktadır. Grafik 5.6.'ya ve Grafik 5.7.'ye baktığımızda slime pozitif KNS suşlarının dirençli olduğu antibiyotik sayısı, slime negatif KNS suşlara göre daha fazla oldukları görülmüştür.

Bu çalışmada, bakterilerin antibiyotiklere dirençli olmasında, taşıdıkları çeşitli antibiyotik direnç genlerinin rolünü inkar edildiği düşünülsün. Bu çalışmanın amacı; **kuvvetli slime üretiminin**, antibiyotiklerin bakteriye olan difüzyonunu engelleyen bir bariyer olduğunu göstermektir.

6. TARTIŞMA

Deri florasının dominant üyesi olan KNS'lar son 20 yılda etyolojide önem kazanmış mikroorganizmalardır. Özellikle prostatik kalp kapakçığı, eklem romatizması, serebrospinal şanti, intravenöz veya peritoneal diyaliz kateterleri olan hastalardaki enfeksiyonlarda, hastane kaynaklı veya toplumdan kazanılmış üriner sistem enfeksiyonları, immün düşkün kişilerde oluşan bakteriyemiler, osteomyelit, postoperatif endoftalmitis gibi enfeksiyonlarda sıklıkla etken olarak izole edilmektedir [Aydınlı ve ark., 1997].

Koagülaz negatif stafilokoklar; çeşitli tıbbi cihazlarda plastik ve metal yüzeylerine kolayca tutunabilmeleri, metabolizmalarının düşük olması, besin maddelerine gereksinimlerinin az olması ve metisilin ve diğer yarısentetik penisilinlere direnci enfeksiyon yapan önemli etkenler arasında kabul edilmektedir [Mulder, 1996; Toldos et al., 1997; Diler, 1997].

Bakteriler yabancı cisim üzerine yapıştıktan sonra bir virulans faktörü olduğu düşünülen "slime üretimine" başlamakta ve bir süre sonra bol miktarda üretilen slime tabakasının içine gömülmektedirler. Bu durumda bu biyolojik tabaka, içine gömülen KNS'ları bir difüzyon bariyeri olarak antibiyotiklerin etkisinden korumaktadır [Gürdoğan ve ark., 1999]. Slime maddesi ayrıca KNS'ları fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksis ve opsonositofajiyi önler, nötrofil etkisini inhibe eder, lenfosit aktivitesini azaltır ve bu etkileriyle de bakteriye virulans kazandırır [Yazgı ve ark., 1997].

Yazgı ve arkadaşları (1997), çeşitli kliniklerden soyutlanan stafilokok suşlarının "slime yapımı" ve "protein A" yönünden incelemişlerdir. Slime faktörünü Christensen (makro-tüp) yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışmalarında 240 suşun 38'inde (% 15,8) protein A, 51'nde (% 21,3) slime pozitif bulunmuştur. Buna karşılık 165 *S. epidermidis* suşunda 50'sinin (% 30,3), 11 *S. saprophyticus* suşundan da 1'inin (% 9,1) slime yaptığını saptamışlardır. Ancak kan kültürlerindeki izole edilen suşlardaki % 38,7'lik oranı, slime faktörün bakteriye kazandırdığı sonda, kateter vb. düz yüzeylere yapışabilmeleri ve intavenöz girişimler sırasında bu

organizmaların kan dolaşımına geçebileceğini göstermektedir. Protein A pozitif olan 38 *S. aureus* suşunun hiçbirisinde slime faktörü; benzer şekilde slime pozitif olan 51 KNS suşunun hiçbirisinde protein A bulunmamıştır. Protein A pozitif suşların hepsinin *S. aureus* olduğu anlaşılmıştır.

Aydınlı ve arkadaşları (1997), değişik klinik örneklerden izole edilen KNS suşlarının slime faktör oluşturma sıklığını Kongo kırmızılı agar yöntemiyle araştırmışlardır. 105 (% 80) yara sürüntüsü, 21 (% 16) kateter uygulanan hastalardan alınan kan ve beş (% 4) idrar örneğinden izole edilen, toplam 131 KNS suşu çalışma kapsamına almışlardır. Yara örneklerinden izole edilen KNS'ların 45'inde (% 43), hemokültürlerin 12'sinde (% 57) slime pozitif saptamışlardır. Beş idrar örneğinden izole edilen KNS'ların hepsi slime pozitif bulunmuştur. Suşların tümünde slime pozitif KNS oranı % 47 olarak saptanmıştır.

KNS suşları özellikle hastane şartlarında her yerde bulunurlar ve yüksek oranda metisiline dirençlidirler. Stafilokok başlangıçta duyarlı oldukları antibiyotiklere karşı zamanla direnç kazanırlar. Bu durum, özellikle hastane ortamında daha sık gelişir [Diler, 1997; Bilgehan, 2000].

MRS (Metisiline Rezistans Stafilokok) suşlarının hastane içinde yayılmasında, taşıyıcı hastalar ve hastane personelinin rolü önemlidir. Özellikle hastane çalışanları, MRS suşlarını geçici olarak taşımakta ve elleri aracılığıyla hastalara bulaştırmaktadırlar [Diler, 1997; Bilgehan, 2000]. Bu aşamadan sonra o hastanede nozokomiyal *S. aureus* enfeksiyonlarının insidansında artış olduğu birçok araştırmacı tarafından doğrulanmaktadır [Diler, 1997]. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki; stafilokokların metisiline dirençli olması betalaktam antibiyotiklere, sefalosporinlere ve imipenem gibi antibiyotiklere in vitro duyarlı olsalar bile, in vivo olarak dirençli olmaktadır. Bu yüzden stafilokokların metisilin direnci stafilokokların enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir faktördür [Mulder, 1996; Bilgehan, 2000].

Gürdoğan ve arkadaşları (1999), kan kültürlerinden izole edilen 100 KNS'larda standart tüp, mikrodilüsyon plak, Christensen ve Kongo kırmızılı agar yöntemi olmak üzere 4 ayrı yöntemle slime yapımını araştırmışlardır. 100 KNS suşunun standart tüp metodu ile % 61, mikrodilüsyon plak yöntemi ile % 63, Kongo kırmızılı

agar yöntemi ile % 58'inin slime ürettiği saptanmıştır. Bu dört yöntemle elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel bir anlamda farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Tüm yöntemlerin özgüllüğü % 100 iken; duyarlılıkları sırasıyla Christensen yönteminde % 96.8, standart tüp yönteminde % 95, Kongo kırmızılı agar yönteminde % 92 bulunmuştur.

Spektrometrik mikrodilüsyon yönteminde, sonuçları değerlendirme açısından objektif olarak değerlendirmek mümkündür. Tüp yöntemleri ise tamamen testi okuyanın yorumuna bağlı kalitatif testlerdir. Bu fark, zayıf pozitifliklerin değerlendirilmesinde önem kazandırmaktadır. Ayrıca hem mikroplyt yöntemi hem de diğer tüp yöntemlerinde 48 saat gibi uzun bir sürede sonuç alınabilmektedir. Diğer testlerle kıyaslandığında Kongo kırmızılı agar yönteminin daha pratik, ekonomik ve daha kısa zamanda sonuç alınabilen yöntem olduğunu bildirilmektedir [Pfaller et al., 1988; Aydın ve ark., 1997; Gürdoğan, 1999].

Kongo kırmızılı agar yöntemi ilk kez 1989'da Freeman ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir. Woznicova ve arkadaşları bu yöntemin duyarlılığının % 85, özgüllüğünü ise % 99 olarak saptamışlardır. Nourizadeh ve arkadaşları da Kongo kırmızılı agar yöntemini pratik, diğer yöntemlerle uyumlu ve güvenilir bir yöntem olarak bildirmişlerdir [Aydın ve ark., 1997].

Bilgehan ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan çalışmalarında, 54'ü patojen, 29'u enfeksiyon etkeni olmayan toplam 83 KNS suşunda aderans ve slime yapımını araştırmışlardır. Patojen suşların % 37'sinin aderans olduğu, % 29.6'sının slime yaptığı bulunmuştur. Kontrol suşların % 10.3'ü ise slime faktör pozitif bulunmuştur. Slime faktörünü tüp yöntemine göre araştırılmıştır. KNS'lerin aderansını saptamak için Christensen ve arkadaşları tarafından tanımlanan spektrofotometrik metod kullanılmıştır. Kontrol suşlarının %10.3'ü aderans; %10.3'ü ise slime pozitif bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan KNS'lerin kontrol suşlarına göre daha aderans oldukları ve daha fazla slime yaptıkları saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aderans ve slime pozitifliğinin birlikte olduğu suşların daha patojen oldukları ($P=0.038$) ve daha aderans suşların, aderans olmayan suşlara göre daha fazla slime yaptığı bulunmuştur ($P<0.01$).

Pfaller ve arkadaşları (1988), 135 KNS'un makro-tüp yöntemiyle 70'i pozitif ve 65'i slime negatif bulmuşlardır. 135 KNS'un 96'sı (% 71.1) *S. epidermidis* olarak idenfiye edilmiştir. *S. epidermidis*'in 52 farklı izolatının, mikrolept yöntemiyle slime üretimini test etmişlerdir. Optik dansiteleri (O. D.)<0.415 ise slime negatif, O. D.>0.415 ise olanlar slime pozitif olarak değerlendirilmiştir. İki slime pozitif suş test ederek, aynı gün dahilinde ve iki gün arasında slime üretimi katsayısı % 20'den küçük bulunmuştur. 52 *S. epidermidis* suşunun 31'i slime pozitif bulunmuştur.

Nayak ve arkadaşları (2000), slime üretimi açısından, bakteriyel keratitisi ve kontrol grubu için sağlıklı gözlerden izole edilen 50 izolatı incelemişlerdiler. Sime üretimini ölçmek için, Christensen ve arkadaşları tarafından belirtilen spektrometrik yöntemden yararlanılmıştır. Keratitisi hastaların göz sürüntüsünden izole edilen 126 KNS'un 88'si (% 69,8) ve kontrol grubundaki 50 izolatın 11'i (% 22) slime pozitif çıkmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). 83 korneal ülser izolatlarının slime pozitif ve slime negatif izolatları arasında dirençli antibiyotik sayısı (≥ 3) olacak şekilde karşılaştırma yapıldığında slime pozitif izolatların 75'i (%82.9) 3 veya daha fazla sayıda antibiyotiğe dirençli oldukları görülmüştür. Slime negatif korneal izolatlarında ise 7'sinin (% 18,4) dirençli antibiyotik sayısı (≥ 3) olmuştur. Bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.001$).

Boursard ve arkadaşlarının (1993) çalışmasında, slime negatif suşların test edilen bütün antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları saptanırken, slime pozitif suşların en az 7 antibiyotiğe dirençli oldukları görülmüştür [Gürdoğan ve ark., 1999]. Elçi ve arkadaşlarının (1996) çalışmasında, slime pozitif suşların, slime negatif suşlara göre daha dirençli oldukları görülmüştür [Gürdoğan ve ark., 1999].

Remington-Perdreau ve arkadaşlarının (1998] yaptığı bir deneysel endokardit çalışmalarında, kateter mevcudiyeti ve yokluğu arasında vejetasyon titresi ve enfeksiyon oranı açısından yapılan karşılaştırmada anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.02$).

Williams ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada, *S. aureus*'un silikon kateter yüzeylere aderant yaptıkları zaman, bakterinin tetrasiklin, vankomisin ve benzilpenisilin duyarlılığının 2-10 kat azaldığı görülmüştür.

Souli ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları çalışmada, slime tabakasının varlığında perfloksasin, teikoplanin ve vankomisin etkilerinde göze çarpacak şekilde sırasıyla % 30, % 52 ve % 63 oranında azalma görülmüştür. Diğer klindamisin, kloksalin, amoksilin-klavulanik asit, imipenem, siprofloksasin sefpirom, roksitromisin ve fusidik asit etkilerinin üzerinde ise az azalma görülmüştür (<% 15).

Günaydın ve arkadaşlarının (1996) çalışmasında slime oluşturan kökenlerde, slime oluşturmeyen kökenlere göre kinolon direncinin yüksek olduğunu tesbit edilmiştir. Ayrıca çalışmalarında slime pozitif kökenlerin, slime oluşturmeyen kökenlere göre daha dirençli olduklarını saptanmıştır ($p<0.02$). Camiade ve arkadaşlarının allogreftlerle ilgili yaptıkları çalışmada (2001), slime üreten *S. epidermidis*'in en duyarlı olduğu antibiyotik rifampisin olmuştur.

Siprofloksasin, sefalosporinlere ve rifampisine göre biyofilm oluşumuna karşı daha az etkili olduğu görülmüştür [Amorena et al., 1999].

Ludwicka ve arkadaşlarının çalışmasında (1984), *S. epidermidis*'den izole ettikleri galaktozca zengin polisakkarit tabakasının, polietilene aderansını inhibe ettiği görülmüştür [Kotilainen et al., December 1990].

Pérez-Giraldo ve arkadaşlarını çalışmasında (1997), NAC varlığında stafilokok suşlarında slime üretiminde azalma görülmüştür. Salisilik asit ve bazı steroidal olmayan ağrı kesici ilaçlar, slime üretimini azalttığından dolayı *S. epidermidis*'in medikal polimerlere aderansını inhibe etmiştir. Bazı ilaçların subinhibitör konsantrasyonları bile, slime oluşumunu inhibe etmektedir. EDTA gibi bazı mukolitik ajanlar olan sodyum sitrat, penisilamin, NAC (N-acetylcysteine) *Pseudomonas aeruginosa*'da slime tabakasını dağıttığı görülmüştür [Pérez-Giraldo et al., 1997].

Gerke ve arkadaşlarının (1998) çalışmasında, tunikamisin ve basitrasinin, in vitro olarak PIA biyosentezi ara ürünlerinde, in vivo olarak bütün PIA biyosentezinde etkisi görülmemiştir.

Henke ve arkadaşlarının (1997) greftlerle ilgili yaptığı çalışmada, slime pozitif *S. epidermidis* suşlarının sitotoksik-fagositozik cavabı daha az indüklediği görülmüştür. Heinzelmann ve arkadaşlarının (1997) çalışmasında, slime pozitif stafilocların fagositozu sırasında daha fazla süperoksit üretimi (daha fazla enerji tüketimi) görülmüştür. Slime pozitif suşların slime negatif suşlara göre hidrofobisitesi daha düşük çıkmıştır. Hidrofobisite bakterinin genellikle polimorf nükleer nötrofiller tarafından fagositozunu ve virulansının artmasıyla korelasyon halindedir.

Kulaksız ve arkadaşları (1998), çalışmalarında çeşitli greft ve intravenöz kateterlerinden izole edilen 73 KNS izolatuın slime üretimi Kongo kırmızılı agar yöntemiyle % 52, makro-tüp yöntemiyle % 46,5 ve mikropleyt yöntemiyle % 52 oranında, 8 *S. epidermidis* kökeninde ise Kongo kırmızılı agar ile % 64,5; makro-tüp yöntemiyle % 56,2 ve mikropleyt yöntemiyle % 60,4 oranında saptamışlardır. Üç yöntem arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmamıştır. Çalışmalarında, antibiyotiklerin disk difüzyon yöntemiyle slime oluşumuna etkileri araştırdıklarında, slime faktör oluşturan 31 kökenin % 51,6'sında, slime faktör oluşturmayan 17 kökenin % 47'sinde metisilin direnci saptamışlardır. Slime oluşturan ve oluşturmayan kökenlerin antibiyotiklere dirençlilik olarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda, laboratuvarımıza gelen çeşitli numunelerden izole edilen 90 KNS suşunun, Kongo kırmızılı agar yöntemine göre; 76'sının (% 84,4), makro-tüp yöntemine göre; 68'inin (% 75,6) ve mikropleyt yöntemine göre 68'i (% 75,6) slime pozitif bulunmuştur. Üç yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Yine bu üç yönteme göre sırasıyla; Kongo kırmızılı agar yöntemine göre, 14'ü (% 15,6), makro-tüp yöntemine göre 22'si (%24,4) ve mikropleyt yöntemine göre 22'si (% 24,4) slime negatif bulunmuştur. Slime pozitif kökenlerde kloramfenikol, oksasilin ve levofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç oranı bakımından, slime negatif suşlara göre yüksek bulunmuştur. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Teikoplanin ve vankomisine dirençli suş bulunmamıştır. Diğer antibiyotiklere karşı dirençlilik oranında slime pozitif suşlarda, slime negatif suşlara göre yüksek olsa bile bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

KAYNAKLAR

- 1-AGUILAR B., AMORENA B., ITURRALDE M., Effect of Slime on Adherence of *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine and Ovine Mastitis. Veterinary. Microbiology 78:183-191, 2001.

- 2-ALLIGNET J., AUBERT S., DYKE K.G.H., and EL SOLH N., *Staphylococcus caprae* Strain Carry Determinant Known To Be Involved in Pathogenicity: a Gene Encoding an Autolysin-Binding Fibronectin and the *ica* Operon Involved in Biofilm Formation. Infection and Immunity 69:712-718, 2001.

- 3-ALLIGNET J., GALDBART J.O., MORVAN A., DYKE K.G.H., VAUDAUX P., AUBERT S., Desplaces N. and El Solh N., Tracking Adhesion Factors in *Staphylococcus caprae* Strains Responsible For Human Bone Infections Following Implantation of Orthopaedic Material. Microbiology 145:2033-2042, 1999.

- 4-AMMENDOLIA M.G., DI ROSA R., MONTANARO L., ARCÌOLA C.R. and BALDASSARRI L., Slime Poduction and Expression of the Slime-Associated Antigen by Staphylococcal Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology 37:3235-3238, 1999.

- 5-AMONERA B., GRACIA E., MONZÓN M., LEIVA J., OTEZIA C., PÉREZ. M., ALABART J-L HERNÁNDEZ-YARGO J., Antibiotic Susceptibility Assay for *Staphylococcus aureus* in Biofilms Developed In-vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:43-45, 1999.

- 6-ARCÌOLA C.R., BALDASSARRI L. and MONTANARO L. Presence of *ica A* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strain From Catheter-Associated Infections. Journal of Clinical Microbiogy 39:2151-2156, 2001.

- 7-ATMACA S., ELCİ S., AKPOLAT N. O., Differential Production of Slime by *Staphylococcus saprophyticus* under Aerobic and Anaerobic Condictions. J. Med. Microbiol. 49:1051-1052, 2000.

8-AYDINLI A., DURMAZ G., AKGÜN Y., Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Slime Yapımının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle Araştırılması. Flora 2 (1) 41:44, 1997.

9-AYGEN B., SEHMEN E., SÜMERKAN B. ve DOĞANAY M., Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Slime Yapımı ve Aderans. Türk Mikrobiyol. Cem Dergisi 26:67-70, 1996.

10-BALDASSARRİ L., DONELLİ G., GELOSİA A., SİMPSON A.W. and CHRISTENSEN G.D., Expression of Slime Interferes wiht In Vitro Detection of Host Protein Receptors *Staphylococcus epidermidis*. Infection and Immunity 65:1522-1526, 1997.

11-BALDASSARRİ L., BERTUCCİNİ L., AMMENDOLİA M.G., ARCİOLA C.R., MONTANARO L., Effect of Iron Limitation on Slime Production by *Staphylococcus aureus* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20:343-345, 2001.

12-BALDASSARRİ L., SİMPSON W.A., DONELLİ G., Christensen Variable Fixation of Staphylococcal Slime by Different Histochemical Fixatives. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12:8686-868, 1993.

13-BESE M., Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyerleri, A.Ü.Veteriner Fak. Yayın No: 298 syf. 125, Ankara, 1974.

14-BİLGEHAN H., Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 10. Baskı, Barış Yayınları, Şafak Matbaacılık, İzmir, syf: 239-271, 1994.

15-BİLGEHAN H., Klinik Mikrobiyoloji Tanı, 2. Baskı, Barış Yayınları, Şafak Matbaacılık, İzmir, syf: 493-504, 1995.

16-CAMİADE C., GOLDSCHMİDT P., KOSKAS F., RİCCO J-B., JARRAYA M., GEROTA J., and KİEFFER E., Optimization of the Resistance of Arterial Allografts to Infection: Comparative Study with Synthetic Prostheses. Annals of Vascular Surgery 15:186-196, 2001.

17-CRAMTON S.E., GERKE C., SCHNELL N.F., NICHOLS AND GÖTZ F., The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus is Present in *Staphylococcus aureus* and is Required for Biofilm Formation. *Infection and Immunity* 67:5427-5433, 1999.

18-DEIGHTON M. and BORLAND R., Regulation of Slime Production in *Staphylococcus epidermidis* by Iron Limitation. *Infection and Immunity* 61:4473-4479, 1993.

19-DİLER M., Hastane ve Toplum Kaynaklı Stafiloclarda Suşlarında Metisillin Direnci ile Vankomisin, Teikoplanin ve Bazı Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Şefliği Uzmanlık Tezi, İstanbul, 1997.

20-DOMARACKİ B.E., EVANS A., PRESTON K.E., FRAÏMOW H., VENEZIA R.A., Increased Oxacillin Activity Associated with Glycopeptides in Coagulase-Negative Staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:30-33, 1998.

21-DÜNDAR V. ve DÜNDAR D. Stafilokok Enfeksiyonları. Topçu A. Söyletir G., Doğanay M. (editörler), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*'nde, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, syf:1507-1516, 2002.

22-GEARY C. and STEVENS M., Detection of Phosphatase Production by *Staphylococcus* Species: A New Medhod. *Medical Laboratory Science* 46:291-294, 1989

23-GERKE C., KRAFT A., SÜBMUTH R., SCHWEITZER O. and GÖTZ F., Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 18586-18593, 1998

24-GÜRDOĞAN K., DİZBAY M., FİRDEVİS A., Kan Kültürlerde İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slime Üretiminin Dört Farklı Yöntemle

Araştırılması ve Slime Yapımı ile Antimikrobiyal Duyarlılık İlişkisi. Flora 4:195-199, 1999

25-HEINZELMANN M., HERZIG D.O., SWAIN B., MERCER-JONES M.A., BERGAMINI T. M. and POLK H.C., Phagocytosis and Oxidative-Burst Response of Planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62 and Non-Slime-Producing Variant in Human Neutrophils. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology: 705-710, 1997

26-HENKE P.K., BERGAMINI T.M., GARRISON J.R., BIRITIAN K.R., PEYTON J.C., LAM T.M., *Staphylococcus epidermidis* Graft Infection is Associated with Locally Suppressed Major Histocompatibility Complex Class II and Elevated MAC-1 Expression. Arch.Surg. 132:894-902, 1997

27-ISHAK M.A., GROSCOL D.H.M., MANDELLI G.L., WENZEL R.P., Association of Slime with Coagulase Negative Staphylococci Causing Nosocomial Septicemia Journal of Clinical Microbiology 22:1025-1029, 1985

28-ISENBERG H. by Editor, Microbiology Handbook, American Society for Microbiology, Washington D: C. page:1.20.3.-1.20.12, 1992

29-JONE S.J.W., SCOTT RJD., MORGAN J., PETHER J.V.S., A Study of coagulase Negative Staphylococci with Reference To "Slime" Adherence, Antibiotic Resistance Patterns and Clinical Significance. J. Hosp. Infect; 22:217-227, 1992

30-KLOOS W. E., BANNERMAN L.T., Staphylococcus and Micrococcus. Murray P.R., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C. (Eds) In Manual Clinical Microbiology, 6th Edition .Washington, page 282-298, 1995

31-KOLANITSIOU F., SYROKOU A., KRAMANOS N.K., ANASTASSIOU E.D., DIMITRACOPOULOS G., Immunoreactivity of 80-kDa Peptidoglycan and Teichoic Acid-Like Substance of Slime Producing *S. epidermidis* and Specificity of Their

Antibodies Studied by an Enzyme Immunoassay. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 24:429-436, 2001

32-KONEMAN E.W., ALLEN S.D., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C., WINN W.C., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifty Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, page; 547-548 and 787, 1997.

33-KOTILAINEN P., MÄKI J., OKSMAN P., VILJANEN M. K., NIKOSKELAINEN J., HUOVINEN P., Immunochemical Analysis of the Extracellular Slime Substance of *Staphylococcus epidermidis*. Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:262-270, April 1990.

34-KOTILAINEN P., OKSMAN P., VILJANEN M.K., NIKOSKELAINEN J., HUOVINEN P., Analysis of the Relationship between Bacterial Adherence and Extracellular Production of Mannose, Galactose, Glucose and Ribose in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus hominis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:873-879, December 1990.

35-KÖNIG D.P., SCHIERHOLZ J.M., HILGERS R.D., BERTRAM C., PERDREAU-REMINGTON F., RÜTT J., In Vitro Adherence and Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP62A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on Four Different Bone Cements. Langenbeck's Arch. Surg. 386:328-332, 2001

36-KULAKSIZ B., Greftlerde ve İntravenöz Kateterlerinde *S. epidermidis* ve Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slime Faktörünün Araştırılması. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 1998

37-LINDSAY J.A., RILEY T.V., MEE B.J., Production of Sidephore by Coagulase–Negative Staphylococci and Its Relation to Virulence. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.13:1063-1066, 1994.

38-MULDER J.G., Comparison of Disk Diffusion; the E test and Detection of *mec A* for Determination of Methicillin Resistance in Coagulase Negative Staphylococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.15:567-573, 1996.

39-NAYAK N., SATPATHY G., Slime Production as a Virulence Factor in *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Bacterial Keratitis. Indian. J.Med. Res. 111:6-9, 2000.

40-NOYAN A., Fizyoloji Kitabı; 8. Basım, Meteksan Anonim Şirketi, Ankara, syf. 697-705, 1993

41-PÉREZ-GIRALDO C., BENITO-RODRÍGUEZ-BENITO A., MORÁN F.J., HURTADO C., BLANCO M.T. and GÓMEZ-GARCÍA Influence of N-acetylcystein on the Formation of Biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 39:643-646, 1997

42-PERDREAU-REMINGTON F., SANDE M.A., GEORG P. and CHAMBERS H.F., The Abilities of a *Staphylococcus epidermidis* Wild-Type Strain and Slime-Negative Mutant to Induce Endocarditis in Rabbits are Comparable. Infection and Immunity 66:2778-2781, 1998.

43-PFALLER M., DAVENPORT D., BALE M., BARRETT M., KOONTZ F., MASSANARI R.M., Development of the Quantitative Micro-Test for Slime Production by Coagulase-Negative Staphylococci. Eur. J.Clin. Microbiol Infect. Dis.,7:30-33, 1988.

44-SOULI M. and GIAMARELLOU H. Effect of Slime Produced by Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci on Activities of Various Antimicrobial Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42:939-941, 1998

45-SÖNMEZ E., BAYINDIR Y., TEKEREKOĞLU M. S., AĞEL E., BÜYÜKBERBER N., DURMAZ B., Yoğum Bakım Hastalarından İzole Edilen Stafilokoklara Trovafloksasin ve Bazı Antibiyotiklerin İn Vitro Etkisi. Yeni Tıp Dergisi, 17 (3) :134-137, 2000.

46-TOLDOS C.M., YAGÜE G., ORTÍZ G., SEGOVIA M., Assessment of Multiple Coagulase–Negative Staphylococci Isolated in Blood Cultures Using Pulsed–Field Gel Electrophoresis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 16:581-586, 1997

47-UYSAL Z., ÇULHA V. ve CİN Ş., Demir Eksikliği Tanısında Serum Transferrin Reseptörü. Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Mecbuası 51:129-136, 1998

48-UYSAL Z., Demir Metabolizmasında, Demir Eksikliğinde ve Demir Fazlalığında Yenilikler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecbuası 52:157-164, 1999.

49-VAN DER MEI H.C., VAN DE BELT–GRITTER B., REID G., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA H., and BUSSCHER H. J. Adhesion of Coagulase–Negative Staphylococci Grouped According to Physico-Chemical Surface Properties Microbiology 143:3861-3870, 1997

50-WILCOX M.H., WILLIAMS P., SMITH D.G.E., MODUN B., FINCH R.G. and DENYER S.P., Variation in the Expression of Cell Envelope Proteins of Coagulase Negative Staphylococci Cultured Iron–Restricted Conditions in Human Peritoneal Dialysate. Journal of General Microbiology 137:2561-2570, 1991

51-WILLIAMS I., VENABLES W.A., LLOYD D., PAUL F. and CRITCHLEY I., The Effects of Adherence to Silicone Surfaces on Antibiotic Susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Microbiology 143:2407-2413, 1997

52-YAZGI H., AYYILDIZ A., AKTAŞ A.E., AKTAŞ O., YİĞİT N. ve GÖRGÜN S., Bölgemizde Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Staphylococcus* Suşlarının “Slime Faktör” ve “Protein A” yönünden İncelenmesi. Türk Mikrobiyol. Cem. Der. 27:10-13, 1997

ÖZGEÇMİŞ

Nuray YILDIRIM 6 Şubat 1971 yılında Erzincan-Kemah'ta doğdu. İlkokulu Erzincan Mehmetcik İlkokulu'nda, ortaokulu Erzincan Merkez Ortaokulu'nda okudu. Lise 1'i Erzincan Lisesi'de okudu. Lise 2 ve 3'ü İzmir Bornova Suphi Koyuncuoğlu Lisesi'nde devam etti. Daha sonra Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimi aldı. 1996 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Bir yıl İngilizce hazırlık sınıfına devam etti. 6 Ocak 1998 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi İstanbul, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Biyolog unvanıyla işe başladı. İki yıl Biyokimya laboratuvarında çalıştıktan sonra, aynı hastanenin Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında iki yıl çalıştı. Son bir yıldır Biyokimya laboratuvarında çalışmaktadır. Orta derecede İngilizce bilmektedir.