



EDİTÖRE MEKTUP/LETTER TO THE EDITOR

Staphylococcus aureus küçük koloni varyantı: kolaylıkla atlanan bir tanı

Small colony variant of staphylococcus aureus: a diagnosis easy to miss

Muharrem Çiçek¹, Özlem Tuncer¹, Banu Sancak¹, Burçin Şener¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Turkey

Cukurova Medical Journal 2016;41(Suppl 1):135-138.

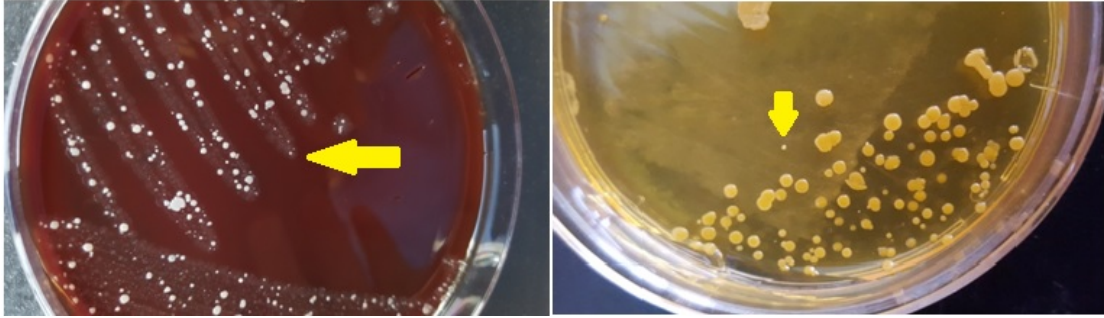
Sayın Editör,

Normal fenotip *Staphylococcus aureus* izolatlarına göre yavaş üreyen, pigmentsiz, hemoliz yapmayan, çok küçük kolonilerle karakterize *S. aureus* küçük koloni varyantlarının (KKV), atipik fenotipik ve metabolik özellikleri nedeniyle laboratuvar tanısı güçlüğüle konabilmektedir¹. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında doğru tanımlanması gereken bu suşlar, atipik koloni morfolojileri nedeniyle gözden kaçırılmakta veya sıklıkla kontaminasyon olarak değerlendirilerek hatalı sonuçlar verilebilmektedir². Antibiyotik duyarlılıklarının saptanması açısından da farklılık gösteren bu izolatlar Gram boyama sonuçlarının değişkenlik göstermesi nedeniyle de kolay tanımlanamamaktadır. Bu olgu, kistik fibrosizli (KF) bir hastanın balgamından izole edilen bir KKV suşu üzerinden, laboratuvarında saptanması ve tanımlanması sorunlu olan bu mikroorganizmaya dikkat çekilmesi amacıyla sunulmuştur.

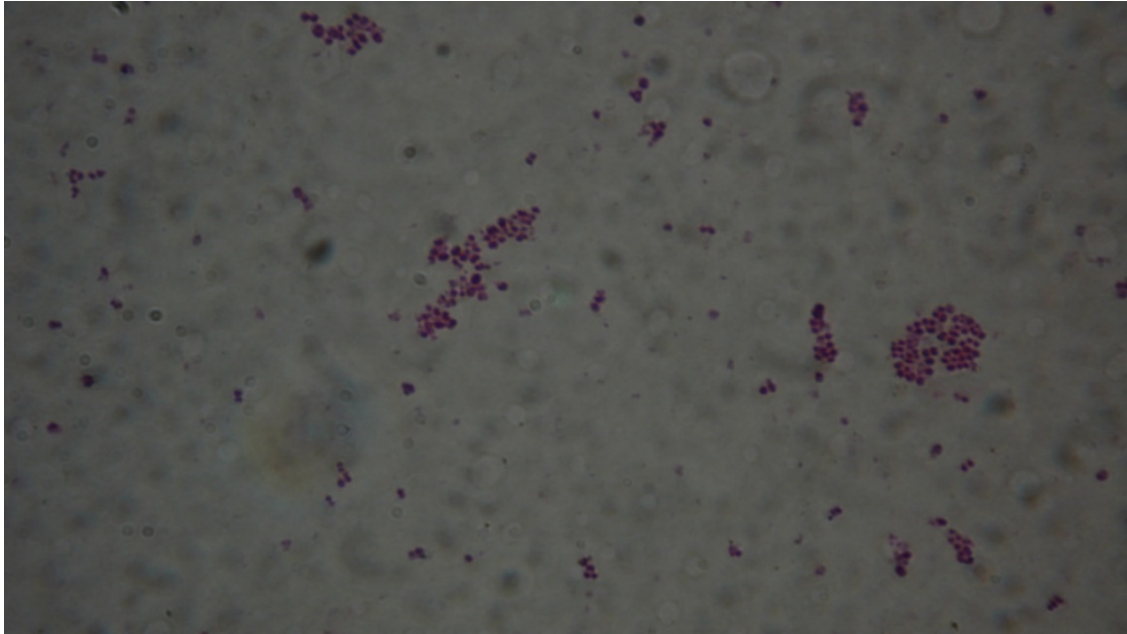
Şubat 2016'da KF'li 23 yaşında erkek hasta, nefes darlığı şikayetiyle hastanemizin yetişkin acil servisine başvurmuştur. Kronik *S.aureus* kolonizasyonu olduğu bilinen hasta pnömoni ön tanısı ile Enfeksiyon Hastalıkları Servisine yatırılmıştır. Laboratuvarımıza gönderilen balgam örneği %5 koyun kanlı agar, basitrasinli çikolata agar, MacConkey agar, *Burkholderia cepacia* selektif agar, mannitol tuzlu agar (MTA) ve Sabouraud dekstroza agar ekilmiştir. Klinik örnekten hazırlanan direkt yaymanın Gram boyamasında her alanda az epitel,

orta düzeyde polimorfonükleer lökosit, hücre içi-dışı gram negatif diplokok ve hücre dışı gram pozitif koklar görülmüştür. Kültürlerin 35±2 °C'de 24 saat inkübasyonunun ardından MTA'da normal morfolojideki *S.aureus* kolonileri ile beraber daha küçük yapıda koloniler görülmüştür (Resim 1). Koyun kanlı agarda ise normal büyüklükte kremsi yuvarlak *S.aureus* koloni morfolotipi dışında bu tür küçük koloniler görülmemiştir. İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması sonucunda kanlı agarda normal kolonilerin çevresinde pigmentsiz, hemoliz yapmayan ve kontaminasyonu düşündüren küçük koloniler izlenmiştir (Resim 1). Bu küçük kolonilerin Gram boyalı mikroskopisinde pleomorfik gram pozitif koklar görülmüştür (Resim 2).

Her iki izolatın katalaz testi pozitif saptanmıştır. Her iki izolat da VITEK MS (bioMerieux, Fransa) ile *S.aureus* olarak tanımlanmıştır. KKV açısından şüpheli olarak değerlendirilen bu küçük koloniler ek değerlendirmeye alınmıştır. KKV olarak düşünülen koloniler, Columbia koyun kanlı agar (aerop atmosfer) ve Schaedler agara (%5 CO₂ atmosfer) eş zamanlı olarak ekilmiş ve her iki besiyeri 35°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda karşılaştırmalı incelenmiştir. Columbia koyun kanlı agarda pigmentsiz ve hemoliz yapmayan çok küçük koloniler görülürken, Schaedler agarda beta hemoliz ve pigment oluşturan normal büyüklükte koloniler görülmesi KKV açısından anlamlı olarak değerlendirilmiştir.



Resim 1. Mannitol tuzlu agar ve %5 koyun kanlı agar besiyerlerinde *Staphylococcus aureus* küçük koloni varyantı (sarı ok) ve normal morfolojideki *S. aureus* kolonileri



Resim 2. Kültürdeki küçük kolonilerin Gram boyalı mikroskopisinde pleomorfik gram pozitif kokiller.

KKV için belirlenmiş standart bir antibiyotik duyarlılık yöntemi bulunmadığından, her iki izolat Mueller-Hinton agarda disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberinde *S.aureus* izolatları için belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir³. Her iki izolat gentamisin, amikasin, sefoksitin duyarlı; siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin ve klindamisin dirençli iken, normal fenotip gösteren izolattan farklı olarak KKV izolatının aynı zamanda trimetoprim-sulfametoksazol (SXT)'e dirençli olduğu

saptanmıştır. Geriye dönük kültür sonuçları incelendiğinde hastada ilk kez bu başvurusunda *S.aureus* KKV üremesi belirlendiği görülmüştür. Hasta meropenem ve linezolid tedavisi sonucunda hastaneye yatışının 19. gününde taburcu olmuştur.

Literatürde, KKV ile kronik ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar arasındaki ilişkiyi gösteren ve ispatlayan birçok çalışma bulunmaktadır⁴. Hem klinisyenler hem de klinik mikrobiyologlar kronik endokardit, osteomyelit, protez ve yumuşak doku

enfeksiyonları ve KF hastalarında gelişen solunum yolu enfeksiyonlarında, özellikle uzun süreli antibiyotik kullanım öyküsü varsa ve klinik örneklerinden kronik olarak S.aureus izolasyonu mevcutsa, bu hastalarda etken olarak KKV ön planda akla gelmelidir^{1,2,5}. Hikayesinde önceden herhangi bir KKV üremesi olmayan olgunun KF'ye bağlı kronik akciğer enfeksiyonları nedeniyle uzun yıllar antibiyotik tedavisi altında yaşamını sürdürmesi ve S.aureus ile kolonize olması, olası etken olarak KKV'yi düşündürmüştür. Bu nedenle klinisyenlerin klinik mikrobiyologlara sağlayacağı hastaya ait klinik bilgiler, bu bakterilerin izolasyon şansını arttıracaktır.

KKV izolatları, normal fenotip S. aureus suşlarına göre yavaş üremeleri, pigment ve hemoliz oluşturmamaları, çok küçük kolonilerle karakterize atipik morfoloji göstermeleri nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutinde kullanılan kültür ve tanımlama testleriyle yanlış tanımlanabilirler veya tanımlanamayabilirler^{1,4}. KKV, düşük koagülaz aktivitesi gösterebildiğinden tüp koagülaz testi 18 saatten daha uzun inkübasyon süresinin ardından pozitifleşebilmekte; mannitol fermentasyonu negatif olabildiğinden MTA'da atipik koloni özelliği gösterebilmektedir^{4,6,7}. KKV suşları yavaş üredikleri ve normal fenotip S. aureus suşları ile birarada buldukları durumlarda normal fenotipin kültür plaklarında baskın olması nedeniyle gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle KKV morfoloğinin gözle görülebilmesi için inkübasyon süresinin 72 saate kadar uzatılması önerilmektedir⁴. Çalışmamızdaki KKV izolatu kanlı agarda ilk 24 saat sonunda tespit edilememişken, inkübasyon süresinin 48 saate uzatılması sonucunda saptanabilmiştir. KF örneklerinin rutin mikrobiyolojik değerlendirmesi için kullanılan MTA besiyerinde ise KKV kolonileri ilk 24 saat içinde tespit edilmiştir. Bu bulgu diğer besiyerleri ile kıyaslandığında KKV izolasyonunda en başarılı besiyerinin MTA olduğunu gösteren Yağcı ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmayla uyum göstermektedir¹. Dolayısıyla KKV şüphesi olan durumlarda uygun besiyeri kullanıldığında ve inkübasyon süresi uzatıldığında KKV izolasyon olasılığı arttırılabilir.

Bakteri hücre duvarı biyosentezi için yüksek miktarda ATP'ye ve bunu sağlayacak olan elektron transport zincirine ihtiyaç vardır. Elektron transport zincirinde görevli elemanların sentezi için kofaktör olarak özellikle menadion ve hemin gerekmektedir. Ortamda bu besin maddelerinin eksikliği durumunda hücre duvarı biyosentezinde defektler olmakta ve

yavaş üremeye bağlı olarak KKV fenotipi gelişebilmektedir⁸. KKV tanısında suşların menadion, hemin ve timidine gereksinimi bu maddelerin ortama eklenip normal fenotipe dönüşümün izlendiği "Okzotrofizm testi" ile araştırılmaktadır⁵. Çalışmamızda KKV şüpheli izolat 24 saat inkübasyon sonunda hemin ve menadiondan fakir Columbia kanlı agarda normal atmosferde küçük koloni oluştururken, hemin ve menadion içeren Schaedler agarda %5 CO₂ varlığında normal fenotipe dönüşmüş ve bu şekilde dolaylı yoldan okzotrofizm gösterilerek izolatu S.aureus KKV olduğu belirlenmiştir. Timidin bağımlı S.aureus KKV'nın özellikle KF hastalarında uzun süreli SXT tedavisi sonrası ortaya çıktığı ve bunların Gram boyalı yaymalarda normal gram pozitif koklardan daha büyük, farklı boyutlarda pleomorfik koklar şeklinde görüldüğü bildirilmiştir^{9,10}. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda izole edilen S.aureus KKV suşunun SXT dirençli olması ve mikroskopisinde pleomorfik gram pozitif kokların görülmesi suşun timidin bağımlı KKV izolatu olabileceğini düşündürmektedir. Söz konusu bu üç maddeye okzotrofizmin belirlenemediği KKV suşlarının da var olduğu unutulmamalıdır⁴.

KKV suşları, eş zamanlı olarak beraber üredikleri normal fenotip S. aureus suşlarına göre antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarında da farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle kronik ve tekrarlayıcı enfeksiyonlarda KKV suşlarının izolasyonu ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi önem kazanmaktadır. KKV izolatları için antibiyotik duyarlılık testleriyle ilgili standartlar henüz belirlenmemiştir. Bu suşların sıvı besiyerlerinde normal fenotip S. aureus suşlarıyla karışık üremesi ve birbirinden ayırımının zor olması nedeniyle ölçüm gerektiren difüzyon testlerinde KKV suşlarındaki yavaş üreme hızına bağlı olarak hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bunun yanısıra in-vitro ortamda KKV suşlarının normal koloni morfoloğine dönüşümü gerçekleşebilmektedir. Dolayısıyla bu faktörlere bağlı olarak in-vitro antibiyotik duyarlılık sonuçlarının yorumlanması sorun oluşturmaktadır^{4,11}.

Özetle, çalışmamızdaki izolatu atipik mikroskopisi, kanlı agarda yavaş üremesi, MTA'da küçük kolonilerin görülmesi, SXT dirençli olması ve KF'li bir hastadan izole edilmesi KKV lehine destekleyici bulgulardır ve bu nedenlerle izolat S.aureus KKV olarak raporlanmıştır. Bir günlük inkübasyon sonucunda MTA'da küçük kolonilerin kanlı agara

göre erken saptanması KKV tanısının atlanmasını engellemiştir. Farklı antimikrobiyal duyarlılık sonucu gösteren KKV izolatlarının doğru şekilde raporlanması klinisyen ve hasta açısından doğru tedavi rejiminin belirlenmesi için de yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U, Sener B. Prevalence and genetic diversity of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:77-84.
2. Yagci S, Kurkcuoglu S, Ozturk BD, Erdinc FS, Tulek NE. Small colony variant of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from an osteomyelitis case. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;3:89-92.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement M100-S25. CLSI, Wayne, PA, USA. 2015.
4. Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Rev Microbiol*. 2006;4:295-305.
5. von Eiff C. Staphylococcus aureus small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:507-10.
6. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*. 2006;37:26-33.
7. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis*. 1998;27:419-22.
8. Melter O, Radojevic B. Small colony variants of Staphylococcus aureus – review. *Folia Microbiol*. 2010;55:548-58.
9. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E et al. Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1998;177:1023-9.
10. Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of Staphylococcus aureus exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol*. 2003;41:410-3.
11. Precit MR, Wolter DJ, Griffith A, Emerson J, Burns JL, Hoffman LR. Optimized in vitro antibiotic susceptibility testing method for small-colony variant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:1725-35.