

MASTITİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *S. aureus* ve *S. intermedius* SUŞLARININ SLİME ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Arslan¹@

Uçkun Sait Uçan²

Examination of Slime Production of *S. aureus* and *S. intermedius* Strains Isolated From Bovine Mastitis

Özet: Bu çalışmada mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) suşlarının slime üretme özellikleri Christensen Tüp Metodu (CTM) ve Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla 26 *S. aureus* ve 24 *S. intermedius* suşu incelendi. *S. intermedius* suşlarının % 45.8'i CTM ile slime üretimi pozitifken, % 91.6'nın KKA metodu ile slime ürettiği belirlendi. Suşların yalnızca % 8.3'ü her iki metod ile negatif sonuç verdi. *S. aureus* suşlarının % 46'sı CTM ile, % 88'i ise KKA ile pozitif sonuç verdi. KKA yönteminin uygulanabilirliği ve değerlendirilmesi kolay, diğer teste göre daha duyarlı bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, *S. aureus*, *S. intermedius*, slime üretimi

Summary: The aim of this study was to investigate slime productions of *S. aureus* and *S. intermedius* strains isolated from bovine mastitic milk samples by Christensen's Qualitative Tube (CQT) and Congo Red Agar (CRA) methods. For this purpose, a number of 26 *S. aureus* and 24 *S. intermedius* strains were examined. Of the *S. intermedius* strains, 45.8 % were detected to produce slime by Christensen's Qualitative Tube method while 91.6 % found positive by CRA method. Only 8.3 % of the strains tested were found to be negative by both methods. Of the *S. aureus* strains, 46 % and 88 % were produced slime by the methods CQT and CRA, respectively. CRA method is considered to be more sensitive and easier to apply and evaluate than the other.

Key Words: Mastitis, *S. aureus*, *S. intermedius*, slime production

Giriş

S. aureus, mastitis etkeni olarak sıklıkla izole edilen bir bakteridir. İnsan ve evcil hayvanlarda *S. intermedius* enfeksiyonlarına da giderek daha fazla rastlanmaktadır (Christensen ve ark., 1982; Baldassarri ve ark., 2001; Keskin ve ark., 2003).

Bakterinin konakçı hücreye bağlanması, enfeksiyonların patojenitesinde önemli bir aşamadır (Opdebeeck ve ark., 1988; Amorena ve ark., 1990; Iturralde ve ark., 1993). Konakçı ile mikroorganizmaların bu ilişkisinde virulansta önemli bir paya sahip olan ve ekzopolisakkarid içeren dış tabakanın kuvvetlice bağlanma özelliğinin önemli bir rolü vardır. Slime bir bakterinin uygun bir ortamda üremesinden sonra şekillenen ekzopolisakkarit bir matrikstir. Bir stafilokok suşunun slime üretebilen var-

yantlarının, üretmeyen varyantlarından daha yüksek derecede kolonizasyon yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Baselga ve ark., 1993). Slime üretimi ile antibiyotiklere direnç arasında da bir ilişki olduğu ve bu suşların oluşturduğu enfeksiyonların eradikasyonunun daha güç olduğu bildirilmektedir (Deighton ve ark., 1988). Keskin ve ark (2003) farklı hayvansal kaynaklardan izole ettikleri koagulaz negatif Stafilokoklarda slime üretimini tüp metodu ile araştırdıkları bir çalışmada inek orijinli suşlarda % 40 oranında pozitiflik saptamışlardır. İnsan orijinli suşlar ile yapılan ve tüp metodu ile KKA yöntemin kullanıldığı son çalışmalarda (Aktaş ve ark., 2001; Aral ve ark., 2004) ise KKA metodunun diğerine göre daha duyarlı bulunduğu (Aktaş ve ark., 2001) ya da iki metod arasında fark olmadığı (Aral ve ark., 2004) şeklinde bul-

gular bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı Konya Bölgesinde mastitisli ineklerden izole edilen *S. aureus* ve *S. intermedius* suşlarının slime faktör üretimini Christensen Tüp Metodu (CTM) ve Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemini kullanarak araştırmak ve söz konusu metodları karşılaştırmaktır.

Materyal ve Metot

Stafilokok suşları: Çalışmada, daha önce mastitisli inek sütlerinden izole ve identifiye edilen ve -20 °C'de saklanan 25 *S. aureus* suşu, 25 *S. intermedius* suşu ve 1 tane de *S. aureus* ATTC 6538 referans suşu kullanıldı. Suşların saflık kontrolleri % 7 koyun kanlı agarda (Blood Agar Base, Oxoid) yapıldı.

Slime üretimi: Slime üretiminin saptanması amacıyla Christensen (Christensen ve ark., 1982) ve Kongo Kırmızılı Agar (Freeman ve ark., 1989) yöntemi kullanıldı.

Kalitatif tüp metodunda, kanlı agardan alınan bakteri kolonisi, 5'er ml'lik Tripticase Soy Broth (TSB-Oxoid) bulunan besi yerlerine McFarland No 1 yoğunluğunda ekildi ve 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. Tüp içerikleri yavaşça uzaklaştırılarak tüpler iki kez distile su ile yıkandı ve daha sonra % 0.25'lik safranin ile boyandı. Boya döküldükten sonra tekrar yıkandı. Kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaları için bırakıldı. 24 saat sonra tüp yüzeyinde şekillenen renkli film tabakası pozitif ve bu tabakanın yoğunluğuna göre de (+++), (++) ve (+) derecelendirilmek üzere değerlendirildi. Film tabakası oluşturmayan tüpler (-) olarak kaydedildi. Negatif kontrol olarak steril besi yeri kullanıldı.

Kongo Kırmızılı Agar yönteminde ise kısaca, besi yeri, Brain Heart Agara 0.8 g/L Kongo kırmızısı eklenerek hazırlandı ve ekimler yapıldı. İnkübasyon sonunda (37 °C, 18 saat) koloni renkleri pembe-kırmızıya dönenler pozitif, beyaz-sarı renkli kalanlar ise negatif olarak değerlendirildi.

Bulgular

S. intermedius suşlarından CTM ile 11'i (%45.8) slime üretimi pozitifken, KKA yöntemi ile 22'si (%91.6) slime pozitif bulundu. KKA'da negatif sonuç veren suşların hepsi kalitatif tüp yönteminde de negatif sonuç verdi. *S. intermedius* suşlarının sadece 2'si ise (% 8.3) her iki yöntem ile de negatif sonuç verdi. Tüp yönteminde steril TSB besiyeri kullanılarak yapılan kontrol tüpü negatif sonuçlandı. *S. aureus* suşlarından tüp testi ile 11'i (%44) slime üretimi pozitif iken, KKA yöntemi ile 21'i (%84) slime pozitif bulundu. *S. aureus* ATTC 6538 referans suşu KKA da orta derecede (++) slime üretirken, tüp yönteminde zayıf pozitif (+) be-

lirildi. *S. aureus* suşlarının sadece 4'ü (%16) her iki yöntemde de negatif sonuç verdi.

Tartışma ve Sonuç

Ekstrasellüler polisakkaradin (slime) üretimi *S. aureus* ve Koagulaz Negatif Stafilokoklar (KNS) için virulans bir faktör olarak incelenmiştir (Younger ve ark., 1987; Christensen ve ark., 1994). Baldassarri ve ark. (2001) *S. aureus*'un düşük demir ve yüksek glukoz bulunan şartlardaki slime üretiminin demiri azaltılmamış ve glukozu artırılmamış şartlara göre daha kuvvetli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar in vitro olarak slime üretimi negatif olan *S. aureus* suşlarının yukarıdaki şartların sağlandığı in vivo ortamlarda pozitif hale geçtiğini ve bu özelliğin *S. aureus*'un sebep olduğu kronik enfeksiyonların patogeneğinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada glukoz ya da demir düzeylerine müdahale edilmemiş ancak kullanılan besi yerinde başka bir karbohidrat olan dextrozun nisbeten yüksek oranda bulunmasının etkisiyle suşların slime üretimine katkısı olabileceği düşünülmektedir. Çiftçi ve ark. (2004) çeşitli orijine sahip 108 *S. aureus* suşunun slime üretimini araştırdıkları çalışmalarında, suşların %30.5'ini pozitif bulmuşlardır. Bu oran çalışmamızdaki CTM ile elde edilen sonuçlara yakın bulunmuştur.

Bu çalışmada, *S. intermedius* suşlarının % 45.8'i CTM ile, % 91.6'sı ise KKA metodu ile pozitif bulunmuştur. Her iki metod arasındaki daha duyarlı olan KKA yöntemidir. Keskin ve ark. (2003)'ün CTM ile yaptıkları bir çalışmada mastitisli ineklerden izole edilen KNS suşlarının % 40'nın slime ürettikleri sonucu, bu çalışmadaki CTM ile uyum göstermektedir. Akyar ve ark. (1998)'nin KKA metodu ile CTM'nu kıyaslamak amacıyla yaptıkları ve beşeri orijinli suşların kullanıldığı başka bir çalışmada, KNS suşlarının KKA yöntemi ile %43, CTM ile %42 oranında slime faktör ürettiklerini saptamışlardır. Aktaş ve ark. (2001) ise KNS'ların KKA ile %59, CTM ile %42.3 slime pozitif olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada bulunan oranlar Aktaş ve ark.'nın (2001) belirledikleri oranlarla uyum içindedir. Öte yandan nozokomiyal kaynaklı suşlar kullanılarak yapılan bir çalışmada CTM'nu kullanan Alcaraz ve ark. (2003) KNS suşlarının %55.5'nin slime ürettiğini belirlemişlerdir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında slime üretimini KKA metodu ile % 33.3, CTM ile % 30.5 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir (Çiftçi ve ark., 2004). Hayvan orijinli koagulaz negatif stafilokok suşlarının %73'ünde slime üretimi belirlemişlerdir (İstanbuluoğlu ve ark, 2002).

Sonuç olarak mastitisli ineklerin süt örneklerinden izole edilen KNS suşlarının slime üretiminin yanısıra, Koagulaz Pozitif Stafilokok suşlarının da ve özellikle

S. intermedius'un slime ürettiği ve bu iki yöntemden KKA yönteminin daha kolay uygulanabilen, çabuk sonuç veren ve çok kolay değerlendirilebilir ekonomik bir metod olduğu sonucuyla diğer araştırmacılarla aynı görüşteyiz (Akyar ve ark., 1998, Aktaş ve ark., 2001, Aral ve ark., 2004).

Kaynaklar

Aktaş, A.E., Yiğit, N., Al, F.D., Şahin, Ü.A. Ayyıldız, A. (2001). Koagülaz negatif Stafilocoklarda slime üretiminin çeşitli yöntemlerle araştırılması. Hastane İnfeksiyonları. 5 (4): 303-307.

Akyar, I., Fidan, I., Rota, S., Türet, S. (1998). Koagülaz negatif Stafilocoklarda slime faktör yapımının üç farklı yöntemle araştırılması, tür tayini ve antibiyotik direnci. Mikrobiyoloji Bülteni. 32 (1): 15-22.

Alcaraz, L.E., Satorres, S.E., Lucero, R.M., Puig de Centorbi, O.N., (2003). Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in Coagulase- Negative Staphylococci isolated from nosocomial specimens. Brazilian Journal of Microbiology. 34: 45-51.

Amorena, B., Baselga, R., Aguilar, B. (1990). Factors influencing the degree of in vitro bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. Vet. Microbiol, 24:43-53.

Aral, M., Erkmén, N., Yılmaz, M. (2004). Çeşitli örneklerden izole edilen Koagülaz negatif Stafilocokların slime üretiminin iki farklı yöntemle karşılaştırılması olarak incelenmesi. İnfeksiyon Dergisi. 18 (1):53-58.

Baldassarri, L., Bertuccini, L., Ammendolia, M.G., Arciola, C.R., Montanaro, L., 2001. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20: 343-345.

Baselga, R., Albizu, I., De La Cryz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B. (1993). Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. Infect. Immun., 61:4857-4862.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. and Beachey, E.H. (1982). Adherence of Slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37:318-326.

Christensen G. D., Baldassarri, L., Simpson, W. A. (1994). Colonization of medical devices by coagulase-negative

staphylococci. In: Bisno A.L., Waldvogel F. A., (eds): Infections associated with indwelling medical devices. American Society for Microbiology, Washington DC. Pp 45-78.

Çiftçi, A., Iça, T., Onuk, E.E., Baş, B., Tosun, G. (2004) Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında slime faktör üretiminin iki farklı yöntemle araştırılması ve antibiyotik direnci. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 14-16 Eylül, Elazığ.

Deighton, M.A., Franklin, J.C., Spicer, W.J., Balkau, B. (1988). Species identification, antibiotic sensitivity and slime production of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical specimens. Epiderm. Inf. 101: 99-113.

Freeman, D.J., Falkiner, F.R. and Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 42: 872-874.

Iturralde, M., Aguilar, B., Baselga, R., Amorena, B. (1993). Adhesion of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strain to epithelial cells from ovine mammary gland primary culture and from a rat intestinal cell line. Vet. Microbiol. 38:115-127.

İstanbuluoğlu, E., Yıldırım, M., Apan, T., Fındık A. (2002) İnsan ve hayvan orijinli stafilocok suşlarının biyotiplendirilmesi, antibiyotik ve metal direnç, protein A ve slime faktör özellikleri üzerinde çalışmalar. V. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 24-26 Eylül, Konya.

Keskin, O., Altay, G., Akan, M., (2003). Farklı hayvansal kaynaklardan izole edilen Koagülaz Negatif Stafilocoklarda slime üretimi ve aderans. Turk J. Vet. Anim. Sci. 27: 252-257.

Opdebeeck, J.P., Frost, A.J., O'Boyle, D. (1988). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. Vet. Microbiol. 16, 77-86.

Younger, J. J., Christensen, G. D., Bartley, D. L., Simons, J. C. H., Barrett, F. F. (1987). Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. Journal of Infectious Diseases. 156:548-554.