

STAFİLOKOK'LARIN KOAGULAZ VE CLUMPİNG FACTOR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE PLAZMA SEÇİMİNİN ÖNEMİ(*)

Prof. Dr. Nejat AYDIN(**) Dr. Hatice AYHAN(**)

G İ R İ Ş

Çeşitli kaynaklardan izole ve identifiye edilen stafilocok'ların in vivo ve in vitro olarak üretildikleri ortama salgıladıkları, konakçı üzerine etkili olan ekstraselular maddelerin patojenite ile yakından ilişkili bulunduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Bu amaçla, stafilocok'ların identifikasyonunda virulens faktörlerini ortaya koymayı amaçlayan testlerden yararlanılmaktadır. Nitekim, Uluslararası Taksonomi Komisyonu tarafından stafilocok'ların sınıflandırılmasında koagulaz yapımı, aerobik koşullarda sakkaroz, trehaloz ve mannitol'den asit oluşturulması, fosfataz ve novobiyosin'e duyarlılık testleri önerilmiştir (17). Koagulaz testi, bugün için patojenik stafilocok'ların identifikasyonunda halen en çok başvurulan bir test olarak kullanılmaktadır.

İnsan ve hayvanlardan izole edilen stafilocok'ların in vivo ve in vitro üretildikleri ortama salgıladıkları koagulaz, DNase, termonükleaz, fosfataz, hyalüronidaz ve protein-A'nın patojenite ile ilgili olduğu bilinmektedir (1,10). Koagulaz ısıya dirençli, filtrelerden geçebilen bir enzimdir. Koagulaz pozitif suşların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının mikroorganizmayı fagositozise karşı koruyarak patojeniteye katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (3). Patojenik stafilocok'lar, genellikle, bağlı (clumping factor-CF) ve serbest (stafilokinaz) olarak tanımlanan her iki koagulaza da sahiptirler. Serbest ve bağlı koagulazın ayrı antijenik yapıda oldukları, farklı enzimatik mekanizma ile plazmayı pıhtılaştırdıkları gösterilmiştir (7). Bu nedenle S.aureus'un identifikasyonunda clumping factor ve bağlı koagulazın teşhisinde lam koagulaz testi (CFT), serbest koagulazın belirlenmesinde tüp koagulaz testi (TKT) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bazı araştırmacılar, stafilocok'ların koagulaz aktivitelerinin test edilmesinde plazma seçiminin önemi değinmişlerdir (2,8,11,13,16,18). Araştırmacılar, tavuk orijinli stafilocok suşlarının koagulaz aktivitelerini belirlemek amacıyla insan, domuz, tavşan, at, sığır, koyun ve tavuk plazmalarını denemişler ve test için en uygun olanının tavşan plazması olduğu görüşünde birleşmişlerdir.

(*) XIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Haziran 1990, Kayseri'de tebliğ edilmiştir.

(**) A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Bu çalışmanın amacı, tavuk orijinli stafilocok suşlarının koagulaz, clumping factor aktivitelerinin belirlenmesinde tavşan, tavuk, koyun plazmalarını kullanarak en uygun olanının saptanması olmuştur.

MATERYAL VE METOT

Stafilokok suşları : Denemelerde farklı yaşlardaki sağlıklı ve hasta tavukların değişik doku ve organlarından izole edilen toplam 244 stafilocok suşu kullanıldı. İzole edilen bu suşlardan, kanlı agarda hemoliz, clumping, factor, tüp koagulaz, latex aglutinasyon, DNase, glikoz ve mannitolün aerobik ve anaerobik fermentasyonu testleriyle 126 izolat S.aureus, 118 izolat ise S.epidermidis olarak identifiye edildi.

Plazma : Suşların koagulaz ve clumping factor aktivitelerinin belirlenmesinde A. Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Hayvanları ünitesindeki tavşan, tavuk ve koyunlardan yararlanıldı. Hayvanlardan % 5 sodyum sitrat içine alınan kan 1500-2000 rpm de 10-15 dak. santrifüj edilerek plazma elde edildi.

Clumping factor test (CFT) : Suşların clumping factor aktivitelerinin saptanmasında Devriese ve Oeding'in (5) yöntemi kullanıldı. Test, tavşan, tavuk ve koyunların plazmaları ile yapıldı.

Tüp koagulaz Test (TKT) : İzole edilen stafilocok'ların tüpte koagulaz aktiviteleri Kato ve Kume'nin (12) bildirdikleri yöntemle yapıldı. Denemelerde 1/5 oranında sulandırılmış tavşan, tavuk ve koyun plazmaları kullanıldı. Test 37°C'de 1., 2., 4., 24. saatlerde koagulasyonun varlığına göre değerlendirildi.

B U L G U L A R

Clumping factor Test Sonuçları : Tavuk orijinli 126 S.aureus suşunun TSA (Trypticase soy agar) besiyerindeki kolonileriyle yapılan tavşan, tavuk ve koyun plazmalarının kullanıldığı CF testinde sırasıyla: 124 (% 98), 120 (% 95), 120 (%95) pozitiflik saptandı. 118 S.epidermidis suşlarının 3 (% 2.5)'ü tavşan, 66 (% 56)'sı tavuk ve 67 (% 57)'si koyun plazmalarıyla bu testte pozitif reaksiyon verdi (Tablo-1).

Tüp koagulaz Test Sonuçları : Tavuk orijinli 126 S.aureus ve 118 S.epidermidis olmak üzere toplam 244 adet stafilocok'un 1/5 sulandırılmış tavşan, tavuk ve koyun plazmalarının kullanıldığı tüp koagulaz testlerinde, S.aureus'lardan 123 (% 98)'ü, 79 (% 63)'ü, 84 (% 67)'ü; S.epidermidis'lerden 4 (% 3)'ü, 17 (%14)'si ve 19 (% 16)'u pozitif olarak bulundu (Tablo-1).

Tablo-1 : İncelenen Stafilokok Suşlarının Toplu Olarak Biyolojik Özellikleri (sayı ve % oran olarak)

Testler	Plazma	İncelenen Stafilokok Suşları			
		S.aureus		S.epidermidis	
		Sayı	%	Sayı	%
CFT°	Tavşan	124	98	3	2.5
	Tavuk	120	95	66	56
	Koyun	120	95	67	57
TKT°	Tavşan	123	98	4	3
	Tavuk	79	63	17	14
	Koyun	84	67	19	16

(CTF°) : Clumping factor test

(TKT°) : Tüp koagülaz test

T A R T I Ş M A

Stafilokok'ların identifikasyonunda ve sınıflandırılmasında koagülaz yapımı, aerobik koşullarda sakkaroz, trehaloz ve mannitol'den asit oluşturulması, fosfataz ve novobiyosin'e duyarlılık testleri önerilmiştir (17). Koagülaz testi bunlar içerisinde halen en çok başvurulan ve patojenite kriteri olarak kabul edilen bir test olarak önemini korumaktadır.

Birçok araştırmacı, koagülaz testinin uygulanışında temel bir reaktif olarak kullanılan değişik kaynaklı plazmaların etkinliği üzerinde durmuşlardır. Orth ve ark. (15), insan, domuz, tavşan, at, sığır, tavuk ve koyun plazmalarının koagülaz testinde kullanılabilirliğini incelemişler, koagülazı etkileyen faktörün en uygun oranda insan, domuz ve tavşan plazmasında bulunduğunu açıklamışlardır. Cooper ve Needham (4)'da kanatlı stafilokok enfeksiyonlarında düşük oranlardaki S.aureus suşlarının identifikasyonunda başvurulan koagülaz testi için plazma seçiminin önemini belirtmişlerdir. Gibbs ve Patterson (8), kanatlılardan izole ettikleri stafilokok'ları insan, tavşan, sığır, koyun ve tavuk plazmaları ile koagülaz testine tabi tuttuklarında, çoğunun tavşan, insan ve domuz plazmalarını koagüle ettiklerini, bir kısmının sığır plazmasını pıhtılaştırdığını, ancak tavuk ve koyun plazmasıyla koagülaz test sonuçlarını negatif olarak bulduklarını bildirmişler; pek çok araştırmacının bulgularıyla (6,9,10,11) benzer sonuçlar elde ettiklerini ortaya koymuşlardır. Terzolo ve Shimizu (18), tavuk orijinli stafilokok suşlarının tamamının tüp ve

lam koagulaz testlerinde tavşan ve insan plazmalarını pıhtılaştırdıklarını, ancak sığır ve tavuk plazmasını etkilemediğini saptamışlardır. Akay ve ark. (2), hastalıklı piliçlerden izole edilen S.aureus suşlarının insan, tavuk, sığır, koyun ve tavuk plazmaları ile uyguladıkları tüp koagulaz testinde tavuk orijinli stafilokok'ların koagulaz oluşturmalarının belirlenmesinde öncelikle tavşan ve sığır plazması kullanımının uygun olacağı görüşünü ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, özellikle, lam koagulaz testinde bu iki plazma kullanımının uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, sağlıklı ve hasta tavukların çeşitli doku ve organlarından izole ve identifiye edilen 126 S.aureus ve 118 S.epidermidis olmak üzere toplam 244 suşun koagulaz ve clumping factor aktiviteleri tavşan, tavuk ve koyun plazmaları kullanılarak incelendi. Clumping factor testinde S.aureus suşları tavşan plazması ile % 98 tavuk ve koyun plazmaları ile % 95 pozitif sonuç verdiği halde, S.epidermidis suşlarının % 2.5'i tavşan, % 56'sı tavuk ve % 67'si de koyun plazması ile pozitif sonuç verdi. Tüp koagulaz testlerinde ise S.aureus suşları tavşan plazması ile % 98, tavuk plazması ile % 63 ve koyun plazması ile % 67 pozitif reaksiyon verirken, S.epidermidis suşlarının % 3'ü tavşan, % 14'ü tavuk, % 16'sı koyun plazması ile pozitiflik gösterdi. Bu sonuçlara göre patojenik karakterlere sahip suşların ayırımında önemli testler olan koagulaz ve clumping factor testlerinde tavşan plazmasının en iyi reaksiyon verdiği anlaşılmaktadır. Nitekim, bu bulgularımız tüm araştırmacılar tarafından da teyid edilmektedir. Bunun yanı sıra, S.epidermidis olarak izole ve identifiye edilen suşların % 14'ünün tavuk ve % 16'sının koyun plazması ile tüp koagulaz testinde, lam koagulaz testinde ise % 56'sının tavuk ve % 67'sinin koyun plazması ile pozitif reaksiyon vermesi, Menzies (14)'in bildirdiği gibi sitratın utilize olması ve koagülasyon benzeri bir aktivite nedeniyle yalancı bir pozitifliğin söz konusu olabileceği yönündeki yorumuyla açıklanabilir. Ayrıca, S.epidermidis suşlarının % 2.5'inin clumping factor testinde, % 3'ünün tüp koagulaz testinde tavşan plazması ile pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Bu suşların identifikasyonunda pekçok araştırmacının bildirdiği gibi diğer bazı patojenite kriterlerini saptamak amacıyla geliştirilen testlerden yararlanıldı.

Sonuç olarak, elde edilmesi, hazırlanması ve özellikle, bir patojenite kriteri olarak uygulanan koagulaz factor testlerinde etkinliği gözözünde tutularak, tavşan plazmasının seçiminin ön planda tutulması gereği ortaya konulmuştur.

Ö Z E T

Tavuk orijinli stafilokok suşlarının koagulaz ve clumping factor aktivitelerine çeşitli hayvan plazmalarının (tavşan, tavuk, koyun) etkisi incelendi. Çalışmalarda, tavuklardan izole edilen 126 S.aureus ve 118 S.epidermidis suşu kullanıldı. CFT'de S.aureus suşları tavşan plazması ile % 98, tavuk ve

koyun plazmaları ile % 95 pozitif bulundu. S.epidermidis suşlarının % 2.5'i tavşan, % 56'sı tavuk ve % 67'si koyun plazması ile pozitif reaksiyon verdi. Tüp koagulaz testinde (TKT), sırasıyla, % 98, % 63 ve % 67'sini koagule etti. S.epidermidis suşlarında bu oran sırasıyla, % 3, % 14 ve % 16 bulundu.

S U M M A R Y

The effect of various plasmas (from rabbit, chicken, sheep) on the coagulase and clumping factor activities of avian staphylococci were used in tests. In CFT, 98 %, 95 % and 95 % of S.aureus strains gave positive reaction with rabbit, chicken and sheep respectively. In tube coagulase test, 98 %, 63 %, 14 % of S.aureus strains coagulated the plasmas of rabbit, chicken, sheep respectively. These were found as 3 %, 14 % and 16 % in S.epidermidis strains.

K A Y N A K L A R

- 1 - ABRAMSON, C. (1973) : Staphylococcal Enzymes. In: COHEN, J.O. : staphylococci. Wiley-Interscience, New York USA.
- 2 - AKAY, Ö., IZGÜR, M., USLANOĞLU, B. ve ERGANIŞ, O. (1988) : Hastalıklı Piliçlerden İzole Edilen S.aureus Suşlarının kültürel, Biyokimyasal ve Biyolojik Karakterlerinin Belirlenmesi Üzerinde Bir Araştırma. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 34: 294-308.
- 3 - BİLGEHAN, H. (1987) : Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Bilgehan Basımevi, Bornova, İzmir.
- 4 - COOPER, J.E., NEEDHAM, J.R. (1976) : An Investigation into the Prevalence of S.aureus on Avian Feet. Vet. Rec., 98: 172-174.
- 5 - DEVRIESE, L.A. and OEDING, B. (1976) : Characteristics of S.aureus Strains Isolated from Different Animal Species. Res. Vet. Sci., 21: 284-294.
- 6 - DEVRIESE, L.A., DEVOS, A.H. and DAMME, L.R. (1975) : Quantitative Aspects of the S.aureus flora of Poultry. Poult. Sci., 54: 95-101.
- 7 - DUTHIE, E.S. (1954) : Evidence of Two forms of Staphylococcal Coagulase. J. Gen. Microbiol., 10: 427-436.
- 8 - GIBES, P.A., PATTERSON, J.T. and THOMPSON, J.K. (1978) : Characterisation of Poultry Isolates of S.aureus by a New Set of Poultry Phages. J. App. Bacteriol., 44: 387-400.
- 9 - HAJEK, V. and MARSALEK, E. (1971) : The Differentiation of Pathogenic Staphylococci and an suggestion for Their taxonomic Classification. Zbl. Bak. Parasit. I. (Ogic), 217: 176-182.
- 10 - HARRY, E.G. (1967a) : The Characteristics of S.aureus Isolated From Chanes of Staphylococcosis in Poultry. Res. Vet. Sci., 8: 479-489.

- 11 - HARRY, E.G. (1976b) : Some Characteristics of *S.aureus* Isolated From The Skin and Upper Respiratory Tract of Domesticated and Wild (Feral) Birds. *Res. Sci.*, 8: 490-499.
- 12 - KATO, E. and KUME, T. (1980) : Enterotoxigenicity of Bovine Staphylococci Isolated From California Mastitis Test Positive Milk in Japan. *Jap. J. Vet. Res.*, 28: 75-85.
- 13 - LUKASOVA, J., MICKOVA, V. and PCHALEK, J. (1986) : Characteristics of *S.aureus* Strains Isolated From Slaughtered Poultry. *Zbl. Für. Mikrobiol.*, 141: 163-168.
- 14 - LENZIES, R.E. (1977) : Comparison of Coagulase, Deoxyribonuclease (DNase) and Heat-Stable Nuclease Tests For Identification of *S.aureus*. *J. Clin. Pathol.*, 30: 606-608.
- 15 - ORTH, D.S., CHUGG, L.R. and ADERSON, A.W. (1971) : Comparison of Animal Sera For Suitability in Coagulase Testing. *Appl. Microbiol.*, 21: 420-425.
- 16 - SMITH, H.W. (1954) : Experimental Staphylococcal Infections in Chickens. *J. Pathol. Bacteriol.*, 47: 81-87.
- 17 - SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965) : Recommendations. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. and Taxon.*, 15: 109-110.
- 18 - TERZOLO, H.R. and SHIMIZU, A. (1978) : Biological Characters and Bacteriophage Typing for *S.aureus* From Chicken Staphylococcosis and Commercial Balanced Chicken food in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 11: 89-101.