

**KAN KÜLTÜRLERİNDE İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ NEGATİF
STAFİLOKOKLARIN TIPLENDİRİLMESİ VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**
**Identification of Coagulase Negative Staphylococci Isolated From Blood Cultures and
Determination and Investigation of Antibiotic Susceptibility**

Aevar KHORSHE¹, Yusuf ÖZBAL²

Özet: Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen bakterilerdir. Tıpta uygulanan invaziv teknikler ve protez kullanımının artması nedeniyle insan vücudunun normal florasının bir üyesi olan bu bakterilerin önemi gittikçe artmaktadır. Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı bakteriyoloji biriminde kan kültürlerinden soyutlanan *S.epidermidis* dışında KNS'lerin tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerine başvuran ve bakteriyolojik kültür istenilen hastalardan alınan kan örneklerinden soyutlanan *S.epidermidis* dışında 150 KNS izolatu çalışma kapsamına alındı. Tüp koagülaz ve trehaloz-mannitol testleri ile doğrulandıktan sonra API STAPH (bio Mérieux) tanımlama sistemi ile üretici firma kılavuzuna göre tür düzeyinde tanımlandı. Tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılık profili CLSI önerileri doğrultusunda Mueller-Hinton agar kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle belirlendi. *S.epidermidis* dışı 150 KNS izolatu % 48.7'si *S.hominis*, %17.3'ü *S.haemolyticus*, %17.3'ü *S.xyloso*, % 3.3'ü *S.saprophyticus*, %3.3'ü *S.simulans*, %2.6'sı *S.lentus*, % 2.1'i *S.warneri*, %2.1'i *S.chromogenes*, %1.3'ü *S.eguerum*, % 1.3'ü *S.capitis* ve %0.7'si *S.cohnii* olarak saptandı. *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.xyloso*, *S.warneri*, *S.lentus* ve *S.chromogenes* türlerinin %46.1-%76.9'u ampicillin-sulbaktam, sefazolin ve metisiline; *S.warneri*, *S.saprophyticus* ve *S.simulans* türlerinin % 100'ü gentamisine; *S.xyloso* ile *S.saprophyticus*'un %100'ü novobiosine, bütün türlerin %33.3-%66.7'si sefazoline, %33.3-% 100'ü eritromisine, %20.0-%72.6'sı trimetoprim-sülfametoksazola dirençli; *S.simulans* ampicillin-sulbaktam, sefazolin ve metisiline, *S.chromogenes* gentamisine, *S.xyloso* dışında izole edilen bütün türler teikoplanin ve vankomisine, *S.xyloso* ile *S.saprophyticus* dışında bütün türler novobiosine duyarlı bulundu. Sıkça izole edilen bakteri gruplarından KNS'lerin, antibiyotiklere direnç oranların yüksek olması nedeniyle KNS enfeksiyonlarında tür düzeyinde tanımlama ve uygun antibiyotik seçimi için antibiogram testi yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik duyarlılık, Disk difüzyonu, KNS, Kan kültürü

¹ Bilim Uzm.Erc. Ün.Sağ. Bil.Ens.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

² Prof.Dr.Erc. Ün.Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 26.09.2011

Kabul Tarihi : 23.11.2012

Abstract: Coagulase Negative Staphylococci (CNS) are the most frequently isolated bacteria in clinical microbiology laboratories. The importance of these bacteria that are the component of normal flora of human body have been increasing by means of applications of invasive techniques in medicine and increasing the usage of prosthetic devices. The aim of this study is to identify and investigate the antibiotic susceptibility of CNS except *S.epidermidis* which are isolated from blood cultures in bacteriology unit of Central Laboratory of Erciyes University Hospital. Besides *S.epidermidis*, 150 CNS isolates are involved in this study. They were isolated from the requested blood cultures of bacteriologic culture of the patients who had applied to Erciyes University Medical Faculty Hospitals. After confirming with tube coagulase and trehalose-mannitol tests; isolates were identified at species level with API STAPH (bio Mérieux) identification system by following the manufacturers guideline's. Antibiotic susceptibility profile of identified subspecies were determined by Kirby-Bauer Disc Diffusion Method using Muler-Hinton agar and following CLSI recommendations. Besides *S.epidermidis*, 150 CNS isolates was determined as follows; 48.7% *S.hominis*, 17.3% *S.haemolyticus*, 17.3% *S.xyloso*, 3.3% *S.saprophyticus*, 3.3% *S.simulans*, 2.6% *S.lentus*, 2.1% *S.warneri*, 2.1% *S.chromogenes*, 1.3% *S.eguerum*, 1.3% *S.capitis* and 0.7% *S.cohnii*. 46.1%-76.9% of *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.xyloso*, *S.warneri*, *S.lentus* ve *S.chromogenes* species were found resistant to ampicillin-sulbactam, cefazolin and meticillin; and also 100% of *S.warneri*, *S.saprophyticus* and *S.simulans* to gentamicin; %100 of *S.xyloso* and *S.saprophyticus* to novobiocin, 33.3%-66.7% of all species to cefazolin, 33.3%-100% to erythromycin, 20.0%-72.6% to trimethoprim-sulfamethoxazole. *S.simulans* were found susceptible to ampicillin-sulbactam, cefazolin and meticillin, and also *S.chromogenes* to gentamicin, all isolated species except *S.xyloso* to teicoplanin and vancomycin, and all species except *S.xyloso* and *S.saprophyticus* to novobiocin. Because of the high rates of resistance to antibiotics of CNS, frequently isolated bacteria, identification at species level and antibiogram test must be performed for the selection of convenient antibiotic in CNS infections.

Keywords: Antibiotic susceptibility, Blood culture, CNS, Disc diffusion

***Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3435 nolu proje ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir .**

Micrococccaceae ailesinin üyesi olan stafilocoklar hareketsiz aerobik ortamı tercih eden fakat fakültatif anaerob gibi de davranabilen Gram pozitif koklardır. Doğada yaygın olarak bulunur ve başlıca kaynağı insanlardır. *Staphylococcus* genusu içinde bugüne kadar 60'ın üzerinde tür ve alt tür tanımlanmış olup bunlardan 32'si insanlarda saptanmıştır. Stafilocoklar insanda en sık deride ve dışarı açılan vücut boşluklarını kaplayan mukozalarda kolonize olurlar. Deri bütünlüğünün bozulması durumunda deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteremi, kardiyovasküler, solunum, kas ve iskelet, merkezi sinir ve üriner sistem enfeksiyonları gibi birçok hastalığa sebep olurlar (1).

KNS türleri insanların normal deri ve mukoza florasının önemli bir üyesidir. Başta *S. epidermidis* olmak üzere bütün KNS türleri nozokomiyal enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. *S. haemolyticus* insanda doğal kapak endokarditi, septisemi, peritonit, üriner sistem enfeksiyonu, yara, kemik ve eklem enfeksiyonlarına yol açabilen ikinci en sık görülen KNS'dir. KNS'lerin adezyonu; damar grefti, çeşitli protez ve peritoneal diyaliz kateterlerinde, ortopedik implantlarda, prostetik kalp kapakçıklarda, eklem protezlerinde, serebrosipinal şant, invaziv vasküler kateterlerde ve idrar yollarında ağır seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır (2).

KNS'lerin tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi, klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır (3). Tür düzeyinde tanıya olanak sağlayan biyotiplendirme, serotiplendirme, faj tiplendirme, DNA hibridizasyon ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır (1,4,5). Ayrıca, API STAPH Ident System (bio Mérieux) ve Micro Scan gibi hızlı otomasyon sistemler de geliştirilmiştir (6). Bu sistemler KNS'lerin tür düzeyinde tanısını olanaklı kılmaktadır. Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi hastanesi Merkez Laboratuvarı Klinik Mikrobiyoloji biriminde kan kültürlerinden soyutlanan *S. epidermidis* dışında KNS'lerin tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Koagülaz negatif stafilocokların izolasyonu

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerine başvuran ve bakteriyolojik kültür istenilen hastalardan alınan kan örneklerinden soyutlanan *S. epidermidis* dışında koagülaz negatif stafilocoklar (KNS) çalışma kapsamına alındı.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Klinik Bakteriyoloji birimine gelen kan örnekleri kan kültürü şişelerine ekimleri yapılarak Bactec 9240 otomatize kan kültürü cihazına (Becton-Dickinson, USA) konuldu ve cihaz pozitif uyarısını verene kadar en fazla 5 gün inkübe edildi. Pozitif kan kültürleri gram boyama ile değerlendirildikten sonra %5'lik koyun kanlı agara ekimleri yapılarak 35°C'de 24 saat inkübe edildi. KNS identifikasyonu; koloni morfolojisi, gram boyama özellikleri, pozitif katalaz testi, negatif tüp koagülaz testi ve pozitif trehaloz-mannitol testi ile yapıldı.

İdentifikasyonu yapılan 150 adet KNS suşunun %5'lik koyun kanlı agarda üreyen kolonilerden 1-2 koloni alınarak 1 ml gliserinli brucella broth içeren endorf tüplerinde süspanasyonu yapıldı. Bu suşların analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20 °C'de) saklandı.

Koagülaz negatif stafilocokların doğrulanması

Koagülaz negatif stafilocok olarak belirlenen stafilocok suşlarını doğrulamak amacıyla tüp koagülaz ve trehaloz-mannitol testleri çalışıldı.

Tüp koagülaz testi

Gliserinli brucella broth içerisinde saklanan KNS süspanasyonları oda ısısına getirildikten sonra kanlı agarlara pasajları yapıldı ve kanlı agarda üremiş kolonilerden öze ile bir-iki koloni alınarak 1 mL tavşan plazması içinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Daha sonra tüpler 37 °C'de enkübe edildi. Tüplerde pıhtı oluşup oluşmadığı 1., 2. ve 4. saatlerde kontrol edildi. Bu süre içerisinde pıhtı oluşturmayan suşlar 18-24. saatte tekrar kontrol edildi ve pıhtı oluşturan suşlar tüp koagülaz testi pozitif olarak kabul edildi.

Trehaloz-mannitol testi

Kanlı agarda üremiş kolonilerden öze ile bir-iki koloni alınarak 1 mL trehaloz-mannitol broth içerisinde süspanse edildi. Daha sonra tüpler etüvde 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Trehaloz ve mannitolden asit oluşumu sonucu mor renkten sarıya dönen tüplerdeki suşlar trehaloz-mannitol testi pozitif olarak kabul edildi.

Koagülaz negatif stafilocokların API STAPH ile tiplendirilmesi

KNS suşlarına ait süspanسیونlar derin dondurucudan (-20°C) alınarak oda ısısına getirildi. Her bir KNS suşundan birer öze dolusu bakteri süspanسیونu alındı ve kanlı agarlara pasajları yapıldı. Bu saf KNS kültürleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

API STAPH kiti (bio Mériuex, France) oda ısısına getirilerek kapağı açıldı ve test prosedürüne göre çalışıldı. API Suspension Medium ampülü içine identifiye edilen KNS suşlarından pasajlarla elde edilen taze kültürlerden birkaç (genellikle iki) benzer koloni pamuklu steril silgeçle alındı ve 0.5 McFarland'a eşdeğer bir süspanسیون hazırlanarak homojenize edildi. API STAPH kitinin her bir kuyucuğuna içine 55 µl süspanسیون inoküle edildi. Urea (URE), Arginine Di-Hydrolase (ADH) ve Ornithine DeCarboxylase (ODC) olarak isimlendirilen testlerin yapıldığı kuyucuklar sırasıyla 2'şer damla mineral yağ ile kaplandı. API STAPH kitinin üzeri özel kapağı ile kapatılarak 37 °C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben API STAPH kitinin 0 sırasındaki tüm kuyucuklara birer damla Voges Proskauer (VP) testi için VP kuyucuğuna VP1 ve VP2 ayrıçlarından birer damla Potassium nitrate (NITrates) (NIT) için NIT kuyucuğuna NIT1 ve NIT2 ayrıçlarından birer damla, Beta Galactosidase (BGAL)-Pyrrolidonyl Arylamidase (PyrA) kuyucuğuna FB ayrıçlarından birer damla eklendi. Reaktiflerin eklenmesinden 5 dk sonra cihaz otomatik olarak değerlendirildi ve veriler örnek sırasına göre tür düzeyinde tiplendirildi.

Antibiyotik duyarlılık testi

KNS suşlarına ait süspanسیونlar derin dondurucudan (-20 °C) alınarak oda ısısına getirildi. Her bir KNS suşundan birer öze dolusu bakteri süspanسیونu alındı ve kanlı agarlara pasajları yapıldı. Bu saf KNS kültürleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI önerilerine uyularak Mueller-Hinton agar (Difco) kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi uygulandı (7). Saf KNS kültürlerinden 1-2 koloni alınarak steril bir tüp içinde serum fizyolojik ile 0.5 Mc Farland eşeline göre süspanسیون hazırlandı. Her bir KNS suşuna ait hazırlanan süspanسیونlardan Mueller-Hinton agarın yüzeyin ekimleri yapıldı. Steril pensetle kenardan 1.5 cm, birbirlerinden 1.5 cm aralık olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirildi. Plaklar 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Her bir disk çevresindeki inhibisyon zon sınırları ölçüldü.

Kullanılan antibiyotik diskleri: Ampisillin-Sulbaktam (SAM) Ampisillin 10 µg - Sulbaktam 10 µg, Sefazolin (CZ), Klindamisin (CD), Eritromisin (E) 15 µg, Gentamisin (GM), Metisilin (MET), Teikoplanin (TEI), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), Vankomisin (VA), Novobiosin (NV) 5 µg.

BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakterioloji ünitesine Şubat 2011-Ağustos 2011 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi hastanelerinin kliniklerinden gönderilen kan örneklerinden soyutlanan *S.epidermidis* dışında toplam 150 adet koagülaz negatif stafilocok suşları API sistemiyle tiplendirildi ve antibiyotiklere duyarlılıkları araştırıldı.

S. epidermidis dışında izole edilen KNS'nin % 36.0'sı YBÜ'lerinden %64.0'ü kliniklerden izole edildi. Bu bilgiler laboratuvar kayıtlarına ulaşarak alındı.*S. epidermidis* dışında soyutlanan 150 KNS izolatlarının kiliniklere göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo I. KNS izolatlarının soyutlandığı örneklerin kliniklere göre dağılımları

Klinikler	KNS	
	Sayı	%
Pediatric süt çocuđu	3	2.0
Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji	15	10.0
İç hastalıklar ve iç hastalıkları YBÜ	16	10.7
Medikal onkoloji	7	4.7
Gastroenteroloji	12	8.0
Nefroloji ve pediatri nefroloji	15	10.0
Göğüs hastalıkları ve göğüs hastalıkları YBÜ	7	4.7
Hematoloji ve kemik iliđi ünitesi	14	9.3
Pediatric yeni doğan ve perematür YBÜ	12	8.0
Ortopedi	1	0.7
Pediatric nöroloji	5	3.3
Nöroloji YBÜ	6	4.0
Üroloji	2	1.3
Beyin cerrahi YBÜ	4	2.7
Genel cerrahi YBÜ	7	4.7
Kadın hastalıkları ve doğum	2	1.3
Pediatric hematoloji onkoloji	4	2.6
Pediatric adölesan	4	2.6
Kulak-Burun-Boğaz hastalıkları	1	0.7
Kardiyoloji ve kardiyoloji YBÜ	5	3.3
Dermatoloji	1	0.7
Fizik tedavi ve rehabilitasyon	1	0.7
Pediatric YBÜ	2	1.3
Göğüs Cerrahi YBÜ	1	0.7
Çocuk cerrahi	1	0.7
Pediatric enfeksiyon hastalıkları	2	1.3
Toplam	150	100

KNS'lerin API sistemiyle tiplendirme bulguları

Soyutlanan 150 adet KNS suşları trehaloz-mannitol testi ve tüp koagülaz testi uygulanarak doğrulandı. KNS suşlarının tamamı koagülaz testi negatif ve trehaloz-mannitol testi pozitif olduğu belirlendi.

S.epidermidis dışında izole edilen KNS 150 suşunun tür düzeyinde tiplendirilmesi API sistemi

ile yapıldı. Toplam 150 suştan 73'ü *S.hominis*, 26'sı *S.haemolyticus*, 26'sı *S.xylosus*, 3'ü *S.warneri*, 5'i *S.saprophyticus*, 5'i *S.simulans*, 4'ü *S.lentus*, 3'ü *S.chromogenes*, 2'si *S.eguorum*, 2'si *S. capitis* ve 1'i *S. cohnii* olarak tiplendirildi (Tablo II).

Tablo II. Tür düzeyinde tiplendirilen 150 KNS suşunun türlere göre dağılımı

KNS türleri	Sayı	%
<i>S. hominis</i>	73	48.7
<i>S. haemolyticus</i>	26	17.3
<i>S. xylosus</i>	26	17.3
<i>S. warneri</i>	3	2.1
<i>S. saprophyticus</i>	5	3.3
<i>S. simulans</i>	5	3.3
<i>S. lentus</i>	4	2.6
<i>S. chromogenes</i>	3	2.1
<i>S. eguorum</i>	2	1.3
<i>S. capitis</i>	2	1.3
<i>S. cohnii</i>	1	0.7
Toplam	150	100

Tanımlanan KNS suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları

Çalışma kapsamına alınan ve tanımlanan *S.epidermidis* dışında 150 adet KNS suşlarının çeşitli antibiyotiklere (Ampisillin-Sulbaktam, Sefazolin, Klindamisin, Eritromisin, Gentamisin, Metisilin, Teikoplanin, Trimetoprim-Sülfametoksazol, Vankomisin, Novobiosin) karşı duyarlılık oranları belirlendi (Tablo III). *S.eguorum*, *S. capitis* ve *S. cohnii* türlerinin sayıları az olduğundan antibiyotiklere duyarlılıklarının yüzde oranları tabloya eklenmedi.

Çalışmamızda, *S.epidermidis* dışında diğer KNS'lerden *S.hominis*'in ampisillin-sulbaktam ve metisiline %67.1, sefazoline %64.3, klindamisine %61.6, eritromisine %76.7, gentamisine %13.6 ve trimetoprim-sülfametoksazola %72.6 oranlarında; *S.haemolyticus*'un ampicillin-sulbactam, sefazolin ve metisiline %76.9, klindamisine %46.1, eritromisine %92.3, gentamisine %46.1 ve trimetoprim-sülfametoksazola %38.4 oranlarında; *S.xylosus*'un ampicillin-sulbactam, klindamisin ve metisiline %61.5, sefazoline %46.1, eritromisine %80.7, gentamisine %42.3, trimetoprim-sülfametoksazola %42.3 ve novobiosine %100.0 oranlarında; *S.warneri*'nin ampicillin-sulbactam, sefazolin,

Tablo III. KNS türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları

Antibiyotik		<i>S.hominis</i>		<i>S.haemolyticus</i>		<i>S.xylosoyus</i>		<i>S.warneri</i>		<i>S,saprophyticus</i>		<i>S.simulans</i>		<i>S.lentus</i>		<i>S.chromogenes</i>	
		n:73		n:26		n:26		n:3		n: 5		n:5		n:4		n:3	
		sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%	sayı	%
SAM	R	49	67.1	20	76.9	16	61.5	2	66.7	1	20.0	0	0.0	3	75.0	2	66.7
	S	24	32.9	6	23.1	10	38.5	1	33.3	4	80.0	5	100.0	1	25.0	1	33.3
CZ	R	47	64.3	20	76.9	12	46.1	2	66.7	1	20.0	0	0.0	3	75.0	2	66.7
	S	26	35.7	6	23.1	14	53.9	1	33.3	4	80.0	5	100.0	1	25.0	1	33.3
CD	R	45	61.6	12	46.1	16	61.5	2	66.7	1	20.0	3	60.0	2	50.0	1	33.3
	S	28	38.4	14	53.9	10	38.5	1	33.3	4	80.0	2	40.0	2	50.0	2	66.7
E	R	56	76.7	24	92.3	21	80.7	3	100.0	3	60.0	4	80.0	4	100.0	1	33.3
	S	17	23.3	2	7.7	5	19.3	0	0.0	2	40.0	1	20.0	0	0.0	2	66.7
GM	R	10	13.6	12	46.1	11	42.3	3	100.0	5	100.0	5	100.0	1	25.0	0	0.0
	S	59	81.0	12	46.1	14	53.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	75.0	3	100.0
	I	4	5.4	2	7.8	1	3.8										
MET	R	49	67.1	20	76.9	16	61.5	2	66.7	1	20.0	0	0.0	2	50.0	2	66.7
	S	24	32.9	6	23.1	10	38.5	1	33.3	4	80.0	5	100.0	2	50.0	1	33.3
TEİ	R	0	0.0	0	0.0	1	3.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	S	73	100.0	26	100.0	25	96.2	3	100.0	5	100.0	5	100.0	4	100.0	3	100.0
SXT	R	53	72.6	10	38.4	11	42.3	2	66.7	2	40.0	1	20.0	2	50.0	1	33.3
	S	20	27.5	16	61.6	14	53.9	1	33.3	3	60.0	4	80.0	2	50.0	2	66.7
	I					1	3.8										
VA	R	0	0.0	0	0.0	1	3.8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	S	73	100.0	26	100.0	25	96.2	3	100.0	5	100.0	5	100.0	4	100.0	3	100.0
NV	R	0	0.0	0	0.0	26	100.0	0	0.0	5	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	S	73	100.0	26	100.0	0	0.0	3	100.0	0	0.0	5	100.0	4	100.0	3	100.0

SAM: ampisillin-sulbaktam, CZ: sefazolin, CD: klindamisin, E: eritromisin, GM: gentamisin, MET: metisilin, TEİ: teikoplanin, SXT: trimetoprim-sülfametoksazol, VA: vankomisin, NV: novobiosin, R:dirençli, S: duyarlı, I: orta düzeyde duyarlı

klindamisin, metisilin ve trimetoprim-sülfametoksazola %66.7, eritromisin ve gentamisine %100.0 oranlarında; *S.saprophyticus*'un ampicillin-sulbactam, sefazolin, klindamisin ve metisiline %20.0, eritromisine %60.0, gentamisin ve novobiosine %100.0 ve trimetoprim-sülfametoksazola %40.0 oranlarında; *S.simulans*'in klindamisine %60.0, eritromisine %80.0, gentamisine %100.0 ve trimetoprim-sülfametoksazola %20.0 oranlarında; *S.lentus*'un ampicillin-sulbactam ve sefazoline %75.0, klindamisin, metisilin ve trimetoprim-sülfametoksazola %50.0, eritromisine %100.0 ve gentamisine %25.0 oranlarında ve *S.chromogenes*'in ampicillin-sulbactam, sefazolin ve metisiline %66.7, klindamisin, eritromisin ve trimetoprim-sülfametoksazola %33.3 oranlarında dirençli bulundu.

Tanımlanan fakat sayılarının az olması nedeniyle tabloya eklenmeyen 2 *S.eguorum*'nin 2'si de ampicillin-sulbactam, sefazolin, klindamisin, eritromisin ve metisiline; 2 *S. capitis*'in 1'i ampicillin-sulbactam, sefazolin, klindamisin, eritromisin ve metisiline ve 1'i *S. cohnii* ise ampicillin-sulbactam, sefazolin, klindamisin, eritromisin, metisilin ve novobiosine dirençli olduğu tespit edildi.

S.simulans ampicillin-sulbactam, sefazolin ve metisiline, *S.chromogenes* gentamisine, *S.xylosus* dışında izole edilen bütün türler teikoplanin ve vankomisine, *S.xylosus* ile *S.saprophyticus* dışında bütün türler novobiosine duyarlı bulundu.

TARTIŞMA

Doğada yaygın olarak bulunan ve başlıca kaynağı insan olan *Staphylococcus* genusu içinde sınıflandırılan tür üyeleri deri ve mukozalara yerleşmekte ve genellikle normal flora bakterileri olarak kabul görmektedir. KNS'ler özellikle hastane koşullarında her yerde bulunabilmektedir. Kan kültürlerinden izole edilen başta *S.epidermidis* olmak üzere KNS türlerinin enfeksiyonlarla ilişkisi ancak klinik ve bakteriyolojik kriterler dikkate alınarak doğrulanmaktadır.

KNS'ler bazı virülans faktörleri içermektedir. Üreaz, *S.saprophyticus* için bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir (8). Bazı KNS'ler yabancı

cisim üzerine yapıştıktan sonra bir virülans faktörü olduğu düşünülen "slime" maddesini üretmeye başlamakta ve bir süre sonra bol miktarda üretilen "slime" tabakasının içine gömülmektedirler. Böylece bu biyolojik tabaka, içine gömülen stafilokoklar, bir difüzyon bariyeri olarak antibiyotiklerin etkisinden korunmaktadır (9). Slime faktör ayrıca KNS'leri fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksiyi önler, nötrofil etkisini inhibe eder, lenfosit aktivitesini azaltır ve bu etkileri sayesinde bakteriye virülans özelliği kazandırır (10).

KNS'ler; damar içi kateterlerin sıklıkla kullanıldığı birimlerde nozokomiyal bakteremiye en sık sebep olan bakterilerdir. *S.saprophyticus* gerçek bir üropatojendir. İdrar örneklerinden *S.saprophyticus* izole edilmiş kadınların %90'ından fazlasında üriner sisteme ait semptomlar görülmüştür. Diğer KNS türleri de benzer enfeksiyon etkeni olabilmektedirler. Kan dolaşımı enfeksiyonları, Yoğun Bakım Ünite'lerde nozokomiyal pnömonilerden sonra ikinci sırada karşılaşılan enfeksiyonlardır (11,12). ABD'de sürdürülen çok merkezli sürveyans çalışması olan SCOPE (Sureveillance & Control of Pathogens of Epidemiological Importance) verilerine göre; 1995-2002 yılları arasında, 49 hastanede 24.179 nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları saptanmış ve etken olarak %31'inde KNS olduğu belirtilmiştir (13).

Retrospektif olarak koagülaz negatif stafilokok bakteremili 188 hasta değerlendirilmiş olan bir çalışmada, santral venöz katetere bağlı bakteremili sadece 2 hastanın kan kültüründen koagülaz negatif stafilokok soyutlanadığı belirtilmiştir (14).

Çalışmamızda Şubat-Temmuz 2011 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen *S.epidermidis* dışında KNS'lerin %36'sı YBÜ'lerinden gönderilmiş örneklerden soyutlanmıştır. Bunun sebebi YBÜ'de santral venöz/arteriyel kateterlerin daha sıklıkla kullanılması ile ilişkilidir.

De Paulis ve ark. (15), 2003 yılında rutin kullanıma uygun beş basit kimyasal temele dayanan test seçerek, KNS'lerin rutin laboratuvarlarda tip

ayrımı yapılabileceğini göstermiştir. Ticari olarak geliştirilmiş tip ayrımı yapabilen yöntemler içinde en sık kullanılan API-Staph (bio mérieux) olup türleri doğru olarak tanımlama duyarlılığı %80-85 olarak bildirilmiştir (6). Çalışmamızda, tür belirlenmesinde aynı yöntem uygulanmıştır.

İlk kez Christensen ve ark.(16), patojen *S.epidermidis* suşlarının kültür tüpünün iç yüzeyini kaplayarak bir ağ (slime) oluşturduklarını göstermişlerdir. Jones (17), slime maddesi oluşturan suşlar arasında en fazla *S.epidermidis*'e rastlandığını bildirilmiştir. Başka bir çalışmada klinik önemi olan kan izolatlarında %60, kontaminantlarda ise %73 oranında slime pozitifliği saptanmıştır (18). Bu çalışmada *S.warneri* suşları hariç, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.hominis* suşlarında da slime pozitifliği tespit edilmiştir. Ponce ve ark. (19), slime pozitifliğini *S.epidermidis* suşlarında %73, *S.hominis* suşlarında %57 ve *S.haemolyticus* suşlarında %67 olarak bulunurken *S.warneri* suşlarında bulamamışlardır. Akova ve ark. (20), izole ettikleri KNS suşlarında belirledikleri slime faktör sıklığı arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. KNS suşları üzerinde yapılan başka bir çalışmada, 192 suşun 158'inde (%82.29) *S.epidermidis*, çoğunlukla idrar örneklerinden olmak üzere 30'unda (%15.62) *S. saprophyticus* izole edilmiş, *S. epidermidis* suşlarının 77'si (48.7%) ve *S. saprophyticus* suşlarının 8'i (26.6%) slime faktör ürettiği belirlenmiştir (21). Kaymakçı ve Özbal (22) tarafından yapılan çalışmada KNS'lerin %49.7'si *S.epidermidis*, %24.7'si *S.haemolyticus*, %10.9'u *S.hominis*, %7.5'i *S.warneri*, %6.7'si *S.saprophyticus*, %2.5'i *S.lugdunensis*, %2.1'i *S.auricularis*, %1.7'si *S.cohnii* ve %0.4'ü *S.schleiferi* olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda *S.epidermidis* dışı KNS izolatların içinde en sık olarak % 48.7 oranında *S.hominis* belirlendi. *S.haemolyticus* ve *S.xylosus* ise ikinci sıklıkta, %17.3 oranlarında izole edilen türlerdi. Önemli bir üropatojen olan *S.saprophyticus* ve *S.simulans* %3.3, *S.lentus* %2.6,*S.warneri* ile *S.chromogenes* %2.1'inde izole edildi. *S.eguorum*, *S.capitis*, *S.cohnii* daha az sıklıkta izole edilen türlerdir. *S.eguorum* ile *S.capitis* %1.3,*S.cohnii* ise %

0.7'sinde belirlendi. Anaerop bir tür olan *S.saccharolyticus*, aerop ortamda çok geç ve zayıf ürettiği için, bu çalışmada kullanılan 24 saatlik aerop kültürlerden elde edilmesi beklenmedi ve tanımlaması planlanmadı. Bu bulgular, tür düzeyinde yapılan çalışmaları desteklemektedir.

KNS'ler yüksek oranda metisiline karşı direnç geliştirmiş ve antimikrobiallere karşı diğer bakterilere oranla hızla direnç kazanarak antibiyotiklerden etkilenmeyen bakteriler haline dönüşmüşlerdir (23,24). ABD'de, ulusal nozokomiyal enfeksiyon sürveyans çalışma (NNIS-National Nosocomial Infections Surveillance Report System) verilerine göre; 2004 yılı boyunca elde edilen KNS izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle ile metisilin dirençliliği YBÜ'lerde %76.6, YBÜ dışı kliniklerde ise % 65.7 oranlarında bulunmuş ve toplum kökenli KNS izolatlarında ise metisilin direncinin %50.2 olduğu bildirilmiştir (25). Sık kullanılan 15 antibiyotik uygulanarak 192 KNS klinik izolat ile yapılan antibiyotik duyarlılık testinde, 192 KNS suşun 174'ünde (%90.6) penisiline, 40'ında (% 20.8) metisiline, 89'unda (%46.3) gentamisine, 56'sında (%29.2) eritromisine dirençli ve 192 suşun tamamı vankomisine duyarlı bulunmuştur (21). Khadri ve Alzohairy (26) tarafından yapılan çalışmada izole edilen 71 KNS suşun 28'i metisiline dirençli bulunmuş, metisiline dirençli bulunan 28 suşun 26'sı (%93.0) penisiline, 21'i (%76.0) eritromisine, 19'u (%69.0) gentamisine dirençli ve metisiline dirençli olan 28 KNS suşunun tamamı vankomisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Portekiz'de 2010 yılında yapılan başka bir çalışmada izole edilen 35 KNS suşun 16'sı Co-trimoksazole, 25'i siprofloksasine, 19'u klindamisine dirençli bulunmuştur (27).

Çavuşoğlu ve ark.(28)'nin 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada; kan kültürlerinden elde edilmiş 293 stafilkok izolatın 96'sı (%32) KNS olarak belirlenmiş ve bunlardan %82.3'ünün metisiline dirençli bulunmuştur. Yüce ve ark. (29)'nin 3,5 yıllık kan kültürü sonuçlarının değerlendirildiği çalışmalarında elde edilen KNS izolatlarının metisilin direnci %56 olarak saptanmıştır. Doğruman ve ark. (30)'nin 2005 yılında yaptığı bir çalışmada; kan kültürlerinde elde edilen 234 stafilkok suşun

214'ü (%93) KNS olarak belirlenmiş ve bu 214 KNS izolatların %61.5'inde metisiline dirençli olduğu görülmüştür.

Doğan ve ark.(31)'nin aynı yıl yaptığı diğer bir çalışmada; kan kültürünün yanına diğer klinik örneklerden de üretilen stafilocokların eklenmesiyle toplam 403 stafilocok izolatın 336'sı (%83.3) KNS olarak belirlenmiş, bu 336 KNS izolatın 182'sinde (%54.2) metisilin direnci saptanmıştır.

Kan dolaşımı enfeksiyonlarından sorumlu KNS'ler, diğer klinik örneklerden soyutlanan KNS'lere oranla metisilin direnci daha yüksek bulunmuştur. Türkiye genelinde KNS'lerde 2003-2004 yıllarında belirlenen metisiline direnç oranı %50'dir (32).

Qu ve ark. (33) tarafından yapılan bir araştırmada, koagülaz-negatif stafilocokkal klinik izolatların çoğu penisiline (%100), gentamisine (%83.3) ve oksasiline (%91.7) dirençli; vankomisine (%100), siprofloksasine (%100) ve rifampisine (%79.2) duyarlı olduğu ve biofilm oluşması durumunda da benzer sonuçlar alındığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, *S.epidermidis* dışında diğer KNS'lerden *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *S.xylosus*, *S.warneri*, *S.lentus* ve *S.chromogenes* türlerinin % 46.1-%76.9'u ampicillin-sulbaktam, sefazolin ve metisiline; *S.warneri*, *S.saprophyticus* ve *S.simulans* türlerinin %100'ü gentamisine; *S.xylosus* ile *S.saprophyticus*'un %100'ü novobiosine, bütün türlerin %33.3-%66.7'si sefazoline, % 33.3-%100'ü eritromisine, %20.0-%72.6'sı trimetoprim-sülfametoksazola dirençli; *S.simulans* ampicillin-sulbaktam, sefazolin ve metisiline, *S.chromogenes* gentamisine, *S.xylosus* dışında izole edilen bütün türler teikoplanin ve vankomisine, *S.xylosus* ile *S.saprophyticus* dışında bütün türler novobiosine duyarlı bulundu.

Tiplendirilen fakat sayılarının az olması nedeniyle tabloya eklenmeyen 2 *S.egorume*'nin 2'si de ampicillin-sulbaktam, sefazolin, klindamisin, eritromisin ve metisiline; 2 *S. capitis*'in 1'i ampicillin-sulbaktam, sefazolin, klindamisin, eritromisin ve metisiline ve 1'i *S. cohnii* ise ampicillin-sulbaktam, sefazolin, klindamisin, eritromisin, metisilin ve

novobiosine dirençli idi.

S.epidermidis dışında KNS'lerin bazı antibiyotiklere direnci yüksek oranda bulunmuştur. Bulgularımız genelde yerli ve yabancı kaynaklarla özellikle Mohan ve ark. (21)'inin bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Bir adet *S.xylosus*'un vankomisine dirençli bulunması dışında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Gerçek koagülaz negatif stafilocokkal enfeksiyonların kontaminasyonlardan ayırt edilmesi tedaviyi yönlendirmede önemlidir (34). KNS'ler, bakteriyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen bakteri gruplarından. Antibiyotiklere direnç oranların yüksek olması nedeniyle KNS enfeksiyonlarında tür düzeyinde tanımlama ve uygun antibiyotik seçimi için antibiyogram testi yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Sharon JP. *Staphylococcus*. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections 10E Priad V J Mahy and Volker Ter Meulen (Eds), Edward Arnold Pub; 2006; p. 771-831.
2. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically*, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clin. Microbiol.* 8th ed, ASM Press, Washington DC, 2003; p.384-404.
3. Archer GL and Climo MW. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994; 38: 2231-2237.
4. Renenberg J, Rieneck JK, Gutschik E. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol*, 1995; 33:1150-53.

5. Poulsen AB, Skov R, Pallesen LV. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *J Antimicrob Chemother*, 2003; 51: 419-421
6. Overman TL and Overley JK. Reproducibility of API Staph-Ident system identifications of coagulase-negative staphylococci isolated from blood. *J Clin Microbiol*. 1990; 8: 2585-2586.
7. Bauer AU, Kirby WM, Sherris JC, Tarck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *J Clin Pathol*, 1966; 45: 493-494.
8. Gatermann S, John J, Marre R. *Staphylococcus saprophyticus* urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats. *Infect Immun*, 1989; 57: 110-6.
9. Baldassarri L, Doneli G, Gelosia A, et al. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect Immun*, 1996; 64: 3410-5.
10. Yazgı H, Ayyıldız A, Aktaş AE, et al. Bölgede çeşitli klinik örneklerden soyulanan *Staphylococcus* suşlarının "slime faktör ve protein A" yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 1997; 27:10-3.
11. Bouza E, San Juan R, Munoz p et al. Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin Microbiol Infect*, 2004; 10: 838-842.
12. Meriç M, Wilke A, Çağlayan C, Toker K. Intensive care unit-acquired infections: incidence, risk factors and associated mortality in a Turkish university hospital. *Jpn J Infect Dis*, 2005; 58: 297-302.
13. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 2004; 39(3): 309-17.
14. Raad I, Kassar R, Ghannam D. et al. Management of the catheter in documented catheter-related coagulase-negative staphylococcal bacteremia: Remove or retain? *CID*, 2009; 49: 1187-97
15. De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 1219-24.
16. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985; 22: 996-1006.
17. Jones JW, Scott RCD, Morgan J, Pether JVS. A study of coagulase negative staphylococci with reference to lime production, adherence, resistance patterns and clinical significance. *J Hospital Infection*, 1992; 22: 217-227.
18. Cheistensen GD, Parisi JT, Parisi AL, et al. Characterization of clinically significant strains of coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 1983; 18: 258-269.
19. Ponce J, Leons S, Guentner SH, Wenzel RP. Microbiologic studies of coagulase negative staphylococci isolated from patients with nosocomial bacteraemias *J Hospital Infection*, 1986; 7: 121-129.
20. Akova M, Gür D, Akalın HE, Baykal M. Klinik önemi olan *Staphylococcus epidermidis* suşlarının saptanmasında slime testinin yeri. *İnfeksiyon Derg*, 1989; 3: 321-326.

21. Mohan U, Jindal N, Aggarwal P, Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase negative staphylococci isolated from various clinical specimens. *Indian J Medical Microbiol*, 2002; 20: 45-46.
22. Kaymakçı G ve Özbal Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocokların biyokimyasal özelliklerine göre tiplendirilmesi, *İnfeksiyon Derg*, 1997; 11:107-111.
23. Katayama Y, Takeuchi F, et al. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcus cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2003; 185: 2711-2722.
24. Fang H, Hedin G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 2894-2899
25. Anon. 9. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*, 2004;32:470-85.
26. Khadri H. and Alzohairy M. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant and coagulase-negative staphylococci in a tertiary care hospital in India. *Int J Medicine and Medical Sci*. 2010; 2: 116-120
27. Fajardo Olivares M, Hidalgo Orozco R, Rodríguez Gutierrez S, et.al. Activity of daptomycin, ciprofloxacin, clindamycin and cotrimoxazole against coagulase-negative *Staphylococcus* strains with diminished susceptibility to vancomycin, *Rev Esp Quimioter*, 2010;23:81-86
28. Çavuşoğlu C, Badak Z, Tünger A, et al. Kan kültürlerinden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok izolatlarının fusidik aside in vitro duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg*, 1998; 12: 467-470.
29. Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, et al. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. The microorganisms isolated from blood samples and their susceptibility to antibiotics. *ANKEM Derg*. 2005; 19: 17-21.
30. Doğruman F, Akça G, Sipahi B, Sultan N. Kan örneklerinden soyutlanan stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları. *ANKEM dergisi*, 2005; 19: 14-16.
31. Doğan Ö, Çırak M, Engin D, Türet S. Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 2005; 19:39-42.
32. Derbentli Ş. Stafilocoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM Derg*, 2005; 19: 54-60.
33. Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilmformation, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2010; 9: 16-21.
34. Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating culture samples representing coagulase- negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods, *J Clin Microbiol*, 2009; 47: 3255-3260.