

# *Staphylococcus aureus* suşlarında koagulaz testi için uygun sıcaklığın araştırılması

## Investigation of optimum temperature for coagulase test in *Staphylococcus aureus* strains

Birgül KAÇMAZ<sup>1</sup>, Serdar GÜL<sup>1</sup>, Doğan Barış ÖZTÜRK<sup>2</sup>, Emine ECEMİŞ<sup>1</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Mikrobiyoloji laboratuvarında etüvün ısısı önemlidir. Bakterilerin üretilmesinde ve antimikrobiyal duyarlılığının saptanmasında genellikle önerilen etüv ısısı 35±2 °C'dir. Bununla birlikte *Staphylococcus aureus* suşlarında doğru bir şekilde metisilin direncinin saptanmasında 35 °C'nin üzerinde etüv ısısının uygun olmadığı, 35 °C'de metisilin direncinin doğru saptanamayacağı bilinmektedir. *S. aureus*'un tanımlanmasında kullanılan tüp koagulaz testinin yapılmasında önerilen etüv ısısı farklı kaynaklarda 35 °C, 37 °C ve 35 °C - 37 °C olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada *S. aureus* suşlarında tüp koagulaz testi için en uygun etüv ısısı araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Bu çalışma hastanemiz Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Bakterilerin tanımlanmasında VITEK 2 otomatize sistem kullanılmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 110 *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüp koagülaz testi için tavşan plazması kullanılmış, test üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Her bakteri için iki ayrı koagulaz tüpü hazırlanmış, tüpler ayrı ayrı 35 °C ve 37 °C'ye ayarlanmış iki farklı etüvde inkübe edilmiştir. Birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve 24. saatin sonunda tüpler pıhtı oluşumu için değerlendirilmiştir. Sonuçlar üç grupta değerlendirilmiştir.

Grup 1: Pıhtı oluşumu gözlenmeyen

Grup 2: Zayıf pıhtı oluşumu gözlenen

Grup 3: Güçlü pıhtı oluşumu gözlenen

Verilerin analizi için SPSS 15.0 programı ve grupların karşılaştırılması için de McNemar Bowker testi kullanılmıştır.

### ABSTRACT

**Objective:** Temperature of the incubator is important in microbiology laboratories. The recommended temperature is generally 35±2 °C for the detection of growing and antimicrobial susceptibility of bacteria. Nevertheless it is known that temperature over 35 °C is inappropriate for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. In different references, the optimum temperature for tube coagulase test used for differentiating *S. aureus* from other staphylococci is recommended as 35 °C, 37 °C, and 35 °C - 37 °C. In this study it was aimed to investigate the most appropriate incubator temperature for tube coagulase test in *S. aureus* strains.

**Methods:** The study was conducted in Infectious Diseases Laboratory of our hospital. VITEK 2 automated system was used for identification of bacteria. Totally 110 *S. aureus* strains isolated from various clinical samples were included in the study. Rabbit plasma was used for tube coagulase test and the test was performed according to the manufacturer's instructions. Two identical sets of tubes were prepared for each strain and each tube was incubated at 35 °C and 37 °C in different incubators. All the tubes were read at the end of first, second, third, fourth and 24th hour for clot formation. Results were evaluated in three groups.

Group 1: No clot formation

Group 2: Weak clot formation

Group 3: Strong clot formation

SPSS 15.0 program was used for data analysis and McNemar Bowker test was used for comparing groups.

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, KIRIKKALE

<sup>2</sup> Ulucanlar Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Serdar GÜL

Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hast. ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, KIRIKKALE

Tel : +90 505 925 51 44

E-posta / E-mail : serdargul@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 04.12.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 25.02.2015

**Bulgular:** Suşların hepsi her iki etüv derecesinde de test süresince pıhtı oluşturmuştur. Bakterilerin zamana göre 35 °C ve 37 °C’de pıhtı oluşturma durumları değerlendirilmiştir. Sonuçların karşılaştırılması amacıyla yapılan istatistiksel değerlendirmede inkubasyon sıcaklıkları ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmanın sonuçlarına dayanarak hem 35 °C ve hem de 37 °C’nin *S. aureus* suşlarında koagulaz saptanmasında uygun olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, tüp koagulaz test, sıcaklık

**Results:** All of the strains had clot formation at both of the incubator temperatures during test period. The clot formation degree of strains were examined at 35 °C and 37 °C according to time. The statistical analysis showed no significant differences between incubation temperatures and groups.

**Conclusion:** According to the results obtained in this study, both 35 °C and 37 °C was found appropriate for determining coagulase positivity in *S. aureus*.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, tube coagulase test, temperature

## GİRİŞ

Koagulaz testi *Staphylococcus aureus*’u diğer stafilokok türlerinden ayırmada kullanılan önemli ve uygulaması kolay bir yöntemdir. Stafilokok olduğu düşünülen, Gram boyamasında gram olumlu koklar saptanan ve katalazı pozitif olan tüm izolatlarda yapılmalıdır. Koagulaz testi, Lam testi ve tüp testi olarak iki temel yöntem ile yapılır. Lam testi ile bağlı koagulaz (kümeleştirme faktörü= clumping factor) saptanmaktadır. Bu yöntemde; bakteri yüzeyindeki kümeleştirme faktörü, plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırıp stafilokokların kümelenmesine neden olur. Tüp testinde ise stafilokokların besiyerine saldıkları bağımsız koagulaz araştırılır. Bu enzim niteliğindeki madde, plazmada bulunan bir faktör ile (koagulaz reaksiyon faktör) ilişki kurar ve fibrinojeni pıhtılaştırır. Tüp testinde stafilokok olduğu düşünülen kolonilerden birkaç tane alınarak tüpe konulan plazma içinde ezilerek emülsiyon haline getirilir. Tüpler 35 °C - 37 °C’lik etüve yerleştirilir, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde pıhtı oluşup oluşmadığına bakılır (1). Testin ilk dört saatlik uygulaması sırasında etüvün sıcaklık derecesinin farklı kaynaklarda 35 °C, 37 °C, 35 °C - 37 °C derece olarak belirtildiği gözlenmektedir (2 - 5). İlk dört saatte pıhtı gözlenmeyen tüplerde gecikmiş koagulaz aktivitesinin varlığını araştırmak için tüpün oda ısısında 24. saate kadar inkübe edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada *S. aureus*

tanımlamasında kullanılan koagulaz testi için en uygun etüv sıcaklığının araştırılması amaçlanmış, 35 °C ve 37 °C arasında fark olup olmadığı değerlendirilmiştir.

## GEREÇ YÖNTEM

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen VITEK 2 (bioMerieux, St. Louis, Missouri, USA) otomatize sistem ile metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak tanımlanan 110 suş çalışmaya alınmıştır. Bakterilerin koagulaz aktivitelerinin saptanmasında tavşan plazması (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen bakteri izolatlarının koyun kanlı agar besiyerine tek koloni pasajları yapılmıştır. Takiben 35 °C - 37 °C’de kalibre edilmiş etüvlerde 18 saat inkübe edilmişlerdir. Test sırasında steril vida kapaklı cam tüplere, ticari firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılmış tavşan plazmasından 0,5’er ml dağıtılmıştır. Teste alınan her bir bakteri izolatu için plazma içeren iki ayrı tüp kullanılmıştır. Taze pasajı yapılan bakteri izolatlarının herbirinden 3-5 koloni alınıp içinde tavşan plazması bulunan farklı test tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin biri 35 °C’de diğeri ise 37 °C’de inkübe edilmiştir. Tüpler, pıhtı oluşumu açısından birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve 24. saatlerin sonunda incelenmiştir.

Test sonuçlarının değerlendirilmesi ve yorumlanmasında; üç temel grup dikkate alınmıştır.

Grup 1: Pıhtı oluşumu saptanmayan,

Grup 2: Zayıf pıhtı oluşumu saptanan,

Grup 3: Güçlü pıhtı oluşumu saptanan,

Çalışmada *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif, *S. epidermidis* ATCC 12228 suşu da negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Grupların karşılaştırmasında McNemar-Bowker testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## SONUÇLAR

Tüpler birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatin sonunda farklı sıcaklık derecelerine ayarlanmış etüvlerden çıkarılmış ve pıhtı oluşumu açısından değerlendirilmiştir. *S. aureus* suşlarında geç koagülaz aktivitesi gözlenebileceği için henüz tanımlanmamış ancak stafilkok olduğu düşünülen, ilk dört saatte koagülaz negatif olan suşlarda gecikmiş koagülaz aktivitesinin araştırılması gereklidir. Bu nedenle

**Tablo 1.** Bakterilerin birinci saatte 35 °C ve 37 °C'de pıhtı oluşturma durumları

		37 °C			Toplam
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	
35 °C	Grup 1	86	3	1	90
	Grup 2	3	15	2	20
	Grup 3	0	0	0	0
Toplam		89	18	3	110

**Tablo 3.** Bakterilerin üçüncü saatte 35 °C ve 37 °C'de pıhtı oluşturma durumları

		37 °C			Toplam
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	
35 °C	Grup 1	6	2	0	8
	Grup 2	5	14	9	28
	Grup 3	1	6	67	74
Toplam		12	22	76	110

P= 0.410

dördüncü saatin sonunda pıhtı oluşumu gözlenmeyen tüpler etüvden çıkarılarak oda ısısında bekletilmiş, 24. saatin sonunda değerlendirilmeye alınmıştır. Suşların hepsinde pıhtı oluşumu farklı zamanlarda (birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve 24. saatin sonunda) gözlenmiştir.

Bakterilerin belirlenen saatlerin sonunda 35 °C ve 37 °C'deki pıhtı oluşturma durumları Tablo 1, 2, 3 ve 4'te verilmiştir. Sonuçların karşılaştırılması amacıyla yapılan istatistiksel değerlendirmede birinci saat dışındaki inkubasyon sıcaklıkları ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Birinci saatte 35 °C'de grup 3 olarak değerlendirilecek suş olmadığı için istatistik uygulanamamıştır.

## TARTIŞMA

Mikrobiyoloji laboratuvarında bakterilerin üretilmesi ve antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması sırasında kullanılan etüvün ısı önemli bir faktördür. Önerilen etüv ısı derecesi  $35 \pm 2$  °C olmasına rağmen stafilkoklarda metisilin direncinin

**Tablo 2.** Bakterilerin ikinci saatte 35 °C ve 37 °C'de pıhtı oluşturma durumları

		37 °C			Toplam
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	
35 °C	Grup 1	18	9	1	28
	Grup 2	12	21	6	39
	Grup 3	3	9	31	43
Toplam		33	39	38	110

P= 0.566

**Tablo 4.** Bakterilerin dördüncü saatte 35 °C ve 37 °C'de pıhtı oluşturma durumları

		37 °C			Toplam
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	
35 °C	Grup 1	4	1	0	5
	Grup 2	1	16	4	21
	Grup 3	2	13	69	84
Toplam		7	30	73	110

P= 0.080

35 °C'de saptanabileceği, bu derecenin üzerindeki ısıda metisilin direncinin saptanamayacağı bilinmektedir (6, 7). Buna benzer olarak *Neisseria gonorrhoeae*'de de doğru antibiyotik duyarlılığının saptanmasında önerilen etüv ısı 36 ± 1 °C olmalı, 37 °C'yi aşmamalıdır (7).

*S. aureus*'ta koagülaz saptanmasında ise yapılan çalışmalarda etüv ısı 35 °C veya 37 °C olacak şekilde kullanılmıştır. *S. aureus*'ta koagülaz saptanmasında etüv ısı Manual of Clinical Microbiology kitabında 37 °C, Bailey ve Scott's Diagnostic Microbiology kitabında ise 35 °C olarak yazılmıştır (3, 4). Tavşan plazmasını üreten üretici firmanın kullanım kılavuzunda tüplerin 35 °C - 37 °C'de inkübe edilebileceği belirtilmiştir. Bu iki ısıda koagülaz oluşumu için bir farklılık olup olmadığı bilinmemektedir. Bu konuda literatürde herhangi

bir bilgiye rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda her iki ısı derecesi de kullanılmıştır (8 - 11).

Metisilin dirençli suşlarda lam koagülaz aktivitesinin zayıfladığı bilinmektedir. Bu suşlarda tüp koagülaz testinin etkilendiğine dair bir veri bulunmamaktadır (12, 13). Bu çalışmada sadece MSSA suşları kullanılmış, bu suşların koagülaz oluşumu 35 °C ve 37 °C'ye ayarlanmış iki farklı etüvde değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında iki etüv ısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bakterinin tüp koagülaz testinde değerlendirilmesinde etüv ısısının 35 °C ve/veya 37 °C olmasının koagülaz oluşumu üzerine bir etkisi olmadığı görülmüştür. Her iki ısının da *S. aureus* suşlarında koagülaz testinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Coagulase test. National Standart Method, Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training, 2010; 6-11.
2. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2010; 9(1): 23-30.
3. Kloos WE, Bannerman TL. Staphylococcus and Micrococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. Washington, ASM press, 2005: 264-82.
4. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Twelfth edition. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007.
5. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı. İzmir: Barış Yayınları Tıp Fakülteleri Kitabevi, 2009.
6. Thornsberry C, Caruthers JQ, Baker CN. Effect of temperature on the in vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob Agents Chemother, 1973; 4 (3): 263-9.
7. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, CLSI, Wayne, PA, (2013).
8. Rubin JE, Bayly MK, Chirino-Trejo M. Comparison of dog and rabbit plasmas in the tube coagulase test for *Staphylococcus aureus*. J Vet Diagn Invest, 2010; 22(5): 770-1.
9. Carretto E, Bardaro, Russello G, Mirra M, Zuelli C, Barbarini D. Comparison of the Staphylococcus Quick FISH BC Test with the Tube Coagulase Test Performed on Positive Blood Cultures for Evaluation and Application in a Clinical Routine Setting. J Clin Microbiol, 2013; 51(1): 131-5.
10. Cooke RPD, Jenkins CT. Comparison of commercial slide agglutination kits with a tube coagulase test for the rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture. J Clin Pathol, 1997; 50(2): 164-6.
11. Gültaş N, Bayrakal V, Bahar İ. H. Gentamisin Etkisi Altındaki *Staphylococcus aureus* Suşlarının Biyofilm ve Koagülaz Yanıtları ile Mikroçevre İlişkisinin Değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul, 2013; 47(1): 19-26.
12. Roberts J, Gaston MA. Protein A and coagulase expression in epidemic and non-epidemic *Staphylococcus aureus*. J Clin Pathol, 1987; 40(8): 837-40.
13. Dickson JI, Marples RR. Coagulase production by strains of *Staphylococcus aureus* of differing resistance characters: a comparison of two traditional methods with a latex agglutination system detecting both clumping factor and protein A. J Clin Pathol, 1986; 39(4): 371-5.