

**BİYOMALZEME YÜZEYLERİNDEN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE  
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA  
VİRÜLANS GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI\***

INVESTIGATION OF THE VIRULENCE GENES IN METHICILLIN-RESISTANT  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM  
BIOMATERIAL SURFACES

**Mert SUDAĞIDAN<sup>1</sup>, Cengiz ÇAVUŞOĞLU<sup>2</sup>, Feza BACAĞOĞLU<sup>3</sup>**

**ÖZET:** Stafilokoklar, biyomalzeme kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Bu çalışmada, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde yatan 48 hastada kullanılan polimerik biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli 11 *Staphylococcus aureus* suşunda virülans genlerinin varlığının saptanması ve bunların bazılarının fenotipik ifadelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile özgül primerler kullanılarak, bağlanma ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler (*icaA*, *icaC*, *bap*), metisilin direnç geni (*mecA*), enterotoksin A-E üretiminden sorumlu genler (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), toksik şok sendromu toksini geni (*tst*), eksfoliyatif toksin A ve B genleri (*eta* ve *etb*), alfa ve beta-hemolizin genleri (*hla* ve *hlb*), stafilokokal ekzotoksin benzeri protein-1 geni (*set1*), proteaz genleri (*sspA*, *sspB*, *aur*, serine proteaz geni), lipaz geni (*geh*) ve regülatör genler (*sarA* ve *agrCA*) araştırılmıştır. Ayrıca suşların fenotipik olarak biyofilm oluşturma, antibiyotik duyarlılık, proteaz ve lipaz üretimi gibi özellikleri de değerlendirilmiştir. Biyofilm testlerinde, biyofilm yapan ve "slime" üreten suşlara rastlanmamış, ancak tüm suşların biyofilm yapımında rol oynayan *icaA* genine sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte biyofilm yapımında rol oynayan *icaC* ve *bap* genleri tespit edilememiştir. Tüm suşlarda *mecA* geninin varlığı saptanmış ve suşların hepsinin oksasilin, penisilin G ve gentamisine; 10'unun eritromisine ve dokuzunun da ofloksasine dirençli olduğu bulunmuştur. İzolatların tümü vankomisin, teikoplanin ve ko-trimoksazole duyarlı olarak saptanmıştır. Ekzotoksin ve regülatör genlerinin taranması sonucunda, suşların *sea*, *set1*, *hla*, *hnb* ve *sarA* genlerini taşıdığı belirlenmiştir. PCR ile tüm suşların, çalışılan bütün proteaz genlerine (*sspA*, *sspB*, *aur* ve serin proteaz geni) sahip olduğu görülmüş, ancak sütlü (skim milk ve milk agar) ve kazein agarlarda yapılan proteaz üretimi testlerinde negatif sonuç alınmıştır. Lipaz üretiminin belirlenmesi için Tween 20, Tween 80 ve tributyrin içeren besiyerleri kullanılmış ve tüm suşlarda geç dönemde (inkübasyonun üçüncü günü) pozitif sonuç alınmasına karşın, izolatların hiçbirisinde lipaz üretiminden sorumlu *geh*

\*Bu çalışma kısmen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projesi (2003\YTE01) tarafından desteklenmiştir.

<sup>1</sup> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı, İzmir. (msudagidan@yahoo.com.tr)

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

geni bulunmamıştır. Sonuç olarak, biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen *S.aureus* suşlarında, araştırılan virülans genlerinden bazılarının varlığı saptanmış, ancak bunların tam olarak fenotipe yansımadağı izlenmiştir. İzolat sayısının azlığına ve tüm genlerin ekspresyonlarının fenotipik olarak çalışılmamış olmasına rağmen, bu genlerin varlığının yoğun bakım hastaları için potansiyel bir risk teşkil edebileceğı düşünölmüştür.

*Anahtar sözcükler: Biyomalzeme, metisiline dirençli Staphylococcus aureus, biyofilm, virülans genleri, proteaz, lipaz.*

**ABSTRACT:** Staphylococci are the most important agents of nosocomial infections originating from biomaterials. The aim of this study was to investigate the presence of virulence genes and their phenotypic expressions in 11 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the surfaces of clinically used biomaterials of 48 thoracic intensive-care unit patients. By the use of specific primers, the presence of genes encoding the attachment and biofilm production (*icaA*, *icaC*, *bap*), methicillin resistance (*mecA*), enterotoxins A-E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), exfoliative toxins A and B (*eta* and *etb*), alpha- and beta-hemolysins (*hla* and *hly*), staphylococcal exotoxin-like protein-1 (*set1*), proteases (*sspA*, *sspB*, *aur*, serine protease gene), lipase (*geh*) and the regulatory genes (*sarA* and *agrCA*) were investigated by polymerase chain reaction (PCR). The phenotypic properties of the isolates such as biofilm formation, antibiotic susceptibility, extracellular protease and lipase production were also evaluated. None of the isolates were found to be biofilm and/or slime producers, however, all strains were found to have *icaA* gene which is responsible for biofilm formation. Nevertheless the presence of *icaC* and *bap* genes that are also responsible for biofilm formation were not detected. All the strains have had *mecA* gene and were resistant to oxacillin, penicillin G and gentamicin, while 10 were also resistant to erythromycin and nine were also resistant to ofloxacin. The isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin and co-trimoxazole. Screening of toxin and regulatory genes revealed that all the strains harboured *sea*, *set1*, *hla*, *hly* and *sarA* genes. The phenotypic tests for the determination of extracellular protease production revealed that all the strains formed very weak zones on skim milk and milk agar plates, and yielded negative results on casein agar plates. Furthermore, all strains were found to harbour *sspA*, *sspB*, *aur* and serine protease genes. Tween 20, Tween 80 and tributyrin containing media were used to detect lipase production and all strains gave late-positive results (on the third day of incubation), although they all lacked for lipase gene (*geh*). As a result, *S.aureus* strains isolated from biomaterial surfaces yielded positivity for some of the tested virulence genes, of which some of them have not been expressed phenotypically. Although there were some limitations in the study, it could be concluded that the presence of these virulence genes in *S.aureus* strains might be considered as potential threats especially in intensive care unit patients.

*Key words: Biomaterial, methicillin-resistant Staphylococcus aureus, biofilm, virulence genes, protease, lipase.*

## GİRİŞ

Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olan *Staphylococcus aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (folikülit, karbonkül, impetigo, mastit), yaygın enfeksiyonlar (osteomyelit, endokardit, pnömoni) ve toksijenik enfeksiyonlara (toksik şok sendromu, septik şok, soyulmuş deri sendromu, besin zehirlenmeleri) yol açmaktadır<sup>1</sup>. Stafilokokların önemli virülans faktörleri arasında ekstraselüler enzim ve toksin üretimi, antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu sayılabilir.

*S.aureus* vücut içerisinde kullanılan biyomalzeme yüzeylerine tutunma ve burada biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu durum, *S.aureus* suşlarının biyomalzeme kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlarda *S.epidermidis* ile birlikte sıkça görülmesine neden olmaktadır. Stafilokokların biyofilm yapımında, *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit adhesin (PIA) antijeni önemli rol oynamaktadır<sup>2</sup>. Bunun yanı sıra yüzey proteini olan Bap, *S.aureus* suşlarının yüzeylere tutunmasında görev almaktadır<sup>3</sup>.

*S.aureus*'un antibiyotik direnci de son yıllarda büyük sorun oluşturmaktadır. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları beta-laktam antibiyotiklere karşı da dirençlidir ve bu özellik kromozomda bulunan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca, 1996'dan itibaren MRSA suşlarının vankomisine karşı duyarlılıkları azalmış ve vankomisin dirençli (MİK $\geq$ 32  $\mu$ g/ml) suşlar da rapor edilmeye başlanmıştır<sup>4</sup>.

Bilindiği gibi stafilokok enfeksiyonlarında, bakterinin salgıladığı toksin ve enzimlerin önemli rolü vardır. Bunlar arasında yer alan enterotoksinler, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* genleri tarafından kodlanırken, toksik şok sendromu (Toxic Shock Syndrome; TSS) toksini *tst* geni tarafından, haşlanmış deri sendromu (Scalded Skin Syndrome; SSS)'na yol açan eksfoliyatif toksin A ve B ise *eta* ve *etb* genleri tarafından kodlanmaktadır<sup>1,5,6</sup>. Suda çözünür yapıda olan ve endotel hücrelerinin, monositlerin ve trombositlerin hücre membranında por oluşumuna neden olan alfa-hemolizin ekzotoksininin kodlanmasından da *hla* geni sorumludur<sup>7</sup>. *Hlb* geni tarafından kodlanan beta-hemolizin ise sfingomiyelini parçalayarak başta insan eritrositleri olmak üzere birçok hücre üzerinde toksik etki göstermektedir<sup>8</sup>. Son yıllarda, *S.aureus* genomunda yer alan ve TSS toksini ile diğer ekzotoksinlere amino asit dizi benzerliği gösteren ekzotoksin benzeri protein genlerinin (*set1-set5*) varlığı da rapor edilmiştir<sup>9</sup>. Klonlanan *set1* geninin insan periferik kan mononükleer hücrelerinden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  üretimini artırdığı görülmüştür<sup>9</sup>.

*S.aureus* suşları tarafından hücre dışına salınan proteazlar ise konağın immün sistemi ile etkileşime girerek enfeksiyon gelişiminde önemli rol oynarlar. En önemli hücre dışı proteazlar arasında, stafilokokal serin proteaz (V8 proteaz; *sspA* geni tarafından kodlanır), metalloproteaz (aurolizin; *aur* geni tarafından kodlanır) ve sistein proteaz (*sspB* geni tarafından kodlanır) sayılabilir<sup>10</sup>. Hücre dışına salınan proteazlar, "accessory gene regulator" (*agr*) geni tarafından pozitif olarak kontrol edilirken, "staphylococcal accessory regulator" (*sarA*)

geni tarafından negatif olarak kontrol edilmektedir<sup>11</sup>. Stafilokokal lipaz enzimi de bu bakteri için önemli virülans faktörleri arasındadır ve *geh* geni tarafından kodlanmaktadır<sup>12,13</sup>.

Bu çalışmanın amacı, hastanede yatan hastalarda sıklıkla kullanılan polimer biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen *S.aureus* suşlarında virülans genlerinin varlığının saptanması ve bunların bazılarının fenotipik ifadelerinin araştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Örnekler ve Suşlar:** Çalışmaya, Aralık 2002-Kasım 2003 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde yatan 48 hastada kullanılan polimer biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli 11 *S.aureus* suşu dahil edildi.

Polimer biyomalzemelerin orta kısımlarından 3-4 cm uzunluğunda kesilerek alınan örnekler steril fosfatlı tampon (PBS, pH: 7.0) içinde laboratuvara nakledilinceye kadar 4°C'de saklandı. Daha sonra biyomalzemeler beyin-kalp infüzyon (BHI) besiyeri içeren tüplere aktarıldı ve sonikasyon ile (37 kHz'de 45 saniye) yüzeylere tutunan bakterilerin koparılması sağlandı. BHI buyyon içinde 37°C'de üretilen bakteriler kanlı agar besiyerinde saflaştırıldıktan sonra -80°C'de %20 gliserol içinde saklandı. İzolatlar konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ile (Gram boyanma, katalaz, koagülaz ve DNaz) tanımlandı<sup>8</sup>. Tür düzeyinde tanımlama ise ID32 Staph (bioMérieux) ve 16S-ITS rRNA RFLP yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi<sup>14</sup>.

**Biyofilm Testleri:** Suşlarının biyofilm yapma yetenekleri kantitatif olarak mikroplak testi ile belirlendi. Bu amaçla, triptik soy buyyon (TSB) içinde 37°C'de 16 saat üretilen bakteri süspansiyonundan 1 ml alınarak çöktürüldü ve 800 µl PBS ile yıkandı. Daha sonra tekrar 10.000x rpm'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülen bakteriler 500 µl %1 sükroz içeren TSB (TSB+S) ile süspansiyon edildi. 96 çukurlu mikroplaklara 180 µl TSB+S ve 20 µl bakteri süspansiyonu eklenerek 37°C'de 16 saat inkübe edildi. Ertesi gün mikroplak boşaltıldı ve 3 kez 200 µl PBS ile yıkanarak tutunmayan bakteriler uzaklaştırıldı. 60°C'de 1 saat kurutulmuş plak yüzeyine tutunan bakteriler 50 µl kristal viyole ile boyandı ve 5 dakika sonra yıkanarak mikroplak kurutuldu. Çukurların optik dansiteleri (OD) 570 nm'de okutuldu ve OD<sub>570</sub> değeri >0.5 bulunan bakteriler pozitif olarak kabul edildi. Stafilokok suşlarının cam tüp yüzeylerine bağlanmaları ise, tüp yüzeyine tutunan bakterilerin kristal viyole ile boyanmasından sonra görsel olarak belirlendi<sup>15</sup>. İzolatların "slime" üretme yetenekleri, Congo Red Agar (CRA) besiyerinde üretildikten sonra oluşturdukları kolonilerin renklerine göre tayin edildi. Buna göre, siyah koloniler pozitif, kırmızı-pembe koloniler ise negatif olarak kabul edildi<sup>16</sup>.

**Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi:** Stafilokok suşlarının oksasilin, penisilin G, vankomisin, teikoplanin, eritromisin, ofloksasin, gentamisin ve ko-trimoksazole karşı duyarlılıkları agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak CLSI standartlarına göre araştırıldı<sup>17</sup>.

**DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):** Stafilokoklardan genomik DNA izolasyonu daha önce belirtilen protokol üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi<sup>18</sup>. Bu amaçla, 5 ml TSB içerisinde 37°C'de 16 saat üretilen bakterilerden 200 µl alınarak çöktürüldü. Bakteriler 45 µl deiyonize su ile süspansiyon edildi ve 15 µl lizostafin (100 µg/ml, Sigma) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bunu takiben 15 µl proteinaz K (100 µg/ml, Merck) ve 150 µl 0.1 M Tris/HCl (pH: 7.5) eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Son olarak örnekler 5 dakika kaynatıldı ve PCR çalışmaları için -20°C'de saklandı. Tablo 1'de gösterilen genlerin PCR ile araştırılmasında, karşılıklarında verilen primer dizileri kullanıldı. PCR reaksiyonları 5 µl genomik DNA, 5 µl 10× PCR tamponu (750 mM Tris-HCl (pH: 8.8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.1(v/v) Tween 20, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl her bir primer (10 µM), 5 µl dNTP karışımı (0.2 mM her bir nükleotitten) ve 1.2 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) içeren 50 µl hacim içinde hazırlandı. Elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel elektroforez ile 1x TAE tampon çözeltisi kullanılarak analiz edildi.

**Proteaz ve Lipaz Üretiminin Tespiti:** İzolatların proteaz üretme yetenekleri "skim milk agar" [Nutrient agar (NA) + %1 skim milk], kazein agar ve "milk agar" (NA + %10 UHT süt) kullanılarak tespit edildi. Bakterilerin stoktan spotlama yöntemi ile besiyerlerine ekimi yapıldı ve 37°C'de 2-3 gün inkübasyon sonrası "skim milk" ve "milk" agar besiyerlerinde, ekim alanları çevresinde zon oluşumu incelendi. Kazein agar üzerine 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra yüzeyi kaplayacak kadar %1 HCl eklendi ve ekim alanı çevresinde zon oluşumu değerlendirildi.

Lipaz üretiminin tespitinde ise Tween 20, Tween 80 ve tributyrin içeren besiyerleri kullanıldı. Bu amaçla 120°C'de 20 dakika ayrı olarak sterilize edilmiş Tween 20 veya Tween 80, NA içerisine %1 oranında eklendi. Tributyrin agar besiyerine %1 tributyrin ilave edilerek kullanıldı. Lipaz üretiminin tespitinde bakteriler en az üç gün süre ile 37°C'de inkübe edildi. Tween içeren besiyerlerinde, besiyeri içerisine doğru oluşan saçaklı ilerlemeler, tributyrin besiyerinde ise zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

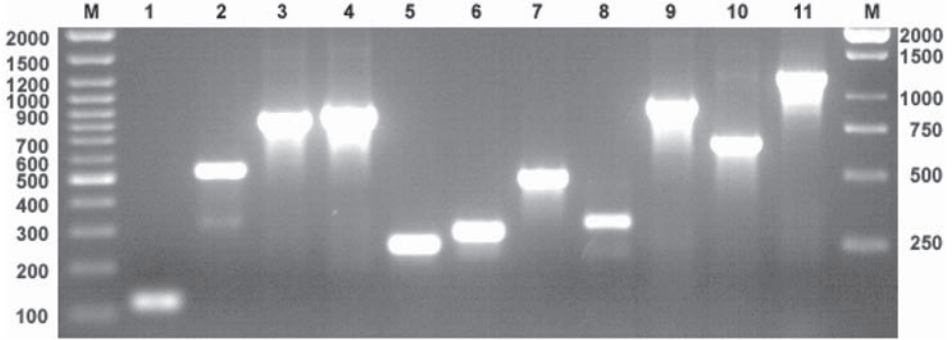
Çalışmaya alınan 11 *S.aureus* suşunun üçü branül, üçü foley sonda, üçü nazogastrik tüp, biri endotrakeal tüp ve biri santral kateter yüzeylerinden izole edilmiştir.

PCR ile yapılan genotipik taramada, hiçbir *S.aureus* suşunun *icaC*, *bap*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tst*, *eta*, *etb* ve *agrCA* genlerine sahip olmadığı; buna karşın tüm suşların *mecA*, *icaA*, *sea*, *hla*, *hly*, *set1* ve *sarA* genlerini taşıdıkları görülmüştür (Tablo 1) (Şekil 1).

Fenotipik özellikler değerlendirildiğinde; mikropalak yöntemi, tüp tutunma testi ve CRA besiyerinde alınan sonuçlara göre hiçbir izolatın biyofilm ve "slime" üretmediği saptanmış, kanlı agar besiyerinde tüm suşların beta-hemoliz oluşturdukları izlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde tüm suşlar oksasilin,

**Tablo I.** Çalışılan 11 *S.aureus* Suşunda PCR ile Araştırılan Genler, Kullanılan Primer Dizileri ve Gen Varlığının Saptandığı İzolat Sayısı

Genler		Oligonükleotid dizisi (5'→3') (F-Forward, R-Reverse primer)	Amplikon büyüklüğü (baz çifti)	Kaynak No.	Pozitif izolat sayısı
Biyofilm oluşumundan sorumlu genler	icaA	F-tggctgtattaagcgaagtc R-cctctgtctgggcttgacc	669 bp	20	11
	icaC	F-ataaactgaattagtgatt R-atataaaaactctctaaca	989 bp	19	0
	bap	F-ccctatatcgaagggtagaattgcac R-gctgttgaagttaataactgtacctgc	971 bp	3	0
Metisilin direnç geni	mecA	F-tggtatgtggaagttagattgg R-ggatctgtactgggtaatacag	1235 bp	22	11
Enterotoksin genleri	sea	F-tggaaacggtaaaacgaa R-gaacctcccatcaaaaaca	121 bp	28	11
	seb	F-tcgcatcaaactgacaaaacg R-gcaggtactctataagtgcc	477 bp	28	0
	sec	F-gacataaaagctaggaatt R-aaatcggattaacattatcc	257 bp	28	0
	sed	F-ctagtttgtaatatctcct R-taatgctatatcttatagg	318 bp	28	0
	see	F-tagataaagttaaaacaagc R-taactaccgtggacccttc	169 bp	28	0
TSS toksini	tst	F-aagcccttggctgtcg R-atcgaacttggccatactt	445 bp	29	0
Eksfoliyatif toksin genleri	eta	F-ctagtgcattgttattcaa R-tgcattgacaccatagtact	119 bp	28	0
	etb	F-acggctatatacattcaatt R-tccatcgataatatacctaa	200 bp	28	0
Alfa-hemolizin geni	hla	F-ggtttagcctggccttc R-catcagcaactcgttcg	534 bp	30	11
Beta-hemolizin geni	hlb	F-gccaaagccgaatctaag R-gcgatatacatccatggc	833 bp	30	11
Stafilokokal ekzotoksin benzeri protein-1 Proteaz genleri	set1	F-ggtaattcatagcgcagtatc R-caacgtttcatcgtaagctgc	879 bp	30	11
	sspA	F-gacaacagcgcactgtga R-agtatctttacacaactaca	292 bp	31	0
	sspB	F-tgaagaagatggcaagttag R-ttagatcacacttgtgcaag	493 bp	31	0
	aur	F-tagtagcacacgaattaacacacg R-ttccctattgcttgaatcacg	319 bp	31	0
Serin proteaz geni		F-caagttgaagcacctactgg R-tagagtgtgaatcggcttgg	934 bp	32	0
Lipaz geni	geh	F-gcacaagcctcgg R-gacgggggtgtag	473 bp	33	0
Regülatör genler	agrCA	F-caaacagtattcgctttat R-aatgagtctgtgagattttg	1273 bp	Bu çalışma	0
	sarA	F-gattgctttgagttgtatc R-atacagttcttcatcatgc	256 bp	Bu çalışma	11



**Şekil 1.** *S.aureus* suşlarında PCR ile saptanan genler. 1: *sea*, 2: *hla*, 3: *hly*, 4: *set1*, 5: *sarA*, 6: *sspA*, 7: *sspB*, 8: *aur*, 9: serin proteaz, 10: *icaA*, 11: *mecA*. M: İlk sıra 100 bp, son sıra 1kb DNA standartları (Fermentas).

penisilin G ve gentamisine dirençli, vankomisin, teikoplanin ve ko-trimoksazola duyarlı bulunmuş; suşlardan sadece birisi (YT-83) eritromisine, ikisi (YT-39 ve YT-49) ise ofloksasine karşı duyarlılık göstermiştir. Proteaz üretiminin belirlenmesi sırasında, suşlar sütlü agarlarda çok az açılmaya yol açmış, kazeinli besiyerinde de koloni çevresinde zon oluşturmamıştır. Tüm suşlar Tween 20 ve tributyrin içeren besiyerlerinde lipaz pozitif bulunurken, sadece YT-83 suşu Tween 80 besiyerinde pozitif sonuç vermiştir. Lipaz üretimi inkübasyonun ilk günlerinde görülmemiş, üçüncü günde yavaş olarak besiyeri içerisine doğru saçaklı bir ilerleme ve substratın parçalandığı izlenmiştir.

İzolatların genotipik ve fenotipik özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo II'de gösterilmiştir.

**Tablo II.** Çalışılan 11 *S.aureus* Suşunun Genotipik ve Fenotipik Özellikleri

Özellik	Genotip	Fenotip
Biyofilm/"slime" oluşumu	<i>icaA</i> pozitif; <i>icaC</i> ve <i>bap</i> negatif	Yok
Metisilin direnci ( <i>mecA</i> )	<i>mecA</i> pozitif	Var
Enterotoksin üretimi	<i>sea</i> pozitif; <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> negatif	Çalışılmadı
TSS toksin üretimi	<i>tst</i> negatif	Çalışılmadı
SSS toksin üretimi	<i>eta</i> ve <i>etb</i> negatif	Çalışılmadı
Alfa- ve beta-hemolizin üretimi	<i>hla</i> ve <i>hly</i> pozitif	Var
Stafilokokal ekzotoksin benzeri protein-1 üretimi	<i>set1</i> pozitif	Çalışılmadı
Proteaz üretimi	<i>sspA</i> , <i>sspB</i> , <i>aur</i> ve serin proteaz geni pozitif	Yok
Lipaz üretimi	<i>geh</i> negatif	Var (Geç pozitif)
Gen regülasyonu	<i>sarA</i> pozitif; <i>agrCA</i> negatif	Çalışılmadı

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda kullanılan biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *S.aureus* suşlarında, bazı virülans faktörlerini kodlayan genlerin (biyofilm oluşumundan, metisilin direncinden, ekzotoksinler, proteazlar ve lipaz üretiminden sorumlu genler ve regülatör genler) varlığı ile bu genlerden bazılarının fenotipik ifadesi (biyofilm oluşturma, antibiyotik direnci, proteaz ve lipaz üretimi) araştırılmıştır. Çalışmamızda izole edilen 11 *S.aureus* suşunun biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden sadece *icaA* genine sahip oldukları ve hiçbirisinin biyofilm oluşturmadığı saptanmıştır. Stafilokoklar arasında biyofilm yapma özelliği en çok *S.epidermidis*'te görülmektedir. *S.aureus* ve *S.epidermidis*'te biyofilm yapımı *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan PIA ile sağlanmaktadır. Bu gen dizisindeki mutasyonlar veya insersiyon dizileri, genin ifade edilmesini etkilemekte ve biyofilm oluşumunu engelleyebilmektedir<sup>19</sup>. Çalışmamızda *S.epidermidis* *ica* gen lokusu için dizayn edilen primerlerle yapılan PCR denemelerinde sonuç alınamamıştır. *S.aureus* *icaA* geni için dizayn edilen primerler kullanıldığında ise tüm suşların bu geni taşıdıkları görülmüştür. Bu farklılık *ica* gen dizilerinde stafilokok türleri arasında farklılıklar olduğu sonucunu doğurmuş ve yapılan gen bankası incelemeleri bu fikri doğrulamıştır. Knobloch ve arkadaşlarının<sup>20</sup> çalışmasında, hem kan kültürlerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen, hem de nazal örneklerden kolonizasyon etkeni olarak izole edilen *S.aureus* suşlarında *icaA* geninin varlığı bulunmuştur.

Vücut içerisinde biyomalzeme yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakası, gerek immün sistem hücrelerine gerekse antibiyotiklere karşı dirençte önemli rol oynamaktadır<sup>21</sup>. Çalışmamızda tüm suşların oksasilin, penisilin G ve gentamisine, çoğunun ise eritromisin (10/11) ve ofloksasine (9/11) dirençli olduğu görülmüştür. İzolatlarımızın tamamında *mecA* gen varlığı saptanmıştır. Metisiline dirençli *S.aureus* suşlarında *mecA* varlığının gösterilmesi referans olarak kabul edilmektedir<sup>22</sup>. Suşların biyofilm oluşturmamasına rağmen yüksek antibiyotik direnci göstermesi, yoğun bakım ünitesi izolatları olduklarından beklenen bir sonuçtur.

Çalışmamızda izole edilen *S.aureus* suşlarında çeşitli ekzotoksin genlerinin araştırılması sonunda, TSS ve SSS toksin genlerine sahip olmadıkları bulunmuş, ancak tüm suşların enterotoksin A (*sea*), ekzotoksin benzeri protein-1 (*set1*), alfa ve beta-hemolizin (*hla*, *hly*) genlerini taşıdığı belirlenmiştir.

Stafilokoklarda global regülatör genler olarak tanımlanan *agr* ve *sarA* genleri, birçok önemli virülans faktörünün ifade edilmesini kontrol etmektedir. Dunman ve arkadaşlarının<sup>23</sup> çalışmasında, *agr* ve *sarA* genlerinin sırasıyla 104 ve 76 adet genin regülasyonunu artırdığı, 34 ve 44 adet genin regülasyonunu ise azalttığı ortaya konmuştur. Çalışmamızda tüm suşlar *sarA* geni bakımından pozitif bulunurken, suşların hepsi *agr* geni bakımından negatif bulunmuştur. Bu durum *S.aureus* suşları arasında *agr* gen dizilerindeki genetik çeşitlilik olarak açıklanabilir<sup>24</sup>.

Stafilokokların önemli bir virülans faktörü olan proteaz üretiminin tespitinde, çalışmamızda üç farklı besiyerinden yararlanılmıştır. Tüm suşlar kazein agarda negatif sonuç vermiş, sütlü besiyerlerinde ise koloni çevresinde çok az açılmaya



yol açmış, diğer bir deyişle proteinlerin az miktarda parçalanmasına neden olmuştur. Buna karşın izolatların tümünde PCR ile proteaz enzimlerini kodlayan genlerin varlığı (*sspA*, *sspB*, *aur* ve serin proteaz geni) saptanmıştır. Bu durum genlerin ifade edilmelerinin veya üretilen proteaz miktarlarının az olması ile açıklanabilir. Çalışmamız kapsamında üretilen enzimler saflaştırılıp aktivite tayinleri yapılmadığından üretilen proteaz miktarı ve cinsi bilinmemektedir.

Lipaz enziminin de stafilokok enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmekte, granülosit kemotaksisini ortadan kaldırdığı ve fagositozla bakterilerin öldürülmesini azalttığı ifade edilmektedir<sup>12</sup>. Ayrıca lipaz enziminin bakterinin yayılmasına da yardımcı olduğu ve lipaz oluşturan suşların genellikle derin doku ve organ enfeksiyonlarından izole edildiği belirtilmektedir<sup>13,25,26</sup>. Bu çalışmada lipaz üretiminin tespitinde uygun substratları içeren besiyerleri kullanılmış, tüm suşların Tween 20 ve tributyrin içeren besiyerlerinde lipolitik aktivite göstermesinin yanı sıra sadece YT-83 suşu Tween 80 içeren besiyerinde lipolitik aktivite göstermiştir. PCR çalışmasında ise suşlarda lipaz üretimini kodlayan *geh* geni tespit edilememiştir. Bu durumun lipaz enzimini kodlayan *geh* genlerinin stafilokok suşlarında farklı olmasından ve gen dizilerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>27</sup>.

Sonuç olarak çalışmamızda, biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen *S.aureus* suşlarında, araştırılan virülans genlerinden bazılarının varlığı saptanmış, ancak bunların da bir kısmının fenotipe yansımadağı izlenmiştir. İzolat sayımızın az olmasına ve tüm genlerin ekspresyonlarının fenotipik olarak çalışılmamış olmasına rağmen, bu genlerin varlığının yoğun bakım hastaları için potansiyel bir risk teşkil edebileceği düşünülmüştür. Yapılacak daha ileri çalışmalarla *S.aureus* suşlarının virülans özelliklerinin detaylı olarak araştırılması ve gen profillerinin belirlenmesi, enfeksiyonların patogenezinin aydınlatılmasına büyük katkı sağlayacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Projan S, Novick R. The molecular basis of virulence, pp: 55-81. In: Crossley KB, Archer GL (eds), *The Staphylococci in Human Disease*. 1997, Churchill Livingstone, New York.
2. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43:1367-78.
3. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183:2888-96.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Detection of Oxacillin/Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*., Feb 2, 2005. [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_lab\\_mrsa.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_mrsa.html)
5. Sutherland J, Varnam A. Enterotoksin producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. pp: 384-415. In: Blackburn CW, McClure PJ (eds), *Foodborne Pathogens*. 2002, CRC Press, Washington DC.
6. Lee PK, Vercellotti GM, Deringer JR, Schlievert PM. Effects of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 on aortic endothelial cells. *J Infect Dis* 1991; 164:711-9.
7. Menzies BE, Kourteva I. *Staphylococcus aureus* alpha toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 29:39-45.
8. Brooks GF, Butel JS, Morse SA (eds). *The staphylococci*, pp: 223-230. In: Jawetz, Melnick & Adelberg's *Medical Microbiology*. 2004, 23<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Co. International Edition, USA.

9. Williams RJ, Ward JM, Henderson B, et al. Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins: characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun* 2000; 68: 4407-15.
10. Dubin G. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol Chem* 2002; 383:1075-86.
11. Chan PF, Foster SJ. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1998; 180: 6232-41.
12. Rollof J, Braconier, JH, Soderstrom C, Nilsson-Ehle P. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 505-10.
13. Rollof J, Hedstrom SA, Nilsson-Ehle P. Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains from disseminated and localized infections. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 1987; 95:109-13.
14. Sudagidan M, Yenidunya AF, Gunes H. Identification of staphylococci by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 2005; 54: 823-6.
15. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37:318-26.
16. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 2002; 23:4233-9.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S16. 2006, 16th International ed. Pennsylvania, USA.
18. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* in periprostheses infections. *Diag Mol Pathol* 2001; 10:130-7.
19. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of polysaccharide intercellular adhesion synthesis by altering insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999; 32: 345-56.
20. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191: 101-6.
21. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-8.
22. Lem P, Spiegelman J, Toye B, Ramotar K. Direct detection of *mecA*, *nuc* and 16S rRNA genes in BacT/Alert blood culture bottles. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001; 41:165-8.
23. Dunman PM, Murphy E, Haney S, et al. Transcriptional profiling based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 2001; 183: 7341-53.
24. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, et al. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol* 2002; 184: 1180-6.
25. Hedström SA, Nilsson-Ehle P. Trioleoylglycerol lipolysis by *Staphylococcus aureus* strains from recurrent furunculosis, pyomyositis, impetigo and osteomyelitis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1983; 91:169-73.
26. Smeltzer MS, Hart ME, Iandolo JJ. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2815-9.
27. Longshaw CM, Farrell AM, Wright JD, Holland KT. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiol* 2000; 146: 1419-27.
28. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 426-30.

29. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun* 2001; 69: 345-52.
30. Salasia SI, Khusnan Z, Lammler C, Zschock M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J Vet Sci* 2004; 5:103-9.
31. Karlsson A, Arvidson S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. *Infect Immun* 2002; 70: 4239-46.
32. Smeltzer MS, Hart ME, landolo JJ. Phenotypic characterization of *xpr*, a global regulator of extracellular virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993; 61: 919-25.
33. Saïd-Salim B, Dunman PM, McAleese FM, et al. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 2003; 185: 610-9.