

## ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARININ KOAGULAZ VE DNase AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Ömer Akay\*

**An investigation on the coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from different sources**

**Summary:** *In this study, a total of 673 staphylococci strains isolated from human and animal sources were tested for coagulase and deoxyribonuclease activities to determine whether there is a correlation between the results of these tests. The coagulase activities of the isolated strains was determined according to direction for the tube method. Deoxyribonuclease activity was investigated on DNase agar plates.*

*Only one (0.4%) of 247 Staphylococcus epidermidis strains of human origin gave positive reaction and the rest was found to be negative in coagulase test. On the other hand, 81 Staph. epidermidis strains from animal origin were all negative in the same test. Only 2 of 189 Staph.aureus strains isolated from human clinical materials failed in the reaction, while 187 of them (98%) gave positive reaction in coagulase test. Except one, all of 155 Staph. aureus strains of animal origin produced (99.3 %) coagulase.*

*326(94.4%) out of the 345 Staph.aureus strains from human and animal origin and 30(9.1%) of 328 Staph.epidermidis strains of the same origin produced deoxyribonuclease in the DNase test.*

*The results of this study sugges that, there is a good relationship between deoxyribonuclease activity and coagulase production in Staph.aureus strains.*

**Özet:** *Bu çalışmada, insan ve hayvanlardan izole edilen toplam 673 stafilokok suşunun koagulaz ve deoksiribonukleaz aktiviteleri ve bu testler arasındaki korelasyon incelenmiştir. Kullanılan suşların koagulaz aktiviteleri tüp testi yöntemi ile, DNase oluşturmaları ise, DNase besi yerinde yapılmıştır.*

*İnsan orijinli 247 Staph.epidermidis suşundan 1 tanesi koagulaz pozitif(% 0.4), 246'sı negatif ve hayvan orijinli 81 suştan hepsi aynı testte negatif bulunmuştur. Buna karşın, insan orijinli 189 Staph.aureus suşundan*

\* Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

187'sinin (% 98.9) pozitif, 2 suşun negatif, hayvan orijinli 156 suştan 155'inin pozitif (% 99.3), birisinin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan insan ve hayvan orijinli 345 *Staph.aureus* suşundan 326'sı (% 94.4) ve 328 *Staph.epidermidis* suşundan 30'u deoksiribonukleaz yönünden pozitif bulunmuştur.

Bu çalışmada, *Staph.epidermidis* suşlarının DNase aktivitelerinin *Staph.aureus* suşlarına oranla düşük olduğu ve patojenik *Staph.aureus* suşlarının tanımlanmasında kullanılan DNase ile koagulaz testleri arasında bir korelasyonun bulunduğu belirlenmiştir.

### Giriş

Stafilokok cinsinde bulunan patojenik *Staph.aureus* ile apatojenik *Staph.epidermidis* türlerinin birbirinden ayrımı için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan en önemli test, koagulaz yapımıdır (1, 7). Ayrıca, manitol fermentasyonu da diğer bir ayırıcı yöntem olarak kabul edilmektedir (4).

Koagulaz testi *Staph.aureus* suşlarının koagulaz negatif olanlardan ayırt edilmesi uygun bir test olmasına rağmen, bazı *Staph.aureus*'ların laboratuvar koşullarında bu özelliklerini yitirerek, *Staph.epidermidis*'e benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir (9, 17, 18). Bu durum göz önünde tutularak, bazı araştırmacılar (12-14, 23, 27) her iki etkenin birbirinden ayrımı ve koagulaz testi ile korelasyon gösterecek bir test için mikroorganizmaların lizozim, lipaz, fosfataz, fibrinolizin, hemolizin, hyaluronidaz gibi bazı karakterlerini de incelemişler, ancak, bu testler ile koagulaz yapımı arasında arzu edilen korelasyonu saptayamamışlardır.

Patojenik ve apatojenik stafilokok suşlarının ayrımı için DNase testinden de yararlanılmaktadır (19, 21, 24, 28). Weckman ve Catlin (28), klinik materyallerden izole ettikleri 87 mikrokok suşundan 34 tanesinin koagulaz ve DNase pozitif, buna karşın koagulaz negatif suşlardan sadece birisini DNase pozitif bulduklarını ve DNase testinin stafilokokların ayırımında geçerli bir test olabileceğini açıklamışlardır. Burns ve Holtman (3), DNase testinin koagulaz, pigmentasyon ve manitol fermentasyonu ile korelasyon gösterdiğini, DiSalvo (8), 204 *Staph.aureus* suşundan 199'nun DNase ve koagulaz pozitif, 100 *Micrococcus pyogenes var.albus* suşundan birisinin hem DNase ve hem de koagulaz testinde pozitif bulunduğunu, böylece

DNase testinin stafilocokların patojenitelerinin belirlenmesinde bir değere sahip olacağını bildirmişlerdir. Victor ve ark. (27), koagulaz pozitif *Staph.aureus* suşlarının % 95'ni DNase testinde de pozitif bulduklarını, ayrıca çalışmalarında kullandıkları 41 koagulaz negatif suştan 10 tanesinin DNase oluşturduğunu ve bunlardan dokuzunun enterotoksin salgıladığını, enterotoksijenik bulunan bu suşların muhtemelen koagulaz oluşturma özelliklerini kaybetmiş mutantlar olabileceklerini açıklamışlardır. Grunina ve Stepanov (11), kanatlılardan izole ettikleri 300 stafilocok suşundan 128'ini koagulaz ve 156'sını da DNase pozitif bulmuşlar, koagulaz pozitif suşlardan % 94.2 sinin DNase oluşturduklarını ve bu sonuçlara dayanarak, DNase testinin koagulaza oranla patojenite kriterinin belirlenmesinde daha uygun bir test olabileceğini bildirmişlerdir. Jacobs ve ark. (16), insan orijinli 1467 koagulaz pozitif stafilocok suşundan tamamının, 227 koagulaz negatif stafilocok suşundan ise sadece 5 tanesinin zayıf bir şekilde DNase pozitif bulunduğunu ve bu nedenle de testin, teşhis laboratuvarlarında güvenle kullanılabilceğini açıklamışlardır. Higgins ve Chartier (13), çeşitli hayvan türlerinden izole ettikleri 280 koagulaz pozitif stafilocok suşundan 121'ini *Staph.aureus* ve 159 adedini de *Staph.intermedius* olarak tanımlamışlar ve *Staph.aureus* suşlarından % 94.7'sinin, *Staph.intermedius*'lerden ise % 99.3'nün DNase oluşturduklarını bildirmişlerdir. Cheong (6), mastitis'li inek sütlerinden izole ettiği 29 *Staph.epidermidis*'ten 8'inin, 140 *Staph.aureus* suşundan ise tamamının DNase oluşturduğunu, ayrıca aynı araştırmacı (5), değişik klinik formlarda seyreden inek mastitis olgularından izole ve tanımlamış 140 *Staph.aureus* suşunun koagulaz ve DNase testlerinde pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir. Takeuchi ve Suta (26), dermatitis'li tavuklardan izole ettiği 49 *Staph.aureus* suşunun % 94'ünün koagulaz ve % 6'sının DNase pozitif; Osteopsathyrosis'li hayvanlardan ayırdıkları *Staph.aureus* suşlarından % 98'nin koagulaz ve % 58'nin DNase pozitif; artrit'li tavuklardan izole edilen 5 suşun ise hem koagulaz ve hem de DNase testinde pozitif bulunduğunu açıklamışlardır. İstanbulluoğlu ve Diker (15), çeşitli kaynaklardan izole ettikleri 120 stafilocok suşundan % 51.6'sının koagulaz, % 65.8'nin DNase pozitif olduklarını bildirmişlerdir. Köhler-Samouilidis (19), 182 süt örneğinden ayırdığı 32 *Staph.aureus* dan % 84'nün, 66 *Staph.epidermidis*'den % 20'sinin DNase pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir. Holmberg (14), inek sütlerinden izole ettiği 46 *Staph.aureus* suşundan % 93.5, 218 *Staph.epidermidis* suşundan ise % 34.4'ünün DNase pozitif olduğunu açıklamıştır. Sperger ve

Tatini (25), çeşitli kaynaklardan izole ettikleri 439 *Staph.aureus* suşunun koagulaz ve termonukleaz oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, insan ve çeşitli hayvan türlerinden izole edilen stafilokok suşlarının koagulaz ve DNase aktivitelerinin saptamak ve bu testler arasındaki korelasyonu ortaya koyarak, stafilokokların identifikasyonundaki değerini araştırmaktır.

### Materyal ve Metot

*Suşlar*: Çalışmada, insan ve hayvanlardan izole ve identifiye edilen toplam 329 *Staph.epidermidis* ve 345 *Staph.aureus* suşundan yararlanılmıştır. Kullanılan 328 *Staph.epidermidis* suşundan 247'si insan, 48'i sığır, 7'si kanatlı, 26'sı koyun; 345 *Staph.aureus* suşundan 189'u insan, 102'si sığır ve 54'ü kanatlı orijinlidir. İnsan kaynaklı suşlar; Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Askeri Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SSK Ankara Hastanesi Çocuk Kliniği, G.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından, hayvan orijinli suşlar ise, Etlik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü, İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen hastalıklı materyallerden izole ve identifiye edilmiştir.

*Besi yerleri*: Denemede kullanılan suşların DNase ve koagulaz aktivitelerini saptamak amacıyla, DNase agar (Oxoid), Triptikaz soy agar, triptikaz soy buyyon; suşların identifikasyonunda ise kanlı agar, nutrient agar, nutrient buyyon, fermentasyon besi yerlerinden yararlanılmıştır.

*Tavşan plazması*: Çalışmada kullanılan suşların tüp koagulaz testi için ticari tavşan plazması(Sigma) kullanılmıştır.

*Koagulaz testi*: Bu test, Holmberg (14)'in bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Steril tavşan plazması 1/5 oranında sulandırılarak 1 ml miktarında tüplere konmuş ve üzerine teste tabi tutulacak suşların nutrient buyyondaki taze kültürlerinden 0.1 ml ilave edilmiş ve sonuçlar koagulasyonun olup olmamasına göre 2, 4, 6 ve 24 ncü saatlerde değerlendirilmiştir.

*DNase testi*: Bu test, Zierdt ve Golde (29), tanımladığı metoda göre DNase(Oxoid) besi yerinde yapılmıştır. Teste tabi tutulacak suşların Triptikaz soy buyyondaki kültürlerinden besi yerine nokta inokulasyonu yapılmış ve 37°C de 24 saatlik bir inkubasyonu takiben koloniler üzerine 1N HCl'den konmuş ve koyu zemin üzerinde mua-

ycene edilerek, koloniler etrafındaki açılmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### Bulgular

*Koagulaz testi sonuçları*: Çeşitli kaynaklardan sağlanan ve denemeye alınmadan önce kesin identifikasyonu yapılan insan orijinli 247 *Staph.epidermidis* suşundan bir tanesi koagulaz pozitif (% 04), 246'sı negatif; 48 sığır, 7 kanatlı ve 26 koyun orijinli *Staph.epidermidis* suşu negatif; insan orijinli 189 *Staph.aureus* suşundan 187'si (98.9) pozitif, 2 suş negatif; sığır orijinli 102 suştan 101'i pozitif (% 99), biri negatif; kanatlı orijinli 54 suştan hepsi pozitif bulunmuştur (Tablo - 1).

Toplam olarak, 328 insan ve hayvan orijinli *Staph.epidermidis* suşundan 1 tanesi pozitif (% 03), 327 tanesi negatif, 345 *Staph.aureus* suşundan 342 tanesi pozitif (% 99.1), 3'ü ise negatif sonuç vermiştir.

*DNase testi sonuçları*: Denemede kullanılan insan orijinli 247 *Staph.epidermidis* suşundan 8'i DNase pozitif (% 3.2), 239'u negatif; 48 sığır kaynaklı suştan 7'si pozitif (% 14.5), 41 tanesi negatif; kanatlı orijinli 7 suştan hepsi negatif; 26 koyun orijinli suştan 15'i pozitif (% 57.6), 11'i negatif; insan kaynaklı 189 *Staph.aureus* suşundan 179'u pozitif (% 94.7), 10'u negatif; sığır orijinli 102 suştan 98'i pozitif (% 96), 4'ü negatif; kanatlı orijinli 54 suştan 49'u pozitif (% 90.7), 5 tanesi ise negatif bulunmuştur (Tablo - 1).

Toplam olarak, testte kullanılan insan ve hayvan orijinli 328 *Staph.epidermidis* suşundan 30'u pozitif (% 9.1), 298'i negatif ve 345 *Staph.aureus* suşundan 326'sı pozitif (% 94.4), 19'u ise negatif bulunmuştur (Tablo - 1).

### Tartışma ve Sonuç

İnsan ve hayvanlarda hastalık meydana getiren stafilokoklarla (*Staph.aureus*), komensal özellik taşıyan diğer türlerin birbirinden ayrımı ve özellikle patojenik karaktere sahip olanların tanımlanması bugün dahi hem insan ve hem de veteriner hekimlik alanında çalışan bakteriyologların teşhis açısından önemli bir sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Tür ayrımında en çok başvurulan test, koagulaz testi- dir. Yapılan birçok araştırmada (8, 14, 26) *Staph.aureus* suşları koagulaz testinde büyük bir yüzde oranı ile pozitif bulunmuştur. Bu

Tablo 1. İnsan ve hayvan orijinli *Staph. epidermidis* ve *Staph. aureus* suşlarının koagulaz ve DNase aktiviteleri sonuçları

Orijin	Suş sayısı		Koagulaz				DNase				Koagulaz   DNase	
	Staph. epidermidis	Staph. aureus	Staph. epidermidis		Staph. aureus		Staph. epidermidis		Staph. aureus		% pozitif	
			+	-	+	-	+	-	+	-	Staph.	aureus
İnsan	247	189	1	246	187	2	8	239	179	10	98.9	94.7
Sığır	48	102	—	48	101	1	7	41	98	4	99	96
Kanathı	7	54	—	7	54	—	—	79	49	5	100	90.7
Koyun	26	—	—	26	—	—	15	11	—	—	—	—
Toplam	328	345	1	327	342	3	30	298	326	19	99.1	94.4

çalışmada çeşitli kaynaklardan sağlanan 345 *Staph.aureus* suşundan 342'si koagulaz pozitif, 2 insan ve 1 sığır orijinli suşun negatif, toplam olarak, suşların % 99.1'nin testte pozitif ve % 09'unun negatif olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan *Staph.epidermidis* suşlarının koagulaz negatif oldukları yapılan çalışmalarla (14, 19, 25) ortaya konulmuştur. Holmberg (14), inek sütlerinden izole ettiği 218 ve Köhler-Samouilidis (19) süt örneklerinden ayırdığı 66 *Staph.epidermidis* suşunun koagulaz testinde negatif bulduklarını açıklamışlardır. Bu çalışmada, kullanılan 328 *Staph.epidermidis* suşundan 327'si koagulaz negatif bulunmuş ve elde edilen bulguların diğer araştırmacılarınkine benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Patojenik stafilokok suşlarının apatojeniklerden ayrımı için DNase testinden de yararlanılmaktadır (13, 14, 16, 19). Yapılan çalışmalar (8, 16, 19, 20), *Staph.epidermidis* suşları arasında DNase pozitif suşların sayısının *Staph.aureus* suşlarındakilere oranla çok daha düşük olduğunu göstermiştir. Ancak, Nilsson (22), inek sütlerinden izole ettiği *Staph.epidermidis* suşlarından % 31'nin, Franklin ve ark. (10) ve Burns ve Hollman (2), izole ettikleri insan orijinli *Staph.epidermidis* suşlarının sırasıyla % 27 ve % 12 sinin, Holmberg (14), inek sütlerinden ayırdığı 218 *Staph.epidermidis* suşunun % 34'nün DNase pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan 328 *Staph.epidermidis* suşundan 30 tanesinin DNase pozitif olduğu saptanmıştır. Bu suşlardan 15 tanesi koyun, 7 si sığır ve 8'i ise insan orijinlidir. Diğer taraftan, insan ve hayvan orijinli *Staph.aureus* suşlarının çoğunun DNase pozitif olduğu bildirilmektedir (8, 13, 14, 20, 21). Araştırmada alınan sonuçlara göre, 345 *Staph.aureus* suşundan 326'sı DNase pozitif, 19'un ise negatif bulunmuş diğer bir ifade ile; denemede kullanılan suşların % 94.4'nin pozitif, % 5.5'sinin ise negatif sonuç verdiği saptanmış ve elde edilen bu bulguların yapılan diğer çalışma sonuçlarına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, deoksiribonukleaz(DNase)'ın bütün koagulaz pozitif suşlar tarafından sentezlenmesine karşın, aynı enzimin az sayıdaki koagulaz negatif suş tarafından meydana getirildiği belirlenmiş, ayrıca, DNase testinin uygulanması kolay, her laboratuvar da yapılabilecek bir yöntem olduğu ve patojenik stafilokokların apatojeniklerden ayrımında kullanılan koagulaz testi ile paralellik gösterdiği saptanmıştır.

## Kaynaklar

1. **Breed, R.S., Murray, E.D.G. and Smith, N.R.** (1957). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 7 th. Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. **Burns, J. and Holtman, D.F.** (1960). *Biochemical properties of virulent and avirulent staphylococci*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 1115-1124.
3. **Burns, J. and Holtman, D.** (1962). *A laboratory technique employing D.Nase activity for the differentiation of staphylococci*. J. Tenn. Acad. Sci., 37:15-16.
4. **Chapman, G.H. and Stiles, M.H.** (1940). *Carbohydrate fermentation reaction of staphylococci*. Amer. J. Clin. Pathol., 10: 380-386.
5. **Cheong-Kyu Park.** (1982). *Studies on staphylococci isolated from bovine udder infections. I. Biochemical properties of Staphylococcus aureus*. Korean J. Vet. Res., 22(1): 15-21.
6. **Cheong-Kyu Park.** (1983). *Studies on staphylococci isolated from bovine udder infections. II. Distribution and biochemical properties of coagulase-negative staphylococci*. Korean J. Vet. Res., 23(2): 165-172.
7. **Cruickshank, R.** (1937). *Staphylocoagulase*. J. Pathol. Bacteriol., 45: 295-303.
8. **DiSalvo, J.W.** (1958). *Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci*. Med. Tech. Bull., 9: 191-196.
9. **Egan, J.B. and Morse, M.L.** (1965). *Carbohydrate transport in Staphylococcus aureus. I. Genetic and biochemical analysis of a pleiotropic transport mutant*. Biochem. Biophys. Acta., 97: 310-319.
10. **Franklin, M.K., Baer, E.F. and Giden, M.M.** (1966). *Reliability of several diagnostic and determinative tests in the identification of coagulase-positive staphylococci*. J. Ass. Off. Agric. Chem., 49: 282-284.
11. **Grunina, L.F. and Stepanov, V.A.** (1972). *Deoxyribonuclease activity of staphylococci isolated from fowls*. Veterinariya Moscow, 8: 55-56.
12. **Hajek, V. and Marsalek, E.** (1971). *The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification*. Zbl. Bakteriol. Parasitol. Infek. Hyg. I. Orig. A., 217: 176-182.
13. **Higgins, R. et Chartier, P.** (1984). *Contribution a l'identification des Staphylocoques "coagulase positive" d'origine animale*. Med. Vet. Quebec, 14(2): 61-65.
14. **Holmberg, O.** (1973). *Staphylococcus epidermidis isolated from bovine milk*. Acta Vet. Scand. Supp., 45: 1-144.
15. **İstanbuluoğlu, E. ve Diker, S.** (1983). *Çeşitli kaynaklardan izole edilen stafilocok suşlarının enzim karakterleri üzerinde incelemeler*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 30(2): 223-227.
16. **Jacobs, S.I., Willins, A.T. and Goodburn, G.M.** (1963). *Significance of deoxyribonuclease production by staphylococci*. Nature, 16: 709-710.
17. **Karpal, F.A. and Li, W.I.** (1960). *Virulence and coagulase of Staphylococcus aureus*. Proc. Soc. Exp. Biol., 104: 151-153.
18. **Korman, R.** (1963). *Coagulase-negative mutants of Staphylococcus: Genetic studies*. J. Bacteriol., 86: 363-369.



19. **Köhler-Samouilidis, G.** (1984). *Ein Beitrag zur Bedeutung der DN-ase-Aktivität tierischer Staphylokokken.* Dtsch. Tierärztl. Wschr., 91: 157-158.
20. **Malmberg, A.S.** (1964). *Pathogenicity test for staphylococci with DNA-plates.* Acta Pat. hol. Microbiol. Scand., 61: 494.
21. **Morton, H.E. and Cohn, J.** (1972). *Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources.* App. Microbiol., 23(4): 725-733.
22. **Nilsson, L.** (1966). *Stafylokokernas desoxiribonukleas-ett bakteriologiskt-diagnostiskt hjälpmedel.* Proc. 10 th. Nord. Vet. Cong. Stockholm. I: 393-397.
23. **Scheifler, K.H., Schumacher-Perdreau, F., Gotz, F. and Papp, B.** (1976). *Chemical and biochemical studies for the differentiation of coagulase-positive staphylococci.* Arch. Microbiol., 110: 263-270.
24. **Smith, P.B., Hancock, G.A. and Rhoden, D.L.** (1969). *Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria.* App. Microbiol., 18(6): 991-993.
25. **Sperber, W.H. and Tatini, S.R.** (1975). *Interpretation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus:* App. Microbiol., 29(4): 502-504.
26. **Takeuchi, S. and Suta, T.** (1973). *Biological charactes of Staphylococcus aureus isolated from diseased chickens.* Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 13: 124-130.
27. **Victor, R., Lachica, F., Weiss, K.F. and Deibel, R.H.** (1969). *Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by Staphylococcus aureus.* App. Microbiol., 18(1): 126-127.
28. **Weckman, B.G. ana Catlin, B.W.** (1957). *Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources.* J. Bacteriol., 73: 742-753.
29. **Zierdt, C.H. and Golde, D.W.** (1970). *Deoxyribonuclease-positive Staphyccoccus epidermidis strains.* App. Microbiol., 20(1): 54-57.