

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARININ  
ENZİM KAREKTERLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER

Ersin İstanbulluoğlu\*

Serdar Diker\*\*

Studies on Enzyme Characteristics of Staphylococci Isolated from Several Sources

**Summary:** *In this study, 120 strains of staphylococci isolated from several sources were tested for their ability to produce DNAase, TNAase, phosphatase, coagulase and sensitivity to lysostaphin. Of the 120 isolates, 51.6 %, 55.5 %, 65.8 %, and 50.0 % produced free coagulase, TNAase, DNAase and phosphatase, respectively. Lysostaphin sensitivity was demonstrated in 50.8 % of isolates.*

*The highest correlation was between coagulase and lysostaphin (98.3%). The correlation between DNAase-TNAase (78.4%) DNAase-Lysostaphin (78.4%) was found to be lowest rate.*

**Özet:** *Bu çalışmada, çeşitli kaynaklardan izole edilen 120 stafilokok suşunun DNAase, TNAase, fosfataz ve koagülaz aktiviteleri ile lysostaphine duyarlılık özellikleri saptandı. İncelenen 120 suştan sırasıyla %51.6, %55.5, %65.8 ve %50.0 si koagülaz, TNAase, DNAase ve fosfataz pozitif, ve %50.8 i lysostaphine duyarlı bulundu.*

*En yüksek korelasyon %98.3 ile koagülaz ve lysostaphin arasında, en düşük oran ise %87.4 ile DNAase-TNAase ve DNAase-Lysostaphin arasında saptandı.*

### Giriş

İnsanlardan ve hayvansal kaynaklardan izole edilen stafilokoklar, in vivo veya in vitro üretildiklerinde buldukları ortama, enzim karakterinde ekstraselüler maddeler salgırlarlar. Koagülaz, deoksiribonukleaz (DNAase), termonukleaz (TNAase-Isıya dirençli nukleaz), fosfataz ve hıyaluronidaz gibi konakçı üzerine çok kuvvetli etkileri

\* Doç.Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.

\*\* Araştırma Görevlisi, A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara-Turkey.

olan bu maddelerin patojenite ile çok yakın ilgileri olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (1). Koagulaz testi, bunlar içinde halen en çok başvurulan patojenite kriteri olarak kabul edilmektedir. Fakat, son yıllarda koagulaz negatif stafilokok suşlarının da çeşitli infeksiyonlara neden olduğunun bildirilmesinden sonra, bu teste alternatif ve yardımcı olan, ayrıca mikroorganizmanın patojenitesini daha iyi belirleyen deneylere gerek duyulmuştur (1,5,11). Bu amaçla DNAase, TNAase, fosfataz ve lysostaphine duyarlılık testleri, son zamanlarda, çeşitli ülkelerdeki araştırmacılar tarafından kullanılmaya başlanmıştır (4,6,7,8,9). Son yıllarda yapılan araştırmalar ile önemi artan Lysostaphin, *Staph.staphylolyticus* suşları tarafından salgılanan ve *Staph. aureus*'un lizisine neden olan protein tabiatında ekstraselüler bir maddedir(8).

Bu çalışmanın amacı, hayvansal kaynaklardan izole edilen stafilokok suşlarının enzim karakterlerini ve enzim karakterleri arasındaki paralellik oranlarını karşılaştırmak ve bu testlerin güvenilirliklerini incelemektir.

### Materyal ve Metot

*Stafilokok suşları*: Stafilokok suşlarının 100 adeti, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Bakteriyoji Bilim Dalı Teşhis laboratuvarına gönderilen süt örneklerinden, 20 adeti tavuklardan izole edildi.

*Koagulaz testi*: Koagulaz testi Holmberg tarafından bildirilen yöntemle göre yapıldı(5).

*DNAase testi*: Pham'a göre yapıldı(6). Stafilokok suşları DNAase agar (Oxoid) üzerine nokta şeklinde ekildikten sonra 37°C de 24 saat inkube edildiler. Bu sürenin sonunda, üreyen kolonilerin üzerine birkaç ml. 1 N HCl döküldü. Birkaç saniye içerisinde çevresinde saydam bir alan oluşan stafilokok suşları pozitif olarak değerlendirildiler.

*TNAase testi*: Pham tarafından modifiye edilen yöntem kullanıldı(6). Brain-heart infusion broth (Difco)'da üretilen 8-10 saatlik stafilokok kültürleri 100°C de 15 dakika kaynatıldıktan sonra, 0.1 M % 0.1 Toluidine blue içeren DNAase agarın üzerinde açılan 3 mm. çapındaki deliklere konuldular. 37°C de 24 saat inkubasyondan sonra çevresinde pembe bir halka oluşan deliğe konan suşlar pozitif olarak kabul edildiler.

*Fosfataz testi*: Stafilokok suşlarının fosfataz aktiviteleri Holmberg'in bildirdiği yöntem ile incelendi (5). Suşlar fenolftalein içeren

nutrient agara ekildikten sonra 30°C de 3 gün inkube edildiler. Bu sürenin sonunda üreyen koloniler amonyak buharına tutuldular ve rengi pembeye dönen koloniler pozitif olarak değerlendirildiler.

*Lysostaphine duyarlılık testi*: Bu test Severance'ye göre yapıldı(8). Brain-heart infusion broth'da üretilen stafilokok suşlarının 1:10 sulandırılmaları yapıldıktan sonra içlerine Lysostaphin (Sigma) katıldı (son konsantrasyon 2mcg/ml.). 37°C de 30 dakika mikserde karıştırılan bu kültürlerden ve içine lysostaphin karıştırılmamış kültürlerden alınan örnekler Gram yöntemi ile boyandılar. Her iki kültürün boyamasından 5 er alan sayılarak, lysostaphin katılmadan önce kültürdeki bakteri sayısının, lysostaphin katıldıktan sonra %90 oranında azalması, suşların lysostaphine karşı duyarlı olduklarını gösterdi.

### Bulgular

İncelenen 120 stafilokok suşunun %51.6 sının koagulaz, %65.8 nin DNAase, %55.5 nin TNAase, %50 nin fosfataz enzimini salgıladıkları belirlendi. Bu suşların %50.8 i lysostaphine duyarlı bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. İncelenen stafilokok suşlarının çeşitli enzimleri salgılama oranları.

Koagulaz	DNAase	TNAase	Fosfataz	Lysostaphine D.
51.6(62)	65.8(79)	55.5(67)	50.0(60)	50.8(61)

Tablo 1'de görüldüğü gibi, koagulaz deneyi sonuçları ile en yüksek oranda paralellik lysostaphin (%98.3) ve fosfataz (% 96.7) testlerinde elde edildi. Koagulaz negatif olan ve diğer biyokimyasal testler ile *Staph.aureus* olduğu belirlenen iki suşun da DNAase, TNAase, fosfataz ve lysostaphin pozitif olduğu saptandı. Koagulaz negatif stafilokok suşlarının hepsi lysostaphin negatif bulundu; yalnızca iki tanesi TNAase ve fosfataz testlerinde pozitif sonuç verdi.

Tablo 2. İncelenen stafilokok suşlarının çeşitli enzimleri salgılama oranları arasındaki paralellik (%).

	Koagulaz	DNAase	TNAase	Fosfataz
Lysostaphin	98.3	78.4	97.4	96.6
Fosfataz	96.7	79.7	94.7	
TNAase	91.9	78.4		
DNAase	88.7			

### Tartışma ve Sonuç

Uluslararası bir taksonomi komisyonu olan "ICSB Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci", stafilokokların tür ayrımı için şu testleri önermektedir: koagulaz yapımı, aerobik koşullarda sukroz, trehaloz ve mannitolden asit yapımı, fosfataz üretimi ve novobiosin'e duyarlılık (3). Olanakların yetersizliği nedeniyle, bu deneyler ancak belli referens ve araştırma laboratuvarlarında tümüyle yapılabilmekte, birçok teşhis laboratuvarında *Staph.aureus*'un identifikasyonunda yalnızca koagulaz testi kullanılmaktadır. Koagulaz yapımı, serbest enzim için tüp testi ile, "clumping factor" olarak bilinen bağlı enzim ise lâm üzerinde saptanmaktadır. Tüp koagulaz testinin değerlendirilmesinde çeşitli güçlüklerle karşılaşıldığı bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (7,9). Ayrıca, diğer bazı araştırmacılar tüp koagulaz testinde hatalı-pozitif ve hatalı-negatif sonuçların görüldüğünü bildirmişlerdir(2,9,10).

Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı son yıllarda stafilokok suşlarının ayırımında yeni bazı testler kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerden bu gün için kullanılan en belli başlıları, TNAase yapımı ve lysostaphine duyarlılık testleridir(6,8). Son zamanlarda, lektin ve bitki aglütininlerinden yararlanılarak geliştirilen çabuk lâm aglütinasyon testlerinden de olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir(3).

TNAase, fosfataz ve lysostaphine duyarlılık testlerinden elde edilen sonuçlar, bu testlerin *Staph.aureus*'un ayırımında koagulaz testi ile birlikte veya tek başlarına kullanılabilir nitelikte olduklarını göstermektedir. Severance ve ark. inceledikleri 108 *Staph.aureus* suşunun 106 suşının, lysostaphine duyarlı olduklarını, 58 *Staph.epidermidis* suşunun tümününün dirençli olduklarını bildirmişlerdir(8). Bu çalışmada elde edilen veriler bu araştırma ile paralellik göstermektedir.

Zarzour ve Belle, 447 *Staph.aureus* suşunun TNAase testinde olumlu sonuç verdiğini, buna karşın tavşan plazmasını koagule etmeyen 70 *Staph.epidermidis* suşunun TNAase negatif olduğunu bildirmiştir(11). Bu sonuçlar da, bulgularımız ile uyum içindedir.

Devriese, kanatlı orijinli *Staph.aureus* suşlarının DNAase ve TNAase testlerinde zayıf pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir(4). Bu çalışmada İncelenen 20 adet tavuk kökenli *Staph.aureus* suşu da TNAase ve DNAase testlerinde negatif bulunmuşlardır. Bu veriler de, stafilokokların ayırımında bir veya iki teste dayanarak verilen kararların her zaman kesin olmadığını açıkça göstermektedir.

Holmberg, incelediği 46 adet *Staph.aureus* suşunun %100 fosfataz pozitif olduğunu bildirmiştir(5). Bu araştırmada da, çeşitli biyokimyasal testler sonucunda *Staph.aureus* olduğu belirlenen tüm suşlar fosfataz pozitif bulunmuştur.

Sonuç olarak, *Staph.aureus* suşlarının diğer stafilokok türlerinden kesin ayrımı için koagulaz testinin yetersiz olup, TNAase fosfataz ve lysostaphine duyarlılık testlerinin de, doğru teşhise yardımcı olabilecek nitelikte metodlar olduklarını söyleyebiliriz.

#### Literatür

- 1- **Abramson, C.** (1973): *Staphylococcal enzymes*. In Cohen, J.O.(Ed), *Staphylococci*. Wiley-Interscience, New York, USA.
- 2- **Baird-Parker, A.C.** (1974): *Genus II. Staphylococcus* (Rosenbach 1884.18 nom.cons.) 483-489. In Buchanan, R.E.and Gibbons, N.E. (Ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- 3- **Davidson, S.K., Keller, K.F. and Doyle, R.J.** (1982): *Differentiation of coagulase positive and coagulase negative staphylococci by lectins and plant agglutinins*. J. Clin.Microbiol., 15:547-553.
- 4- **Devriese, L.A. and Van DeKerckhove, A.** (1979): *A comparison of methods and the validity of deoxyribonuclease tests for the characterization of staphylococci isolated from animals*. J.Appl.Bacteriol., 46: 385-393.
- 5- **Holmberg, O.** (1973): *Staphylococcus epidermidis isolated from bovine milk*. Acta Vet. Scand., Suppl., 45: 1-144.
- 6- **Pham, A.V.and Davis, G.H.G.** (1979): *A modified thermonuclease test for staphylococcus aureus identification*. Aust. J.Med. Technol., 10: 29-31.
- 7- **Rayman, M.K., Park, C.K., Philpott, J.and Todd, E.C.D.** (1975): *Reassessment of coagulase and thermo-stable nuclease tests as mean of identifying Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 29: 451-454.
- 8- **Severance, P.J., Kauffman, C.A.and Sheagren, J.N.** (1980): *Rapid identification of Staphylococcus aureus by using lysostaphin sentivity*. J.Clin.Microbiol., 11: 724-727.
- 9- **Sperberger, W.H.and Tatini, S.R.** (1975): *Interpratation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus*. Appl.Microbiol., 29: 502-505.
- 10- **Wegrznowicz, L., Heczko, P.B., Jeljaszewicz, J., Nevgebeuar, M.and Pulverer, G.** (1979): *Pseudocoagulase activity of staphylococci*. J.Clin.Microbiol., 9: 15-19.
- 11- **Zarzour, J.Y. and Belle, E.A.** (1978): *Evaluation of three test procedures for identification of Staphylococcus aureus from clinical sources*. J. Clin.Microbiol., 7: 133-136.

Yazı 21.1.1983 günü alınmıştır.