

# Biyofilm pozitif *Staphylococcus epidermidis* icaa gen ekspresyonuna, *Lactobacillus acidophilus* atcc 4356 kökeninin etkisinin in-vitro incelenmesi

Investigation of in-vitro effects of *Lactobacillus acidophilus* atcc 4356 strain on icaa gene expression of biofilm positive *Staphylococcus epidermidis*

Mehmet DEMİRCİ<sup>1</sup>  Akın YİĞİN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Turkey

<sup>2</sup> Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

## Öz.

**Amaç:** *Staphylococcus epidermidis* biyofilm oluşumu, bu bakterilerin antibakteriyel ilaçlara ve bağışıklık sistemi savunmasına karşı koruyan önemli bir bariyer görevi oluşturmaktadır. IcaA geni bunun oluşumu için önemlidir. *Lactobacillus* türlerinin probiyotik etkileri bilinmektedir. Bizde çalışmamızda, CRA yöntemi ile biyofilm pozitifliği saptanan *S. epidermidis* kökenlerinin icaA gen ekspresyonuna, *L. acidophilus* ATCC 4356 kökeninin in-vitro etkisinin incelenmesi amaçladık.

**Materyal ve metod:** Haziran – Aralık 2017 döneminde klinik örneklerden izole edilmiş olan ve CRA metodu ile biyofilm üretimi pozitif olarak saptanan yirmi (20) *S. epidermidis* kökeni çalışmamıza dahil edildi. CRA'da siyah pozitif kolonilerden, 2 McFarland'lık süspansiyonundan 250 µL alınarak, *L. acidophilus* içeren ve içermeyen 2 tüpe ilave edildi ve %5CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'da inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun 6. saatinde, tüplerden RNA izolasyonları gerçekleştirildi. cDNA sentezi sonrası, spesifik primerler ile LightCycler480 sisteminde real-time PCR yöntemi ile çalışıldı. Gruplara ait sonuçlar delta delta Ct yöntemi ile oluşturularak, Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak incelendi.

**Bulgular:** *L. acidophilus* ATCC 4356 etkileşimi sonrasında *S. epidermidis* kökenlerinde icaA gen ekspresyon seviyesinde gözlenen upregulasyon, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulundu ( $p < 0.0001$ ).

**Sonuç:** Sonuç olarak, çalışmamızda, in-vitro olarak, biyofilm yeteneği olan *S. epidermidis* kökenlerinin probiyotik etkili *L. acidophilus* ile etkileşimi sonrası icaA gen ekspresyon düzeyinde upregulasyon gösterdiğini saptadık. Diğer probiyotikleri de kapsayacak şekilde daha geniş kapsamlı bakteri-bakteri etkileşimi çalışmalarının yapılarak yeni stratejilerin geliştirilebileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** *Lactobacillus acidophilus*, Biyofilm, *Staphylococcus epidermidis*, icaA gen ekspresyonu

## Abstract

**Background:** The formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm is an important barrier to protecting these bacteria against antibacterial drugs and defense of the immune system. IcaA gene is important for the formation of this. The probiotic effects of *Lactobacillus* species are known. Aim of this study was to investigate the in-vitro effect of *L. acidophilus* ATCC 4356 genotype on the expression of the icaA gene in *S. epidermidis* strains, which were found to be positively biofilm with CRA method.

**Material and Methods:** Between June and December 2017, Twenty (20) *S. epidermidis* strains isolated from clinical specimens and detected as positive for biofilm production by CRA method were included the study. 250 µL of 2 McFarland suspension of black-positive colonies from the CRA were added to 2 vials containing with and without *L. acidophilus* and incubation was carried out at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. At the 6th hour of incubation, RNA was isolated from these tubes. After cDNA synthesis, real-time PCR was performed on the LightCycler480 system with specific primers. The results of groups by delta delta Ct method were statistically analyzed by Mann-Whitney U test.

**Results:** The upregulation at the level of icaA gene expression in *S. epidermidis* strains after *L. acidophilus* ATCC 4356 interaction was found statistically significant ( $p < 0.0001$ ) according to without *L. acidophilus*.

**Conclusions:** In conclusion, our study showed that in-vitro biofilm strains of *S. epidermidis* showed upregulation of icaA gene expression ratio after interaction with probiotic *L. acidophilus*. We believe that new strategies can be developed by conducting broader, bacterial-bacterial interaction studies, including other probiotics.

**Keywords:** *Lactobacillus acidophilus*, Biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, icaA gene expression

## Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Mehmet DEMİRCİ

Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD. Beylikdüzü,  
İstanbul, Türkiye

Tel: +90 533 710 6295,

E-mail: demircimehmet@hotmail.com

Geliş tarihi / Received: 26.09.2018

Kabul tarihi / Accepted: 25.10.2018

## Giriş

Staphylococcus epidermidis, koagülaz-negatif stafilokok grubunun bir üyesidir ve her insanın mikrobiyotasında kommensal olarak yer almaktadır (1). insanda özellikle deri mikrobiyotasında en fazla miktarda bulunan bakterilerden birisidir (2). Ancak, insanda tıbbi girişimler gibi vucut bütünlüğünde bozulmalar sonrası tıbbi cihazların kullanımı ile birlikte, S.epidermidis önemli bir fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkar (3). S.epidermidis ve diğer koagülaz negatif stafilokokların neden olduğu çoğu hastalık kronik bir karakterdedir ve cihazla ilişkili enfeksiyonlar (intravasküler kateter veya prostetik eklem enfeksiyonları gibi) ve bunların komplikasyonları olarak ortaya çıkar (4). Bu durumda, kullanılan tıbbi cihaz, enfeksiyonu kolaylaştırabilir, çünkü cerrahi alana yanlışlıkla sokulan herhangi bir S. epidermidis, tıbbi cihazın yüzeyine hızla yapışıp birikebilir. Yüzey ilişkili olarak gelişen bu bakteri artışı, biyofilm oluşumu olarak bilinir (5). Yapışkan özellikleri olan çok çeşitli yüzey proteinleri, S.epidermidis'in farklı yüzeylere yapışmasını sağlar (6). Birçok S. epidermidis kökeni, biyofilmdaki bakterileri birbirine bağlayan eksopolisakarit PIA (polisakarit hücreler arası adhesin) sentezinde yer alan proteinleri kodlayan icaADBC operonunu taşır (6). Operonun süreci, icaADBC genlerinin farklı kombinasyonlarını ve bir şeker vericisi olarak UDP-GlcNAc'yi ifade eden S. carnosus'un rekombinant suşlarında ayrıntılı bir çalışma ile incelenmiştir (7). IcaA, glikoziltransferaz 2 ailesine ait, 412 aminoasitlik ve dört transmembran alanına sahip entegre bir membran proteindir ve 20 GlcNAc birimine kadar  $\beta$ -1,6'ya bağlı GlcNAc oligosakkaritlerinin sentezini yönlendirir (1). Probiyotiklerin, insan vücudunda, erken mikrobiyota oluşumunu teşvik etmek için önemli bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir, büyüme, immünolojik homeostazın stabilizasyonu etkileri dolayısıyla enfeksiyon ve atopik hastalıkların riskini azaltmada yararlı etkileri olabileceği son yıllarda düşünülmektedir (8). Klinik çalışmalar, Lactobacillus türlerinin probiyotik etkilerini göstermiştir (9). Bizde bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, Congo red agar (CRA) yöntemi ile biyofilm pozitifliği saptanan S. epidermidis kökenlerinin icaA gen ekspresyonuna, L. acidophilus ATCC 4356 kökeninin in-vitro etkisinin incelenmesini amaçladık.

## Materyal ve Metod

Haziran – Aralık 2017 döneminde klinik örneklerden izole edilmiş olan ve Congo red agar (CRA) metodu ile (10) biyofilm üretimi pozitif olarak saptanan 20 S. epidermidis kökeni çalışmamıza dahil edildi. Congo red agar besiyerinde biyofilm üretimi pozitifliği gösteren siyah kolonilerinden, steril tuzlu su içinde hazırlanan 2 McFarland'lık süspansiyonundan 250  $\mu$ L alınarak, içeriğinde triptik soy broth (TSB) besiyeri bulunan 2 tüpe ilave edildi. 1. tüpte 106 CFU/mL miktarında Lactobacillus acidophilus ATCC

4356 bulunurken, 2 besiyerinde Lactobacillus bulunmuyordu. Her iki tüp %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'da inkübasyona bırakıldı. S.epidermidis ATCC 35984 kökeni, kontrol köken olarak tüm çalışmalarda kullanıldı ve bu köken içinde işlem uygulandı. Tüpler, inkübasyonun 6. saatinde, etüvden alınarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonları, High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmBH, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda yapıldı. RNA'lar cDNA işlemi yapıncaya kadar -80°C'da saklandı. RNA'lardan cDNA sentezi için öncelikle spektrofotometrik okumaları Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, MA, Amerika) cihazında üretici direktifleri kullanılarak yapıldı. 100 ng/ $\mu$ L RNA'lardan, First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanarak üretici direktifleri doğrultusunda komplementer DNA'lar (cDNA) hazırlandı. cDNA'lar real-time PCR aşamasına kadar -20°C'da saklandı. icaA gen ekspresyonlarının tespiti için; icaA bölgesine spesifik; icaA-1 F (GGAAGTTCTGATAACTACTGCTG) ve icaA-1 R (GATGCTTGTTT-GATTCCCTC) ile referans gen olarak kullanılan (giraz B) gyrB bölgesine spesifik; gyrB-3 F (GGAGGTTAAATTCG-GAGGT) ve gyrB-3 R (CTTGATGATAAATCGTGCCA) primerleri real-time PCR'da kullanıldı (11). LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, GmBH, Mannheim, Almanya) sisteminde LightCycler 480 Sybr green I master (Roche Diagnostics, GmBH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak icaA gen ekspresyonu çalışması gerçekleştirildi. gyrB geni çalışmada referans gen olarak kullanıldı ve Livak ve Schmittgen'in (12)  $\Delta\Delta$ Ct yöntemine göre gen ekspresyon oranları çıkartılarak Lactobacillus acidophilus'un, S. epidermidis icaA gen ekspresyonu üzerine in-vitro etkisi kontrol edildi. Sonuçlar IBM SPSS versiyon 20 programı kullanılarak Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen ve L. acidophilus ATCC 4356 kökeni ile etkileşimi sonrası incelenen biyofilm etkinliği pozitif 20 S. epidermidis kökeninin icaA gen ekspresyon sonuçları Tablo 1'de gösterilmektedir.

L. acidophilus ATCC 4356 etkileşimi sonrasında S. epidermidis kökenlerinde icaA gen ekspresyon seviyesinde gözlenen upregulasyon, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulundu ( $p < 0.0001$ ). (Tablo 2).

## Tartışma

S.epidermidis biyofilm oluşumu için poli-N-asetilglukozamin (PNAG) üretimi çok önemlidir ve icaADBC operon kümesinin gen ürünleri aracılığı ile biyofilm sentezi gerçekleştirilir (13). Biyofilm oluşumu, bu bakterileri antibakteriyel ilaçlara ve bağışıklık sistemi savunmasına karşı koruyan önemli bir bariyer görevi oluşturmaktadır (14).

Tablo 1. L. acidophilus ATCC 4356 kökeni ile etkileşimi sonrası S. epidermidis kökenlerinin real-time PCR delta delta Ct yöntemi ile icaA gen ekspresyonu sonuçları

No	L. acidophilus ATCC 4356	
	Pozitif	Negatif
1	1.32	0.68
2	1.17	0.59
3	1.43	0.74
4	1.54	0.79
5	1.69	0.76
6	1.23	0.54
7	1.36	0.59
8	1.24	0.48
9	1.32	0.65
10	1.19	0.51
11	0.98	0.46
12	1.24	0.59
13	1.41	0.71
14	1.15	0.64
15	1.24	0.41
16	1.18	0.57
17	1.21	0.61
18	1.03	0.58
19	0.96	0.44
20	1.32	0.42

Tablo 2. S.epidermidis kökenlerinin, L.acidophilus ATCC 4356 kökeni varlığında icaA gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı

	L. acidophilus ATCC 4356		
	Pozitif	Negatif	P**
Ortalama+SS*	1.25±0.18	0.61±0.14	0.0001
Min - Max	0.96-1.69	0.41-1.00	
SE*	0.39	0.31	

\*SS: Standart sapma, SE: Standart Hata, Min: Minimum, Max: Maksimum. \*\*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır.

S. epidermidis, tıbbi cihazlar gibi kalıcı biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir patojen olduğu için (14), bunun biyofilm üretimini azaltımını sağlayacak stratejiler geliştirilmesi bu enfeksiyonların önlenmesi için önemlidir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Crawford ve ark.(15), 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada 16 S. epidermidis kökeninde bizim çalışmamızdaki gibi gyrB referans geni kullanarak 0.6 düzeyinde icaA gen ekspresyonu saptadıkları görülmektedir. Bu çalışmamız da saptadığımız 0.61 düzeyine oldukça benzer olduğu görülmektedir.

Probiyotik etkileri dolayısıyla Lactobacillus kullanılarak yapılan etkileşim çalışmalarında sıklıkla S. aureus türünün incelendiği ve S. epidermidis kökenleri için böyle bir çalışmanın yapılmadığı araştırılan literatürlerde gözlenmiştir (16,17).

Her ne kadar aynı yönde bir etkileşim olmasa da; Nuryastuti ve ark. (11), 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında

tarçın yağının S. epidermidis icaA gen ekspresyonunu bazı örneklerde rölaf olarak 40 kat kadar düşürdüğünü göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da L. acidophilus ATCC 4356 kökeni icaA gen ekspresyon düzeyini 2 kat düzeyinde arttırdığı görülmektedir. Aradaki upregulasyon farkının nedenini, tarçının antimikrobiyal etkinliğinin olması kaynaklı olduğu kanaatindeyiz. Bu düşüncemizi destekler nitelikte olan bir başka çalışmada, Reiter ve ark. (18) 2015 yılında, linozolid'in S. epidermidis icaA gen ekspresyonu düzeyine etkisini incelemişler ve bu antibiyotikle etkileşimi sonrası kökenlerde icaA gen ekspresyon düzeyinin 5.18 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Yine bir başka çalışmada da, Szczuka ve ark. (19), siprofloksasin'in etkisini incelemişler ve S. epidermidis'in bu antibiyotikle etkileşimi sonrası icaA gen ekspresyon düzeyini arttırdığını göstermişlerdir.

Holz ve ark. (20), 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, L. brevis ekstraktlarının insan deri florasına uygulandıklarında, etkileri ile S. epidermidis'in çoğalmasının arttığını vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda, L. acidophilus ile etkileşiminde S. epidermidis, antimikrobiyallerle karşılaşmasına benzer bir tepki vermiş olmasına karşın bunun nedeninin de, probiyotik etkileri düşünülen her Lactobacillus türünün etkileşimlerinde farklılıklar ortaya çıkarabileceği fikrini bize düşündürmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda, in-vitro olarak, biyofilm yeteneği olan S. epidermidis kökenlerinin probiyotik etkili L.acidophilus ile etkileşimi sonrası icaA gen ekspresyon düzeyinde upregulasyon gösterdiğini saptadık. Biyofilm yeteneği S. epidermidis'lerin tıbbi cihazlarla olan enfeksiyonlarında önemli virülans yeteneklerinden birisi olduğu için, L. acidophilus'un bu yönde kullanılamayacağını bize düşündürmüştür. Diğer probiyotikleri de kapsayacak şekilde daha geniş kapsamlı bakteri-bakteri etkileşimi çalışmalarının yapılarak yeni stratejilerin geliştirilebileceği kanaatindeyiz.

## Kaynaklar

1. Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015; 5:14. doi:10.3389/fcimb.2015.00014.
2. Otto M. Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. *Seminars in Immunopathology*. 2012; 34(2):201-214. doi:10.1007/s00281-011-0296-2.
3. Sabaté Brescó M, Harris LG, Thompson K, et al. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:1401. doi:10.3389/fmicb.2017.01401.
4. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23(1):73-98. doi: 10.1016/j.idc.2008.10.001.
5. Hogan S, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(1):100-13.
6. Salgueiro VC, Iorio NLP, Ferreira MC, Chamon RC, dos Santos KRN. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and

- nasal Staphylococcus epidermidis isolates from neonates. BMC Microbiology. 2017; 17:15. doi:10.1186/s12866-017-0930-9.
7. Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem. 1998; 273(29):18586-93.
  8. Härtel C, Pagel J, Spiegler J, et al. Lactobacillus acidophilus/Bifidobacterium infantis probiotics are associated with increased growth of VLBWI among those exposed to antibiotics. Scientific Reports. 2017; 7:5633. doi:10.1038/s41598-017-06161-8.
  9. Sun B, Hu C, Fang H, Zhu L, Gao N, Zhu J. The Effects of Lactobacillus acidophilus on the Intestinal Smooth Muscle Contraction through PKC/MLCK/MLC Signaling Pathway in TBI Mouse Model. Hu W, ed. PLoS ONE. 2015; 10(6):e0128214. doi:10.1371/journal.pone.0128214.
  10. Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y. Biofilm-forming capacity of Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa from ocular infections. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53(9):5624-31. doi: 10.1167/iovs.11-9114.
  11. Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, Irvati S, Aman AT, Krom BP. Effect of Cinnamon Oil on icaA Expression and Biofilm Formation by Staphylococcus epidermidis. Applied and Environmental Microbiology. 2009; 75(21):6850-6855. doi:10.1128/AEM.00875-09.
  12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402-8.
  13. Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Gugnani HC. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of Staphylococcus epidermidis isolated from clinical samples in Iran. AMB Express. 2015; 5:47. doi:10.1186/s13568-015-0134-3.
  14. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Future microbiology. 2010; 5(6):917-933. doi:10.2217/fmb.10.56.
  15. Crawford EC, Singh A, Metcalf D, Gibson TW, Weese SJ. Identification of appropriate reference genes for qPCR studies in Staphylococcus pseudintermedius and preliminary assessment of icaA gene expression in biofilm-embedded bacteria. BMC Research Notes. 2014; 7:451. doi:10.1186/1756-0500-7-451.
  16. Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. Lactobacillus reuteri Protects Epidermal Keratinocytes from Staphylococcus aureus-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78(15):5119-5126. doi:10.1128/AEM.00595-12.
  17. Johansson MA, Björkander S, Mata Forsberg M, et al. Probiotic Lactobacilli Modulate Staphylococcus aureus-Induced Activation of Conventional and Unconventional T cells and NK Cells. Frontiers in Immunology. 2016; 7:273. doi:10.3389/fimmu.2016.00273.
  18. Reiter KC, Sant'Anna FH, d'Azevedo PA. Upregulation of icaA, atlE and aap genes by linezolid but not vancomycin in Staphylococcus epidermidis RP62A biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43(3):248-53. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.003.
  19. Szczuka E, Jabłońska L, Kaznowski A. Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of Staphylococcus epidermidis. Microbiology. 2017; 163(5):712-718. doi:10.1099/mic.0.000453.
  20. Holz C, Benning J, Schaudt M, Heilmann A, Schultchen J, Goelling D, Lang C. Novel bioactive from Lactobacillus brevis DSM17250 to stimulate the growth of Staphylococcus epidermidis: a pilot study. Benef Microbes. 2017; 8(1):121-131. doi: 10.3920/BM2016.0073.