

# Kan Dolaşımı Enfeksiyon Etkeni ve Kontaminasyon Olarak Tanımlanan Koagülaz Negatif Stafilokok İzolatlarında *sasX*, ACME ve Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması

## Investigation of *sasX*, ACME and Various Virulence Factors in Coagulase Negative Staphylococcal Strains Identified as Bloodstream Infection Agents and Contamination

Büşra DÖNMEZ<sup>1</sup> (ID), Melek DEMİR<sup>2</sup> (ID)

<sup>1</sup> Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Karabük.

<sup>1</sup> Karabük Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Karabük, Türkiye.

<sup>2</sup> Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

<sup>2</sup> Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Türkiye.

\* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (2022TIPF014) desteklenmiştir.

\*\* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık tezi olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Dönmez B, Demir M. Kan dolaşımı enfeksiyon etkeni ve kontaminasyon olarak tanımlanan koagülaz negatif stafilokok izolatlarında *sasX*, ACME ve çeşitli virülans faktörlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(4):408-421.

### ÖZ

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatlarında *sasX*, arjinin katabolik mobil eleman [arginine catabolic mobile element (ACME)] genlerinin, biyofilm yapımının ve biyofilm ilişkili bazı virülans faktör genlerinin etken ve kontaminant olarak tanımlanmış izolatlardaki sıklığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 150 KNS izolatının 50'si etken, 100'ü kontaminasyon olarak gruplandırılmıştır. İzolatların biyofilm oluşumu mikroplak yöntemiyle; *sasX*, ACME, *mecA* ve biyofilm ilişkili virülans faktör genleri *icaA*, *icaD*, *aap*, *bhp* ve *IS256* varlığı ise in-house polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırılmıştır. Etken grubundaki izolatların %52'si, kontaminasyon grubundaki izolatların ise %57'si fenotipik olarak biyofilm oluştururken; biyofilm pozitifliğinin düzeyleri karşılaştırıldığında etken grubundaki izolatların (%30), kontaminasyon grubundaki izolatlara (%14) göre daha fazla güçlü düzeyde biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir ( $p=0.027$ ). Biyofilm ilişkili *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* genleri kontaminasyon grubundaki izolatlarda sırasıyla, %33, %45, %43, %74 ve %6 oranında; etken grubundaki izolatlarda ise %64, %62, %64, %74 ve %8 oranında pozitif bulunmuştur. ACME gen bölgeleri *arcA*, *kdpA* ve *opp3B* ve *sasX* ilişkili gen bölgesi kontaminasyon grubundaki izolatlarda sırasıyla, %30, %7, %8 ve %14 oranında; etken grubundaki izolatlarda ise %12, %2, %6 ve %10 oranında pozitif bulunmuştur. Etken grubunda *icaA*, *icaD* ve *IS256* genlerinin tek başına ya da birlikte pozitifliği (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p=0.050$ ,  $p=0.015$ ), kontaminasyon grubunda ise ACME ve *arcA* pozitifliği (sırasıyla  $p=0.008$ ,  $p=0.015$ ) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. *sasX*, *aap* ve *bhp* genleri için iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Sonuç olarak kan kültürlerinden elde edilen KNS izolatlarından güçlü biyofilm oluşturan, biyofilm ilişkili gen bölgelerini tek başına ya da birlikte bulunduran izolatlar enfeksiyon

etkeni; enfeksiyonun klinik bulgularının yokluğunda *arcA* pozitif saptanan izolatların ise kontaminant olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *KNS; sasX; ACME; biyofilm.*

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the frequency of *sasX*, arginine catabolic mobile element (ACME) genes, biofilm formation and some biofilm related virulence factor genes in causative and contaminant coagulase negative staphylococci (CNS) strains isolated from blood cultures. Of the 150 CNS strains included in the study, 50 were grouped as infectious agents and 100 as contaminants. Biofilm formation of the strains was investigated by microplate method and the presence of *sasX*, ACME, *mecA* and biofilm associated virulence factor genes *icaA*, *icaD*, *aap*, *bhp* and *IS256* were investigated by in-house polymerase chain reaction method. While 52% of the strains in the infectious agents group and 57% of the strains in the contamination group phenotypically formed biofilm; when the levels of biofilm positivity were compared, it was observed that the strains in the infectious agents group (30%) formed biofilm at a stronger level than the strains in the contamination group (14%) ( $p= 0.027$ ). Biofilm-associated *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* and *bhp* genes were found positive in 33%, 45%, 43%, 74% and 6% of the strains in the contamination group and 64%, 62%, 64%, 74% and 8% of the strains in the infectious agents group, respectively. ACME gene regions *arcA*, *kdpA* and *opp3B* and *sasX* related gene region were found positive in 30%, 7%, 8% and 14% of the strains in the contamination group and in 12%, 2%, 6% and 10% of the strains in the infectious agents group, respectively. The positivity of *icaA*, *icaD* and *IS256* genes alone or together in the infectious agents group ( $p < 0.001$ ,  $p= 0.050$ ,  $p= 0.015$ , respectively) and the positivity of ACME and *arcA* in the contamination group ( $p= 0.008$ ,  $p= 0.015$ , respectively) were statistically significantly higher. No significant difference was found between the two groups for *sasX*, *aap* and *bhp* genes. In conclusion, among the CNS strains isolated from blood cultures, strains that form a strong biofilm and are positive for biofilm-associated gene regions alone or together can be considered as infectious agents, while strains that are found to be *arcA* positive in the absence of clinical signs of infection can be considered as contaminants.

**Keywords:** *CNS; sasX; ACME; biofilm.*

## GİRİŞ

Deri ve mukoza membranlarında mikrobiyota üyesi olan koagülaz negatif stafilkoklar (KNS); son yıllarda doğal mukoza bariyerlerinin zarar görmesi, biyofilm oluşumu için yüzey oluşturan implante edilebilir cihazların varlığında ve çeşitli nedenlerle savunma mekanizmaları zayıflamış kişilerde önemli nozokomiyal patojenler haline gelmiştir<sup>1,2</sup>. Çeşitli yaş grupları ve coğrafik bölgelerde prevalansı değişmekle birlikte kan dolaşım enfeksiyonları ve kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında KNS'lerin tanımlanma sıklığı artmaktadır<sup>3</sup>. Kan kültüründe aynı zamanda deri mikrobiyotasının bir üyesi olan KNS türlerinin izole edilmesi durumunda enfeksiyon etkeni veya kontaminasyon kararı vermek zorlayıcı olabilmektedir. Mikrobiyota üyesi KNS'lerin yanlış olarak enfeksiyon etkeni şeklinde yorumlanması gereksiz antibiyotik tedavisi ve antibiyotik direncine, hastane yatışları ve sağlık bakım harcamalarının artmasına ya da implante edilmiş cihazların gereksiz yere çıkarılmasına neden olabilirken; yanlış olarak mikrobiyota üyesi şeklinde yorumlanması ise hastaların tanı ve tedaviye ulaşımının gecikmesine neden olmaktadır<sup>4</sup>.

Kan kültüründe izole edilen KNS'lerin enfeksiyon etkeni/kontaminasyon ayrımında enfeksiyona yönelik klinik ve laboratuvar bulgularının varlığı yanı sıra; elde edilen izolatin

morfolojik özellikleri, tür düzeyinde tanımlanması, antimikrobiyal duyarlılığı, pozitif set sayısı ve pozitif sinyale kadar geçen süre gibi üreme ve mikrobiyolojik özelliklerinin birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir<sup>5</sup>. Bu kriterlere ek olarak enfeksiyon etkeni ve kontaminant KNS türlerini ayırt etmek için elde edilen izolata; biyofilm oluşturma kapasitesi, biyofilm ve sasX ilişkili gen bölgeleri, IS256 ekleme dizisinin varlığı, antibiyotik direnç kazanımı ve arjinin metabolizması başta olmak üzere virülansa katkı yapan çeşitli özelliklerinin araştırılması yol gösterici bir yöntem olabilir<sup>2,6-11</sup>. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilmiş olan KNS türlerinde fenotipik olarak biyofilm yapımı, sasX, arjinin katabolik mobil eleman [arginine catabolic mobile element (ACME)] ve biyofilm ilişkili bazı virülans faktör genlerinin araştırılarak, enfeksiyon etkeni ve kontaminant olarak tanımlanmış izolatlardaki sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (Evrak Tarih ve Sayısı: 25.02.2022-E.175570) onaylandı.

### Bakterilerin İzolasyonu, Etken ve Kontaminant Olarak Sınıflandırılması

Pamukkale Üniversite Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında kan dolaşımı enfeksiyonu ön tanısıyla en az iki set kan kültürü alınmış hastalardan elde edilen 150 KNS izolatu çalışmaya dahil edildi. Örnekler BD BACTEC FX (Becton Dickinson and Company, Sparks, ABD) kan kültür takip sistemi kullanılarak yedi gün boyunca izlendi. Pozitif sinyal veren şişelere Gram boyaması yapılarak subkültür ekimleri yapıldı. Yüzde beş koyun kanlı agarda üreyen gram-pozitif kok morfolojisinde, katalaz testi pozitif, koagülaz testi negatif izolatlar KNS olarak değerlendirildi. KNS izolatları BD Phoenix-100 (Becton Dickinson and Company, Sparks, ABD) otomatize bakteri tanımlama sistemiyle tür düzeyinde tanımlanarak antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. Metisilin direnci otomatize sistem verilerine ek olarak sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle de araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] klinik sınır değerleri kullanılarak yorumlandı<sup>12</sup>. Rehber önerileri doğrultusunda 100 izolat kontaminasyon grubunda, 50 izolat ise etken grubunda sınıflandırıldı<sup>5</sup>.

### İzolatların Biyofilm Oluşumunun Fenotipik Olarak Araştırılması

Biyofilm oluşumunun fenotipik olarak belirlenmesi için mikropalak yöntemi literatür önerileri doğrultusunda modifiye edilerek çalışıldı<sup>13</sup>. Kanlı agardaki taze bakteri kolonilerinden 0.5 McFarland ( $10^8$  kob/mL) standardında hazırlanmış bakteri süspansiyonlarından 20 µl, %1 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyyondan (BHI) 180 µl alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalak kuyucuklarına aktarıldı. Mikropalak 24 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün her kuyucuk 200 µl PBS (pH 7.2) çözeltisi pipetlenerek üçer defa yıkandıktan sonra fiksasyon işlemi için 37 °C'de iki saat inkübe edildi. Ardından her kuyucuk 150 µl %0.1'lik kristal viyole ile boyanarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikropalak akan suda yıkandı, ters çevrilerek oda

sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ardından her kuyucuğa 150 µl %95'lik etanol eklenerek boyanın çözünmesi için 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanmadan inkübe edildi<sup>13</sup>. İnkübasyon süresi sonunda mikropalak ELISA okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutuldu<sup>14</sup>. Her mikropalak çalışmasında, pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve negatif kontrol suşu olarak *S.epidermidis* ATCC 12228'de test edildi<sup>13</sup>. Negatif kontrol *S.epidermidis* ATCC 12228'den elde edilen optik dansite ortalamasının üzerine negatif kontrolün üç standart sapması eklenerek elde edilen değer, çalışmaya ait cut-off değeri (Odc) olarak kabul edildi. Sonuçlar elde edilen optik dansitelere göre değerlendirilerek Tablo I'de belirtildiği şekilde sınıflandırıldı<sup>13</sup>.

**Tablo I. Biyofilm Oluşumunun Elde Edilen Optik Dansite Değerlerine Göre Sınıflandırılması**

Elde Edilen Optik Dansite	Biyofilm Sonucu
$OD \leq ODc$	Negatif
$ODc < OD \leq 2 \times ODc$	Zayıf düzeyde pozitif
$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$	Orta düzeyde pozitif
$4 \times ODc < OD$	Güçlü düzeyde pozitif

### **Bakteriyel DNA'nın İzolasyonu, *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap*, *bhp*, *sasX* ve ACME İlişkili Gen Bölgeleri *arcA*, *kdpA*, *opp3B*'nin Varlığının Araştırılması**

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde kaynatma yöntemi kullanıldı. Koagülaz negatif stafilokok izolatlarının %5 koyun kanlı agarda üreyen kolonilerinden birkaç koloni alınıp BHI buyyon içine homojen olarak süspanse edilerek bir gece 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf mikrosantrifüj tüpüne 1 ml alınarak 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı atıldı. Dipte kalan çökelti üzerine 200 µl steril distile su ilave edilerek Thermo Block TDB-120 (BIOSAN Medical-Biological Research and Technologies) cihazında 10 dakika boyunca 100 °C'de inkübe edildi. Ardından tekrar 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın 150 µl'si alınarak polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanıldı<sup>15</sup>. Gen bölgelerinin varlığı her bir örnek için toplam amplifikasyon karışımı 50 µl olacak şekilde in-house PCR yöntemiyle araştırıldı. Polimeraz zincir reaksiyon çalışmaları ACME ilişkili gen bölgeleri multipleks, diğer gen bölgeleri ise ayrı ayrı olarak Tablo II'de belirtilen primerler ve döngü koşulları kullanılarak gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyon ürünleri TBE tamponu (1X) ile hazırlanmış ve etidyum bromür ile boyanmış %1.5 agaroz jelde 110 volt akımda 50 dakika elektroforez cihazında (nanoPAC-300P Cleaver Scientific, Birleşik Krallık) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları ultraviyole translüminatör altında görüntüledi. Amplifiye edilen DNA ürünü 100 baz çifti [base pair (bp)] DNA moleküler belirteci (DNA ladder H3 RTU GeneDirex) ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

**Tablo II.** Araştırılan Gen Bölgelerine Ait Primerler, PCR Döngü Koşulları ve Amplifiye Edilen Ürünlerin Boyutları

Araştırılan Gen Bölgesi	Kullanılan Primer	Ürün Boyutu (bp)	PCR Döngü Koşulları
<i>icaA</i>	F (5'-TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA-3') R (5'-TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA-3') <sup>17</sup>	188	94 °C 5 dk 35 döngü; 94 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 1 dk 72 °C 5 dk <sup>18</sup>
<i>icaD</i>	F (5'-ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG) R (5'-CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA) <sup>17</sup>	198	30 döngü; 95 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 30 sn <sup>19</sup>
<i>IS256</i>	F (5'-TGA AAA GCG AAG AGA TTC AAA GC-3') R (5'-ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3') <sup>20</sup>	1102	30 döngü; 94 °C 1 dk 59 °C 1 dk 72 °C 2 dk 30 sn <sup>20</sup>
<i>sesD (bhp)</i>	F (5'-ATG AAA AAT AAA CAA GGA TTT C-3') R (5'-GCC TAA GCT AGA TAA TGT TTG-3') <sup>21</sup>	1278	94 °C 3 dk 30 döngü; 94 °C 1 dk 50 °C 1 dk 72 °C 1 dk <sup>22</sup>
<i>sesF (aap)</i>	F (5'-ATA CAA CTG GTG CAG ATG GTT G-3') R (5'-GTA GCC GTC CAA GTT TTA CCA G-3') <sup>21</sup>	400	94 °C 3 dk 30 döngü; 94 °C 1 dk 50 °C 1 dk 72 °C 1 dk 72 °C 5 dk <sup>21</sup>
<i>mecA</i>	F: 5'-GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT-3' R: 5'-GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT-3' <sup>18</sup>	154	94 °C 5 dk 35 döngü; 94 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 1 dk 72 °C 5 dk <sup>18</sup>
<i>sasX</i>	F: 5'-AGA ATT AGA AGT ACG TCT AAA TGC-3' R: 5'-GCT GAT TAT GTA AAT GAC TCA AAT G-3' <sup>23</sup>	522	94 °C 3 dk 35 döngü; 94 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 1 dk 72 °C 5 dk <sup>18</sup>
<i>ACME arcA</i>	F: 5'-GAG CCA GAA GTA CGC GAG-3' R: 5'-CAC GTA ACT TGC TAG AAC GAG-3' <sup>16</sup>	724	94 °C 2 dk 35 döngü; 94 °C 30 sn
<i>ACME opp3</i>	F: 5'-GGA TTC GCC CAA GTG ATG ACC-3' R: 5'-GAC TGC TGG GTA TGA CGT-3' <sup>16</sup>	530	60 °C 30 sn 72 °C 45 sn
<i>ACME kdpa</i>	F: 5'-CGG TTT AAC TGG TGC GTT-3' R: 5'-GCA ATA CAT ACA GCG TAG CC-3' <sup>16</sup>	241	72 °C 5 dk <sup>16</sup>

*S.epidermidis* ATCC 35984 *mecA*, biyofilm ilişkili gen bölgeleri ve *sasX* için, *S.epidermidis* ATCC 12228 ise *arcA* için pozitif kontrol olarak kullanıldı<sup>11,16</sup>. Amplifikasyon sonucunda Tablo II'de belirtilmiş olan amplifikasyon ürün boyutlarında bantların görülmesi aranan gen bölgesinin varlığı için pozitif olarak değerlendirildi. ACME pozitif izolatlar *arcA*, *kdpA* ve *opp3B*'nin tek başına ya da birlikte bulunmasına göre ACME tip 1 (*arcA* ve *opp3B*), ACME tip 2 (*arcA*), ACME tip 3 (*opp3B*), ACME tip 4 (*arcA* ve *kdpA*) ve ACME tip 5 (*arcA*, *kdpA* ve *opp3B*) olarak sınıflandırıldı<sup>16</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v25.0 (Armonk, NY, IBM Corp.) paket programıyla analiz edildi. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde dağılımları şeklinde verildi. Kategorik değişkenler arasındaki farklar Pearson ki-kare testi ve Fisher'in kesin testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel analizlerde p değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

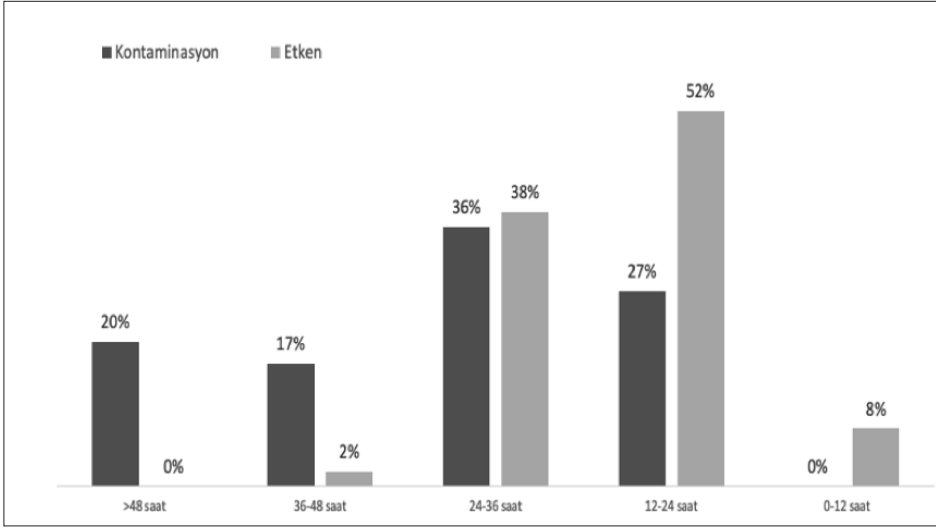
### BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen KNS izolatlarının 68 (%45.3)'i kadın, 82 (%54.7)'si erkek hastalardan izole edilmiştir. Koagülaz negatif stafilokok izolatlarının 68 (%45.3)'i yoğun bakım ünitesinde, 25 (%16.7)'i hematoloji - onkoloji servisinde, 38 (%25.3)'i çeşitli dahili servislere, 15 (%10)'i cerrahi servislere ve 4 (%2.7)'ü ise pediatri servisinde tedavi alan hastalardan izole edilmiştir. Etken grubundaki 35 (%70) izolatin, kontaminasyon grubundaki 18 (%18) izolatin elde edildiği hastalarda kateter bulunurken iki grup arasındaki fark etken grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

İzolatların 95 (%63.3)'i *S.epidermidis*, 25 (%16.7)'i *Staphylococcus hominis*, 22 (14.7)'si *Staphylococcus haemolyticus*, 6 (%4)'sü *Staphylococcus capitis*, 1 (%0.7)'i *Staphylococcus intermedius* ve 1 (%0.7)'i *Staphylococcus warneri* olarak tanımlanmıştır. *S.epidermidis* her iki grupta da en yüksek sayıda izole edilen tür olarak belirlenirken kontaminasyon grubunda ikinci en sık tanımlanan izolat *S.hominis*, etken grubunda ise *S.haemolyticus* olmuştur.

Kontaminasyon grubundaki izolatların ortalama pozitif sinyal süresi 35.81 saat, etken grubundaki izolatların ise 21.78 saat olarak bulunmuştur. Kontaminasyon grubundaki izolatlar en fazla 24-36 saat aralığında (%36), etken grubundaki izolatlar ise 12-24 saat aralığında sinyal vermiştir (%52). Grupların pozitif sinyal verme süreleri analiz edildiğinde etken grubundaki izolatlar kontaminasyon grubundaki izolatlara göre daha erken pozitif sinyal verirken; izolatların 12-24 saat aralığında sinyal vermesi etken ve 36-48 saat aralığında sinyal vermesi ise kontaminasyon lehine anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Etken ve kontaminasyon grubundaki izolatların pozitif sinyal süreleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

Metisilin direnci sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle fenotipik olarak araştırılmış; tüm izolatların 122 (%81.3)'si dirençli bulunmuştur. *mecA* gen bölgesinin varlığı PCR yöntemiyle araştırıldığı etken grubundaki izolatların 42 (%84)'sinde, kontaminasyon gru-



Şekil 1. Etken ve kontaminasyon grubundaki izolatların pozitif sinyal süreleri.

bundaki izolatların ise 83 (%83)'ünde olmak üzere toplam 125 (%83.3) izolatta pozitif bulunmuştur. Etken ve kontaminasyon grubundaki izolatların metisilin direnci karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (sefoksitin yönüyle  $p=0.138/mecA$  geni varlığı  $p=0.877$ ).

Etken grubundaki izolatların 26 (%52)'sı, kontaminasyon grubundaki izolatların ise 57 (%57)'si fenotipik olarak biyofilm oluşturmuştur. Gruplar arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0.561$ ). Gruplarda biyofilm pozitifliğinin düzeyleri (zayıf, orta, güçlü) karşılaştırıldığında ise etken grubundaki izolatlar (%30) kontaminasyon grubundaki izolatlarla (%14) göre daha fazla güçlü düzeyde biyofilm oluşturmuştur ( $p=0.027$ ). Etken ve kontaminasyon grubundaki izolatların fenotipik olarak biyofilm oluşumu Tablo III'te gösterilmiştir.

Biyofilm ilişkili gen bölgeleri *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kontaminasyon grubundaki izolatların 33 (%33)'ünde *icaA*, 45 (%45)'inde *icaD*, 43 (%43)'ünde *IS256* pozitif bulunurken; etken grubundaki izolatların 32 (%64)'sinde *icaA*, 31 (%62)'inde *icaD*, 32 (%64)'sinde *IS256* pozitif bulunmuştur. Etken grubundaki

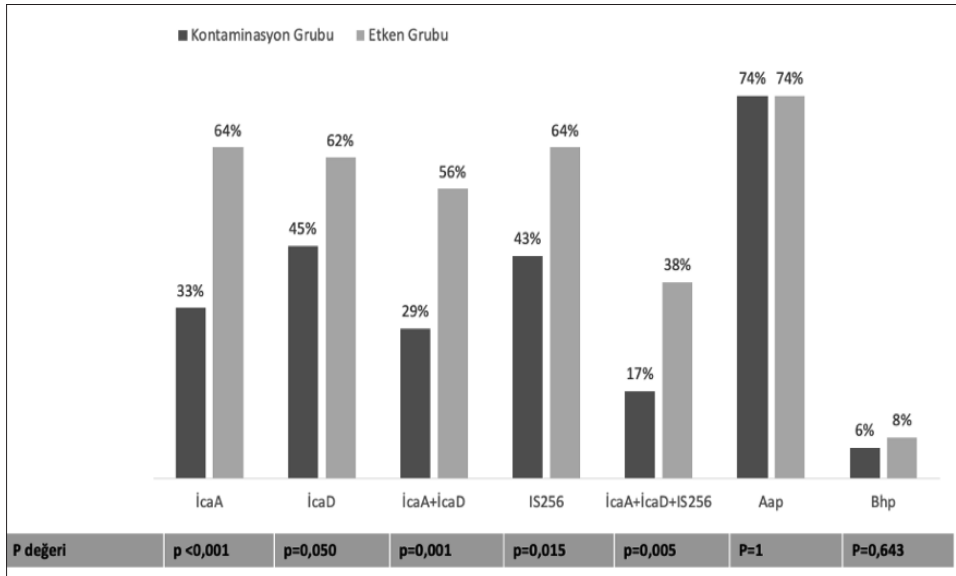
Tablo III. Etken ve Kontaminasyon Grubundaki İzolatların Fenotipik Olarak Biyofilm Oluşumu

Biyofilm Oluşumu	Negatif	Pozitif			Toplam
		Zayıf, n (%)	Orta, n (%)	Güçlü, n (%)	
Biyofilm düzeyi	Negatif, n (%)	Zayıf, n (%)	Orta, n (%)	Güçlü, n (%)	n (%)
Kontaminasyon grubu	43 (43)	30 (30)	13 (13)	14 (14)	100 (100)
Etken grubu	24 (48)	9 (18)	2 (4)	15 (30)	50 (100)
Toplam	67 (44.7)	39 (26)	15(10)	29 (19.3)	150 (100)

\*Tabloda satır yüzdesi hesaplanmıştır.

izolatlarda kontaminasyon grubundaki izolatlar göre daha yüksek oranda *icaA*, *icaD* ve *IS256* pozitif saptanırken, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p değerleri  $p < 0.001$ ,  $p = 0.05$ ,  $p = 0.015$ ). *icaA* ve *icaD* kontaminasyon grubundaki 29 (%29) izolatta, etken grubundaki 28 (%56) izolatta birlikte pozitif bulunmuştur. Her iki gen bölgesinin birlikte pozitifliği etken grubunda kontaminasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ( $p = 0.001$ ). Kontaminasyon grubundaki 17 (%17) izolatta, etken grubundaki 19 (%38) izolatta *icaA*, *icaD* ve *IS256* genleri birlikte pozitif bulunmuştur. Etken grubundaki izolatlar kontaminasyon grubundaki izolatlar göre üç gen bölgesinin birlikte pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p = 0.005$ ). Kontaminasyon grubundaki altı izolatta (%6) *bhp*, 74 (%74) izolatta *aap*; etken grubundaki dört izolatta (%8) *bhp*, 37 (%74) izolatta *aap* pozitif bulunmuştur. İki grup arasında her iki gen bölgesinin pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p = 0.643$ ). Araştırılan biyofilm ilişkili gen bölgelerinin etken ve kontaminasyon grubundaki dağılımı Şekil 2’de gösterilmiştir.

*sasX* ilişkili gen bölgesinin varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kontaminasyon grubundaki 14 izolatta (%14), etken grubundaki beş izolatta (%10) olmak üzere toplam 19 izolatta (%12.6) *sasX* ilişkili gen bölgesi pozitif bulunmuştur. İki grup arasında *sasX* varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p = 0.487$ ). *sasX* geni en fazla 11 *S.epidermidis* izolatında olmak üzere; üç *S.hominis*, dört *S.hemolyticus* ve bir *S.capitis* izolatında pozitif olarak bulunmuştur. *sasX* ilişkili gen bölgesinin etken ve kontaminasyon grubundaki dağılımı Şekil 3’te; *sasX* pozitif izolatların türler içindeki dağılımı Tablo IV’te gösterilmiştir.



Şekil 2. Biyofilm ilişkili gen bölgelerinin etken ve kontaminasyon grubundaki dağılımı.

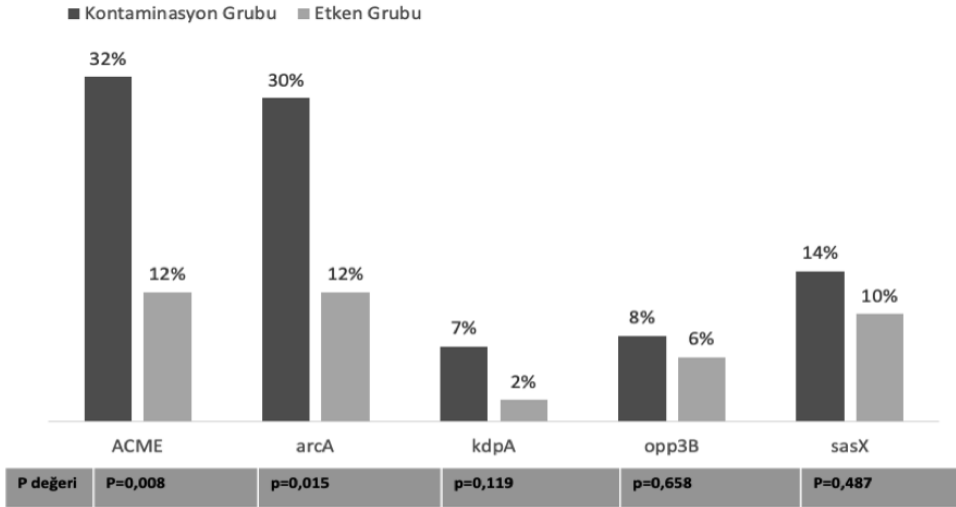


**Tablo IV.** sasX ve ACME İlişkili Gen Bölgeleri arcA, kdpA ve opp3B'nin Etken ve Kontaminasyon Grubundaki Türlere Göre Dağılımı

Araştırılan Gen Bölgesi n (%)	Kontaminasyon Grubu (n= 100)				Etken Grubu (n= 50)				Toplam (n= 150)* n (%)	
	<i>S. epidermidis</i> n= 66, n (%)	<i>S. hominis</i> n= 19, n (%)	<i>S. capitis</i> n= 4, n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n= 10, n (%)	<i>S. epidermidis</i> n= 29, n (%)	<i>S. hominis</i> n= 6, n (%)	<i>S. capitis</i> n= 2, n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n= 12, n (%)		
<b>arcA</b>	Pozitif	20 (30.3)	6 (31.6)	2 (50)	2 (20)	4 (13.8)	0	1 (50)	1 (8.3)	36 (24)
	Negatif	46 (69.7)	13 (68.4)	2 (50)	8 (80)	25 (86.2)	6 (100)	1 (50)	11 (91.7)	112 (76)
<b>kdpA</b>	Pozitif	6 (9.1)	1 (5.3)	0	0	1 (3.4)	0	0	0	8 (5.3)
	Negatif	60 (90.9)	18 (94.7)	4 (100)	10 (100)	28 (96.6)	6 (100)	2 (100)	12 (100)	140 (94.7)
<b>opp3B</b>	Pozitif	5 (7.6)	1 (5.3)	0	2 (20)	3 (10.3)	0	0	0	11 (7.3)
	Negatif	61 (92.4)	18 (94.7)	4 (100)	8 (80)	26 (89.7)	6 (100)	2 (100)	12 (100)	137 (92.7)
<b>ACME</b>	Pozitif	20 (30.3)	6 (31.5)	2 (50)	4 (40)	4 (13.8)	0	1 (50)	1 (8.3)	38 (25.3)
	Negatif	46 (60.7)	13 (69.5)	2 (50)	6 (60)	25 (86.2)	6 (100)	1 (50)	11 (91.7)	110 (73.3)
<b>sasX</b>	Pozitif	9 (13.6)	2 (10.5)	1 (25)	2 (20)	2 (6.8)	1 (16.6)	0	2 (16.6)	19 (12.6)
	Negatif	57 (86.3)	17 (89.4)	3 (75)	8 (80)	27 (93.1)	5 (83.3)	2 (100)	10 (83.3)	131 (87.4)

\* *S. intermedius* ve *S. warneri* olarak tanımlanmış iki izolatta araştırılan gen bölgeleri negatif bulunmuş ve tabloda gösterilmemiştir. Tabloda her gen bölgesi için sütun yüzdesi hesaplanmıştır.

ACME ilişkili *arcA*, *kdpA* ve *opp3B* operonlarının varlığı multiplex PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kontaminasyon grubunda 32 izolatta (%32), etken grubunda ise altı izolatta (%12) araştırılan genlerden herhangi biri tespit edilmiş ve ACME pozitif olarak değerlendirilmiştir. ACME gen bölgesi en fazla 24 *S. epidermidis* izolatında olmak üzere; altı *S. hominis*, beş *S. haemolyticus* ve üç *S. capitis* izolatında pozitif bulunmuştur. Gen bölgeleri ayrı olarak değerlendirildiğinde kontaminasyon grubundaki 30 izolatta (%30) *arcA* pozitif, yedi izolatta (%7) *kdpA* pozitif, sekiz izolatta (%8) *opp3B* pozitif; etken grubunda ise altı izolatta (%12) *arcA* pozitif, bir izolatta (%2) *kdpA* pozitif, üç izolatta (%6) *opp3B* pozitif bulunmuştur. ACME ve *arcA* pozitifliği kontaminasyon grubunda etken grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p= 0.008$  ve  $p= 0.015$ ). *kdpA* ve *opp3B* pozitifliği açısından ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla  $p= 0.119$  ve  $p= 0.658$ ). Operonların varlığına göre ACME tipleni yapıldığında 23 izolat tip 2, dörder izolat tip 4 ve tip 5, beş izolat tip 1 ve iki izolat tip 3 olarak sınıflandırılmıştır. ACME gen bölgelerinin etken ve kontaminasyon grubundaki dağılımı Şekil 3'te; ACME pozitif izolatların türler içindeki dağılımı Tablo IV'te gösterilmiştir.



Şekil 3. *sasX* ve *ACME* ilişkili gen bölgeleri *arcA*, *kdpA* ve *opp3B* etken ve kontaminasyon grubundaki dağılımı.

## TARTIŞMA

Kan kültüründe KNS türleri izole edildiğinde enfeksiyon etkeni ya da kontaminasyon ayrımı yapmak doğru tanı ve laboratuvar imkanlarının verimli kullanılması için oldukça önemlidir<sup>4</sup>. Koagülaz negatif stafilkoklara bağlı oluşan kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı, farklı kan kültür setinde aynı tür ve antibiyotik duyarlılığında bakterinin üremesi, hastanın enfeksiyona ait klinik bulgularının olmasıyla koyulmuştur<sup>5</sup>. Bununla birlikte izole edilen KNS'nin pozitif sinyal verme zamanı, biyofilm oluşturma kapasitesi, antibiyotik direnç kazanımı, arjinin metabolizması, biyofilm ve *sasX* ilişkili gen bölgeleri ve *IS256* gibi ekleme dizisinin varlığı ayırt edici olabilmektedir<sup>2,6-11</sup>.

Çalışmada etken grubundaki izolatlar kontaminasyon grubuna göre daha erken pozitif sinyal verirken; izolatların 12-24 saat aralığında sinyal vermesi etken ve 36-48 saat aralığında sinyal vermesi ise kontaminasyon lehine anlamlı bulundu ( $p < 0.001$ ). Kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerde yapılan bir çalışmada; pozitif sinyal süresinin 36 saatin üzerinde olmasının kontaminasyon için %91 negatif prediktif değere sahip olduğu bildirilmiştir<sup>24</sup>.

Koagülaz negatif stafilkoklara bağlı enfeksiyonlarda en önemli virülans faktörlerinden biri biyofilm oluşumudur. Biyofilm *ica* operonu tarafından sentezlenen polisakkarit intraselüler adezin ve poli-N-asetilglukozamin, *bap*, *aap* gibi çeşitli proteinler ve çeşitli bakteri ürünlerinden oluşmaktadır<sup>1</sup>. Çeşitli klinik örneklerle yapılan çalışmalarda enfeksiyon ilişkili KNS'lerin kontaminant olarak sınıflandırılmış izolatlar göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu, biyofilm ilişkili gen bölgeleri *icaA*, *icaD*, *bhp*, *IS256*'yı tek başına ya da birlikte daha yüksek oranda bulundurduğu gösterilmiştir<sup>2,6,7,10</sup>. Aksine kontami-

nant olarak sınıflandırılan veya sağlıklı kişilerin burun kültürlerinden izole edilen izolatlarda biyofilm oluşumu daha düşük iken *aap* varlığı daha yüksek oranda bulunmuştur<sup>2</sup>. Çalışmada etken grubundaki izolatlar kontaminasyon grubundaki izolatlara göre daha yüksek oranda güçlü düzeyde biyofilm oluşturmuştur ( $p= 0.027$ ). Biyofilm ilişkili gen bölgeleri incelendiğinde ise *icaA*, *icaD*, *IS256*'nın tek başına ya da birlikte pozitifliği etken grubundaki izolatlarda daha yüksek oranda bulunurken; *aap* ve *bhp* pozitifliği açısından etken ve kontaminasyon gruplarındaki izolatlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

*sasX* ilişkili gen bölgesi *Staphylococcus aureus*'a ait yüzey adezin proteinini kodlamaktadır. Bu gen bölgesinin kazanımı izolatlara artmış kolonizasyon kapasitesi ve biyofilm oluşumu, immün mekanizmalardan kaçma ve daha şiddetli hastalık oluşturma yeteneği kazandırmaktadır<sup>23</sup>. *S.epidermidis* ATCC 35984'ün biyofilm ekspresyonu sırasında kodlanan yüzey proteini *sesI*'nın, veri tabanında gen bölgeleri karşılaştırıldığında *sasX* ile yüksek homoloji gösterdiği belirtilmiştir<sup>23,25,26</sup>. Bu bölgenin *S.aureus*'a benzer olarak KNS'lerde de kolonizasyon kapasitesini arttırarak virülansa katkı yapabileceği düşünülmüştür<sup>26</sup>. Tekeli ve arkadaşlarının 180 KNS izolatıyla yaptıkları çalışmada<sup>8</sup> 17 (%9.44) izolatta *sasX* pozitif bulunmuş; pozitif izolatlar kateter örnekleri ve hastane personelinin burun kültürlerinden izole edilmiştir. Çalışmada sağlıklı gönüllülerin elinden elde edilen izolatlarda pozitiflik görülmediği bildirilmiştir<sup>8</sup>. Soumya ve arkadaşlarının yaptıkları ilk çalışmada<sup>11</sup> 8 (%14.5), ikinci çalışmada<sup>18</sup> ise 1 (%2.5) izolatta *sasX* pozitif bulunmuş; bu izolatların enfeksiyon ilişkili olduğu, güçlü biyofilm oluşturdıkları ve biyofilm ilişkili genleri daha yüksek oranda taşıdıkları bildirilmiştir<sup>11,18</sup>. De Backer ve arkadaşlarının endotrakeal aspirat örneklerinden izole ettikleri 32 KNS izolatıyla yaptıkları çalışmada<sup>25</sup> ise pozitif izolat bulunmamıştır. Çalışmamızda 19 izolatta (%12.7) *sasX* pozitif bulunurken, gruplar arasında *sasX* pozitifliği açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir.

*ACME arcR/A/D/B/C* genlerini içeren *arc* operonu, *kdpE/D/A/B/C* genlerini içeren *kdp* operonu ve *opp3* operonundan oluşan, büyüklüğü 30 ile 55 kb arasında değişen genetik adadır<sup>16</sup>. *S.aureus* izolatlarında *arcA* kazanımıyla arjininin nitrik oksit yapımında kullanıldığı ve arginin deaminaz yoluyla karbondioksit, ATP ve amonyağa dönüştürüldüğü çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle *arcA* kazanımı bakterinin immün yanıtından kaçmasını ve asidik deri pH'ında daha kolay kolonize olmasını sağlamaktadır<sup>16,27</sup>. Çeşitli klinik örnekler ve sağlıklı gönüllülerden izole edilen KNS izolatlarında *ACME* gen bölgelerinin pozitifliğinin araştırıldığı çalışmalarda %32-64.4 arasında değişen oranda en fazla *arcA* pozitif bulunmuştur<sup>9,28,29</sup>. Bu çalışmalarda; Granslo ve arkadaşları<sup>9</sup> kan kültürlerinden izole edilen kontaminant izolatlarda enfeksiyon etkeni izolatlarla göre, Barbier ve arkadaşları<sup>28</sup> ise ayaktan başvuran hastalarda hastanede tedavi alan hastalara göre daha yüksek oranda *ACME* pozitifliği bildirmiştir<sup>9,28</sup>. Miraga ve arkadaşları<sup>29</sup> ise kolonizasyon ve enfeksiyon etkeni izolatlar arasında anlamlı fark bulunmadığını bildirmiştir.

*ACME*'nin ilk kez tanımlandığı USA300 suşu, *S.epidermidis*'te tanımlı tip 1 *ACME* ile yüksek benzerlik göstermektedir. Ayrıca USA300 suşu diğer *S.aureus*'ların yaygın kolonizasyon bölgesi burun yerine; *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.haemolyticus* tarafından kolonize edilen koltuk altı, kasık ve perine bölgesinde sıklıkla izole edilmiştir. Bu nedenle USA300 suşunun

ACME gen bölgesini mikrobiyota üyesi KNS'lerden kazandığı düşünülmüştür<sup>16,26,28-30</sup>.

Çalışmada %25.3 oranında ACME pozitif bulunurken; literatürle benzer olarak en yüksek oranda *arcA* pozitif bulundu. İki grup karşılaştırıldığında kontaminasyon grubunda ACME ve *arcA* pozitifliği anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla  $p=0.008$  ve  $p=0.015$ ). *S.aureus* izolatlarının ACME gen bölgesini mikrobiyota üyesi KNS'lerden kazandığı yönündeki değerlendirmeler, kontaminasyon olarak sınıflandırılan izolatlarda daha yüksek oranda ACME pozitifliği bildiren farklı çalışmaların varlığı ve çalışmamızın sonuçları birlikte yorumlandığında kan kültürü değerlendirilmesinde, elde edilen KNS izolatında ACME ve *arcA* bölgesinin pozitif saptanmasının kontaminasyonu işaret ettiğinin düşünülmesi mümkündür<sup>9,16,26,28-30</sup>.

Sonuç olarak, kan kültürlerinden elde edilen KNS izolatlarından güçlü biyofilm oluşturan, 36 saatin altında pozitif sinyal veren ve biyofilm ilişkili gen bölgeleri *icaA*, *icaD*, *IS256*'yı tek başına ya da çoklu bulunduran izolatlar enfeksiyon etkeni; klinik ve mikrobiyolojik özelliklerin yokluğunda *arcA* pozitif saptanan izolatlar ise kontaminant olarak değerlendirilebilmektedir. Çalışmanın en önemli kısıtlılığı kan alımının preanalitik evresinin takip edilememiş olmasıdır. Bir diğer kısıtlılık ise sağlık çalışanlarının ellerinin ve özellikle uzun süreli yatışı olan hastalarda deri yüzeyinin hastane mikrobiyotasıyla kolonize olabilmesi nedeniyle çalışmada araştırılan faktörlerin gruplar arasındaki ayırım gücünün etkilenmesidir. Hastane mikrobiyotasıyla kolonize olabilecek kişiler (hastanede uzun süreli yatışı olan ve enfeksiyon belirtileri olmayan hastalar, sağlık çalışanları) ve sağlıklı kişilerden alınacak örneklerin karşılaştırıldığı yeni çalışmaların yapılmasının virülans faktörlerinin enfeksiyon etkeni ve kontaminant izolatlar arasındaki ayırım gücünü belirlemek açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 22.02.2022 ve Karar No: 04).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014; 27(4): 870-926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
2. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? Clin Microbiol Infect 2019; 25(9): 1071-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>
3. Lisowska-Lysiak K, Lauterbach R, Międzobrodzki J, Kosecka-Strojek M. Epidemiology and pathogenesis of Staphylococcus bloodstream infections in humans: A review. Pol J Microbiol 2021; 70(1): 13-23. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-005>
4. Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: A comprehensive update on the problem of blood culture contamination and a discussion of methods for addressing the problem. Clin Microbiol Rev 2019; 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-19>

5. KLİMUD. Kan dolaşım örneklerinin laboratuvar incelemesi rehberi 2. Baskı. Erişim adresi: [https://www.klimud.org/public/uploads/content/files/KLİMUD%20Rehberleri\\_Kan%20Dolasimi\\_ver02.pdf](https://www.klimud.org/public/uploads/content/files/KLİMUD%20Rehberleri_Kan%20Dolasimi_ver02.pdf)
6. Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One* 2013; 8(5): e62742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062742>
7. Öcal DN, Dolapçı İ, Karahan ZC, Tekeli A. Investigation of biofilm formation properties of staphylococcus isolates. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(1): 10-9. <https://doi.org/10.5578/mb.46552>
8. Tekeli A, Öcal DN, Dolapçı İ. Detection of sasX gene and distribution of SCCmec types in invasive and non-invasive coagulase-negative Staphylococci. *Balkan Med J* 2020; 37(4): 215-21. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2019.8.21>
9. Granslo HN, Klingenberg C, Fredheim EG, Ronnestad A, Mollnes TE, Flaegstad T. Arginine catabolic mobile element is associated with low antibiotic resistance and low pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis* from neonates. *Pediatr Res* 2010; 68(3): 237-41. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181eb01e0>
10. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: Association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004; 72(2): 1210-5. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1210-1215.2004>
11. Soumya KR, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Studies on coexistence of mec gene, IS256 and novel sasX gene among human clinical coagulase-negative staphylococci. *3 Biotech* 2016; 6(2): 233. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0549-9>
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. Erişim adresi: [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints).
13. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* 2007; 115(8): 891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
14. Oliveira A, Cunha Mde L. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 2010; 3: 260. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260>
15. Ripon MH, Hasan M, Ahasan M, Alam M, Kabir S. Comparison of three different methods of genomic DNA extraction from gram positive and gram negative bacteria. *J Expt Biosci* 2011; 2(1): 55-60.
16. O'Connor AM, McManus BA, Kinnevey PM, Brennan GI, Fleming TE, Cashin PJ, et al. Significant enrichment and diversity of the staphylococcal arginine catabolic mobile element ACME in *Staphylococcus epidermidis* isolates from subgingival peri-implantitis sites and periodontal pockets. *Front Microbiol* 2018; 9: 1558. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01558>
17. Zhou S, Chao X, Fei M, Dai Y, Liu B. Analysis of *S.epidermidis* icaA and icaD genes by polymerase chain reaction and slime production: A case control study. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 242. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-242>
18. Soumya KR, Mathew S, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Studies on prevalence of biofilm associated genes and primary observation on sasX gene in clinical isolates of coagulase negative staphylococci (CoNS). *Apmis* 2016; 124(4): 319-26. <https://doi.org/10.1111/apm.12510>
19. Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(12): 773-81. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0226-8>
20. Diamond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leaños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of icaAIBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with Staphylococcal device-related infections. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 68. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-68>
21. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, et al. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 1): 83-93. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46799-0>

22. Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, et al. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology (Reading)* 2005; 151(Pt 5): 1453-64. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27534-0>
23. Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med* 2012; 18(5): 816-9. <https://doi.org/10.1038/nm.2692>
24. Hitzentbichler F, Simon M, Salzberger B, Hanses F. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection* 2017; 45(2): 179-86. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0945-4>
25. De Backer S, Xavier BB, Vanjari L, Coppens J, Lammens C, Vemu L, et al. Remarkable geographical variations between India and Europe in carriage of the staphylococcal surface protein-encoding *sasX/sesI* and in the population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to clonal complex 8. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(5): 628.e1-.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.024>
26. Otto M. How colonization factors are linked to outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The roles of *sasX* and *ACME*. *Biomol Concepts* 2013; 4(5): 533-7. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0025>
27. Thurlow LR, Joshi GS, Clark JR, Spontak JS, Neely CJ, Maile R, et al. Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 2013; 13(1): 100-7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.012>
28. Barbier F, Lebeaux D, Hernandez D, Delannoy AS, Caro V, Francois P, et al. High prevalence of the arginine catabolic mobile element in carriage isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(1): 29-36. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq410>
29. Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, Chambers HF, Higashi J, Sullam PM, et al. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One* 2009; 4(11): e7722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007722>
30. Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: Amplification and diversification of SCCmec. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(6): 1333-41. <https://doi.org/10.1093/jac/dks068>