



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ  
METİSİLİNE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MSSA)  
VE METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
(MRSA) SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA  
ÖZELLİKLERİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Elvan Hortaç İřtar**

**Ankara, 2018**



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ  
METİSİLİNE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MSSA)  
VE METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
(MRSA) SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA  
ÖZELLİKLERİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Elvan Hortaç İřtar**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hikmet Eda Alışkan**

**Ankara, 2018**

**Tez alışması Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu  
tarafından KA16/264 proje numarasıyla onaylanmış ve Başkent Üniversitesi  
Araştırma Fonunca desteklenmiştir.**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bilgi birikimi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ahmet Başustaoğlu'na,

Kilometrelerce uzaktan dahi yakın ilgi ve desteğini hissettiğim değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Hikmet Eda Alışkan'a,

Yaptığım çalışmalardan hiçbir destek ve emeğini esirgemeyen, varlığıyla daima güvende hissetmemi sağlayan sayın Prof. Dr. Jülide Sedef Göçmen'e,

Akılcı ve pratik yaklaşımlarıyla her zaman örnek aldığım ve alacağım sayın Prof. Dr. Müge Demirbilek Ekici'ye,

Çalışma düzeni ve bilimsel yönüyle bana ışık tutan, birlikte çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum sayın Doç. Dr. Ebru Evren'e,

Deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Hande Arslan'a ve rutin laboratuvar eğitimime büyük katkı ve destek veren sayın Prof. Dr. Özlem Kurt Azap'a,

Moleküler biyoloji ile ilgili bilgi ve deneyimlerini benimle severek paylaşan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Erkan Yurtcu'ya,

Bilgi birikimini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Dr. Öğr. Üyesi Hasan Cenk Mirza'ya,

Tüm asistanlığım boyunca her türlü desteğiyle yanımda olan Murat Ural'a,

Sıcakkanlı ve kucaklayıcı yaklaşımları ile beni mikrobiyoloji ailesine ait hissettiren Başkent Üniversitesi Adana Hastanesi Mikrobiyoloji çalışanları Mine Çokyaşar, Berna Güngör Akşam, Filiz Özen ve Fatmanur Söbüçovalı'ya,

Benim için iş arkadaşından fazlası olan Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanları Tuğba Akkaya, Nur Kaya ve Ayşe Nur Kalkan'a,

Daima yüzümü güldüren, bilimsel yönüyle destekçim olan Dr. Oğuzhan Ekin Efe'ye, rasyonel bakış açısıyla bana yol gösteren Dr. Pınar Ayrın Fidan'a,

Tanıdığım ve bir arada çalıştığım için mutluluk duyduğum değerli bilim insanı arkadaşlarım Ekin Ergin ve Nazila Farhangzad'a teşekkürler.

Bu hayatta hiçbir zaman yalnız olmadığımı bana hissettiren kardeşim Dr. Yasemin Say'a, tüm kötü ve güzel zamanlarımın şahidi Samet Çelebi'ye, bilimsel yönüyle her zaman destekçim olan Volkan Aslanoğlu'na,

Zorlu tıp eğitimim boyunca benimle yorulan, uykusuz kalan, heyecan ve korkularımı paylaşan fedakâr anne ve babam Sevgi ve Kamil Hortaç'a,

Her zaman yanı başımda olan, huzur ve mutluluk kaynağım eşim Mete İftar'a sonsuz teşekkürler.

Dr. Elvan Hortaç İftar

## ÖZET

**Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması**

Son yıllarda cerrahi girişimlerin, immünsüprese hasta ve kullanılan implant sayısının artmasıyla birlikte biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar giderek daha ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların en sık etkenlerinden biri *Staphylococcus aureus*'tur. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar bu bakterinin sahip olduğu metisilin direnciyle birleştiğinde uygun tedavi protokolü belirlemek son derece güç olmaktadır.

Çalışmada farklı klinik örneklerden izole edilmiş enfeksiyon etkeni olan metisiline duyarlı ve dirençli *S. aureus*'ların biyofilm oluşturma potansiyelini ve bu açıdan aralarındaki farkı gözlemlemek; biyofilm varlığının tespitinde kullanılacak kolay uygulanabilir, güvenilir ve etkin yöntemleri belirlemek amaçlanmıştır.

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen yara, kan ve kateter örneklerinden izole edilmiş toplam 200 *S. aureus* suşu (100 adet MRSA, 100 adet MSSA) çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm suşların biyofilm oluşumu modifiye Christensen, MTT, BioTimer ve Congo Red Agar yöntemleri ile incelenmiş, ayrıca biyofilm oluşumundan sorumlu *ica* operon varlığına PZR ile bakılmıştır. Tüm suşlarda biyofilm oluşturma oranları ve biyofilm gen bölgeleri araştırılmış, dirençli ve duyarlı suşlar ile kan ve yara izolatları arasındaki farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca uygulanan tüm biyofilm tespit yöntemlerinin birbiriyle uyumu incelenmiştir.

Çalışmada metisilin dirençli suşların duyarlı suşlara göre hem daha kısa sürede hem de daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu, ayrıca oluşturdukları biyofilm yapısının daha yoğun olduğu gösterilmiştir. Kan ve yara izolatları arasında biyofilm oluşumu açısından istatistiksel bir fark bulunmadığı görülmüştür.

Moleküler yöntem referans olarak alındığında kullanılan konvansiyonel yöntemlerden en duyarlı yöntemin %84 ile MTT yöntemi olduğu, bunu %82,4 ile modifiye Christensen yönteminin izlediği görülmüştür. Biyofilm tespitinde kullanılan

en özgül yöntemin ise %86,7 ile BioTimer yöntemi olduğu, ikinci sırayı ise %81,3 ile modifiye Christensen yönteminin aldığı görülmüştür. Konvansiyonel yöntemler ile moleküler yöntem karşılaştırıldığında kullanılan konvansiyonel yöntemlerde tespit edilen biyofilm varlığı ile PZR'deki *ica* pozitifliği arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Buna ek olarak *ica* gen pozitiflik sayısı arttıkça bakterilerin biyofilm oluşturma eğiliminin arttığı görülmüştür.

Bu bulgulara göre MRSA gibi daha virülan suşların biyofilm oluşturma eğiliminin daha yüksek olduğu ve bu iki direnç mekanizmasının birbirini sürekli destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Moleküler yöntemlerin kullanılabilirliğinin mümkün olduğu durumlarda *ica* gen bölgesinin tespitinin tek başına bile virulan - nonvirulan suş ayrımı yapmada önemli bir ayıraç olduğu, *ica* varlığının tespitinin hastayla ilgili alınan tedavi kararlarında, korunma stratejilerinin belirlenmesinde ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede erken bir belirteç olabileceği görülmüştür.

Moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda biyofilm varlığının tespitinde kullanılacak hızlı sonuç veren, kolay uygulanabilir ve güvenilir konvansiyonel yöntemlerin varlığı son derece önem taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan tüm konvansiyonel yöntemler bu açıdan yeterli gözükmemektedir. Modifiye Christensen ve MTT yöntemleri biyofilm kantitasyonu da yapması açısından konvansiyonel yöntemler arasında ön plana çıkmaktadır. BioTimer yöntemi ise biyofilm varlığının tespitinde kullanılan çok yeni ve dikkat çekici bir testtir.

Sonuç olarak kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak belirlenen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelini belirlemek ve girişimsel işlemlerden önce bu bakterilere yönelik gereken tedbirleri almak biyofilm kaynaklı enfeksiyonları ve buna bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Staphylococcus aureus*, biyofilm, biyofilm sistemleri, metisilin, stafilokok enfeksiyonları, genler - *ica*

## ABSTRACT

### **Conventional and molecular investigations of the biofilm formation of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from various clinical specimens**

Biofilm-related infections have become an increasingly serious health problem with the increasing number of surgical procedures, immunocompromised patients and the number of implants used in recent years. One of the most common causes of biofilm-related infections is *Staphylococcus aureus*. When biofilm-related infections combine with the methicillin resistance of this bacteria, it would be extremely difficult to determine the appropriate treatment protocol.

The aim of the study was to determine the biofilm formation potential of methicillin-susceptible and resistant *S. aureus*, which is isolated from different clinical specimens, and to determine the difference between them in this regard and also to determine easily applicable, reliable and effective biofilm detection methods to be used.

A total of 200 *S. aureus* strains (100 MRSA, 100 MSSA) isolated from wound, blood and catheter samples which were sent to the Başkent University Faculty of Medicine Hospital Clinical Microbiology Laboratory were included in the study. Biofilm formation of all strains was examined by modified Christensen, MTT, BioTimer and Congo Red Agar methods, and the presence of *ica* operon responsible for biofilm formation was also identified by PCR. Biofilm formation rates and biofilm gene segments were sought to determine the differences between resistant and susceptible strains, blood and wound isolates in all strains. In addition, compatibility of all biofilm detection methods that were applied was examined.

Studies have shown that methicillin-resistant strains produce biofilms in a shorter time and at a higher rate than susceptible strains, as well as the biofilm structure, which was produced by methicillin-resistant strains, was more intense. There was no statistical difference between blood and wound isolates in terms of biofilm formation.

When the molecular method is accepted as a reference, the most sensitive conventional method was MTT method with a sensitivity of 84%, followed by the modified Christensen method with a sensitivity of 82.4%. The most specific method

used for biofilm detection was BioTimer method with a specificity of 86.7% and the second method was the modified Christensen method with a specificity of 81.3%. When comparing the molecular methods with conventional methods; there was no statistically significant difference between the presence of biofilm detected in the conventional methods used and the *ica* positivity in the PCR. In addition as the number of *ica* gene positivity increases, the tendency of bacteria to form biofilm increases.

These findings suggest that more virulent strains, such as MRSA, have a higher propensity to biofilm formation and that these two mechanisms of resistance support each other.

Where the availability of molecular methods is possible, the detection of the *ica* gene region alone has been found to be an important reagent for discriminating virulent-nonvirulent strains and it has been shown that detection of the presence of a *ica* may be an early marker of patient-related treatment decisions, identification of protection strategies, and struggle with biofilm-related infections.

In cases where molecular methods cannot be used, the existence of fast-acting, easy-to-apply and reliable conventional methods to detect the presence of biofilms is of paramount importance. All conventional methods used in our work seem to be sufficient in this respect. Modified Christensen and MTT methods are at the forefront of conventional methods because of their ability to make biofilm quantitation. On the other hand BioTimer method is a very new and remarkable test used in the detection of biofilm presence.

As a result; determining the potential for biofilm formation of bacteria identified as colonizing or infecting and to take the necessary precautions for these bacteria prior to interventional procedures will reduce biofilm-related infections and associated morbidity and mortality.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, biofilm, biofilm systems, methicillin, staphylococcal infections, genes - *ica*

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Özet	<i>iii</i>
Abstract (İngilizce Özet)	<i>v</i>
İçindekiler dizini	<i>vii</i>
Kısaltmalar dizini	<i>x</i>
Şekiller dizini	<i>xii</i>
Tablolar dizini	<i>xiii</i>
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	
2.1. Stafilokokların Genel Özellikleri	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> Tanısı	5
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> Antibiyotik Direnci	7
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Metisilin Direnci	8
2.3.1.1. Metisiline Direnç Mekanizmaları	9
2.3.1.2. Metisilin Direncinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler	10
2.4. Biyofilm Yapısının Tanımı ve Tarihçesi	13
2.5. Biyofilm Yapısının Oluşumu	14
2.5.1. Yüzey Koşullandırması	14
2.5.2. Tutunma	14
2.5.3. Yapışma	14
2.5.4. Kolonizasyon ve Olgunlaşma	15
2.5.5. Kopma ve Ayrılma	15
2.6. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler	16
2.6.1. Biyofilm Oluşumunu Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar ve <i>ica</i> Operonu	17
2.7. Biyofilm Yapısının Organizasyonu ve Genel Özellikleri	19
2.7.1. Biyofilm İçerisindeki Hücrelere Penetre Olamama	21
2.7.2. Büyümenin Duraksaması ve Stres Cevabı	21
2.7.3. Heterojenite	21
2.7.4. Persiste Hücrelerin Oluşması	21
2.8. Biyofilm Yapısının Klinik Önemi	22
2.9. Biyofilm Oluşturmanın Bakteriye Kazandırdığı Avantajlar ve Konak İmmün Sisteminin Yanıtı	24



2.10. Hücrelerarası İletişim ( <i>Quorum Sensing</i> )	25
2.11. Biyofilm Tespit Yöntemleri	27
2.11.1. Boyama Yöntemleri	27
2.11.2. Metabolik Yöntemler	27
2.11.3. Mikroskopik Yöntemler	28
2.11.4. Moleküler Yöntemler	28
2.11.5. <i>Slime</i> oluşumunun tespiti	28
3. Gereç ve Yöntem	29
3.1. Bakteri İzolatları	29
3.1.1. Katalaz Testi	29
3.1.2. Koagülaz Testi	30
3.1.3. Metisilin Direnci	31
3.2. Biyofilm Deneyleleri	32
3.2.1. Konvansiyonel Biyofilm Tespit Yöntemleri	32
3.2.1.1. Modifiye Christensen Yöntemi	32
3.2.1.2. MTT Yöntemi	34
3.2.1.3. BioTimer Yöntemi	36
3.2.1.4. Congo Red Agar Yöntemi	39
3.3. Biyofilm Genlerinin Varlığının Araştırılması	40
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu	40
3.3.1.1. Gerekli Malzemeler	40
3.3.1.2. DNA Ekstraksiyon Yönteminin Uygulanışı	40
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
3.3.2.1. Gerekli Malzemeler	40
3.3.2.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	41
3.3.2.3. PZR Programı	41
3.3.3. Biyofilm Gen Bölgelerinin Agaroz Jel Elektroforezde Gösterilmesi	42
3.3.3.1. Gerekli Malzemeler	42
3.3.3.2. 5x TBE Solüsyonunun Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Kuyucuklara Yüklenmesi	42
3.3.3.3. Biyofilm Genlerinin Saptanmasında Kullanılan Primerler	43
3.3.3.4. Kalite Kontrol	43
3.4. İstatistiksel Analiz	43

4. Bulgular	44
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatları	44
4.2. Biyofilm Tespit Yöntemleri	46
4.2.1. Konvansiyonel Yöntemler	46
4.2.1.1. Modifiye Christensen Yöntemi	46
4.2.1.2. MTT Yöntemi	48
4.2.1.3. BioTimer Yöntemi	51
4.2.1.4. Congo Red Agar Yöntemi	53
4.2.2. Moleküler Biyofilm Tespit Yöntemleri	57
4.2.2.1. <i>icaADBC</i> Operonu	57
5. Tartışma	65
6. Sonuç	81
7. Kaynaklar	83

## KISALTMALAR

- ACYB: Anestezi - Cerrahi Yoğun Bakım
- AFM: Atomik Kuvvet Mikroskopisi
- AHL: Açıl-homoserin lactonlar
- AI: Auto Inducer
- bç: baz çifti
- CFU: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CLSLM: Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi
- CRA: Congo Red Agar
- CRM: Konfokal Raman Mikroskopi
- CTC: 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride
- ÇC: Çocuk Cerrahisi
- DMMB: 1,9-dimetil metilen blue
- DMSO: dimetil sülfoksit
- DNaz: deoksiribonükleaz
- DYB: Dahiliye Yoğun Bakım
- ET-A, ET-B: Eksfoliyatif (epidermolitik) toksin
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FDA: fluorescein-di-acetate
- KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok
- KVC: Kalp ve Damar Cerrahisi
- MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry
- MHA: Mueller Hinton Agar
- MHB: Mueller Hinton Broth
- MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
- MLST: multilocus sequence typing
- MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
- MSCRAMM: Microbial Surface Components Recognizing Adhezeive Matrix Molecules
- MSSA: Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
- MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OD: ortalama değer  
PBP : Penisilin Bağlayan Protein  
PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Solüsyonu)  
PFGE: pulsed-field gel electrophoresis  
PIA: Polisakkarit İntersellüler Adezin  
PIA-PNSG: Poli-N-süksinil- $\beta$ -1-6 glikozamin  
PMNL: Polimorfonükleer Lökosit  
PREC: Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi  
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
SCC: Staphylococcal Casette Chromosome  
SD: standart değer  
SDD: Sefoksitin Disk Difüzyon  
SEM: Tarayıcı Elektron Mikroskopi  
SVK: Santral Venöz Kateter  
TMpPD: tetrametil-*p*-fenilenediamin dihidroklorid  
TSB: Triptik Soy Broth  
TSST-1: Toksik Şok Sendrom Toksin-1  
VP: Voges - Proskauer  
VRSA: Vankomisin Dirençli *S. aureus*  
XTT: 2,3-bis(2-methyloxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide  
YYB: Yenidoğan Yoğun Bakım

## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1.</b> Biyofilm oluşum basamakları	15
<b>Şekil 2.2.</b> <i>icaADBC</i> operonu ve PIA sentezi	19
<b>Şekil 3.1.</b> Bakteri sayısı ( $\log_{10}$ CFU) - Zaman (dk) eğrisi ve BT-PR besiyeri renk değişimi	38
<b>Şekil 4.1.</b> MRSA ve MSSA suşlarının örneklere göre dağılımı	44
<b>Şekil 4.2.</b> MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri bölümlere göre dağılımı	45
<b>Şekil 4.3.</b> Çalışmaya alınan tüm bakterilerin izole edildikleri servislere göre dağılımı	45
<b>Şekil 4.4.</b> Modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm pozitiflik oranları	46
<b>Şekil 4.5.</b> Modifiye Christensen yöntemiyle biyofilm oluşumunun gösterilmesi	48
<b>Şekil 4.6.</b> MTT yöntemine göre biyofilm pozitiflik oranları	49
<b>Şekil 4.7.</b> MTT yöntemiyle biyofilm varlığının gösterilmesi	51
<b>Şekil 4.8.</b> BioTimer yöntemiyle biyofilm varlığının araştırılması	53
<b>Şekil 4.9.</b> CRA besiyerinde <i>slime</i> faktör oluşumu	56
<b>Şekil 4.10.</b> <i>S. aureus</i> suşlarındaki <i>icaADBC</i> pozitiflikleri	57
<b>Şekil 4.11.</b> <i>icaA</i> gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi	58
<b>Şekil 4.12.</b> <i>icaB</i> gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi	58
<b>Şekil 4.13.</b> <i>icaD</i> gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi	59
<b>Şekil 4.14.</b> <i>icaC</i> gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi	59
<b>Şekil 4.15.</b> MRSA ve MSSA suşlarındaki <i>icaADBC</i> pozitiflikleri	60

## TABLÖLAR

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1.</b> <i>S. aureus</i> ilişkili enfeksiyonlar	4
<b>Tablo 2.2.</b> <i>S.aureus</i> virulans faktörleri	4
<b>Tablo 2.3.</b> Stafilokok - Mikrokok ayırımında kullanılan laboratuvar testleri	5
<b>Tablo 2.4.</b> SDD yöntemi eşik sınır değerleri	11
<b>Tablo 2.5.</b> Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların farklı biyomedikal cihazlardaki insidansı ve bu bölgelerde biyofilm kaynaklı enfeksiyonların en sık etkenleri	23
<b>Tablo 3.1.</b> Sınır değer (ODc) ve biyofilm yoğunluk kategorileri	34
<b>Tablo 4.1.</b> Biyofilm oluşumu açısından MRSA ve MSSA suşlarının karşılaştırılması	47
<b>Tablo 4.2.</b> Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları (Modifiye Christensen)	47
<b>Tablo 4.3.</b> Biyofilm oluşumu açısından MRSA ve MSSA suşlarının karşılaştırılması (MTT)	49
<b>Tablo 4.4.</b> Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları	50
<b>Tablo 4.5.</b> Christensen ve MTT yöntemlerine göre biyofilm yoğunluk derecesi karşılaştırması	50
<b>Tablo 4.6.</b> BioTimer yöntemiyle metisilin duyarlı ve dirençli stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma zamanları ve koloni sayılarının karşılaştırılması	52
<b>Tablo 4.7.</b> Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları (BioTimer)	52
<b>Tablo 4.8.</b> Modifiye Christensen ve BioTimer yöntemleri biyofilm pozitiflikleri karşılaştırması	53
<b>Tablo 4.9.</b> CRA yöntemiyle 24. ve 48. saatlerdeki <i>slime</i> faktör pozitiflik oranlarının karşılaştırılması	54
<b>Tablo 4.10.</b> Kan ve yara izolatlarının <i>slime</i> faktör pozitiflikleri (CRA 24 ve 48. saat)	55
<b>Tablo 4.11.</b> CRA 24 ve 48. saat <i>slime</i> faktör pozitifliği ve Christensen yöntemi biyofilm varlığı	55

<b>Tablo 4.12.</b> Christensen yöntemi baz alındığında diğer konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri	56
<b>Tablo 4.13.</b> Kan ve yara izolatlarının <i>icaADBC</i> pozitiflikleri	60
<b>Tablo 4.14.</b> Kan ve yara izolatlarının herhangi bir <i>ica</i> gen bölgesi içermesi bakımından karşılaştırılması	61
<b>Tablo 4.15.</b> PZR’de saptanan biyofilm gen bölgeleri pozitifliği ile modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm varlığının karşılaştırılması	62
<b>Tablo 4.16.</b> <i>ica</i> pozitifliği ile biyofilm yoğunluk derecesi ilişkisi	63
<b>Tablo 4.17.</b> Bir ve birden fazla <i>ica</i> gen pozitifliği bulunan suşlarda biyofilm yöntemlerinin pozitifliklerinin karşılaştırılması	64
<b>Tablo 4.18.</b> Biyofilm tespitinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri	64

# 1. GİRİŞ

Günümüzde tüm dünyada hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların başında gelen etkenlerden biri olan *Staphylococcus aureus*, başta impetigo, folikülit, karbonkül, fronkül, selülit gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları olmak üzere bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pnömoni, osteomyelit ve septik artrit gibi yaygın sistemik enfeksiyonlar ve toksik şok sendromu, septik şok, haşlanmış deri sendromu, besin zehirlenmeleri gibi toksijenik sendromlara neden olmaktadır (1). Stafilokok enfeksiyonlarının patogeneğinde toksin ve ekstraselüler enzim üretimi, antibiyotik direnci ve yabancı cisimlerin yüzeyine yapışarak bu yüzeylerde biyofilm oluşumu rol oynar.

Özellikle hastane enfeksiyonlarında mikroorganizmanın vücut içine yerleştirilen malzemelere yapışması patogeneşte ilk aşamayı oluşturmaktadır (2, 3). Stafilokoklar bu yüzeylere yapışmayı kolaylaştıran “*slime*” faktör oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. *Slime* veya diğer adıyla glikokaliks yapısı; ekzopolisakkarit, teikoik asit ve bir miktar proteinden oluşan ekstraselüler bir oluşumdur. *Slime* oluşturan mikroorganizmaların biyofilm oluşturması kolaylaşır; ayrıca *slime* yapısı bakteriyi fagositozdan korur, opsonizasyon ve kemotaksiyi engeller, nötrofil aktivitesini azaltır ve bakteriyeye virulans kazandırır (4).

Biyofilm, polisakkarit yapıda ekstraselüler bir organik matriks içinde gömülü birbirine ve katı bir taban veya ara yüzeye tutunmuş sıkı ağ yapısında hücre topluluğudur. Gerek büyüme ve gen ekspresyonu, gerekse antibiyotik duyarlılığı açısından farklılaşmış bir yapıdır (5, 6). Biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar (sesil hücreler) antibiyotiklere planktonik (serbest) formlarına göre çok daha dirençlidir ve konakta kronik bir enfeksiyon odağıdır (7, 8).

Biyofilm oluşumunda ilk aşama mikroorganizmanın mikrobiyal adeziv matriks molekülleri (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) olarak bilinen yüzey proteinleriyle uygun yüzeyli yabancı maddeler veya konak doku ligandlarına tutunmasıdır (9, 10).

*S. aureus* biyofilm oluşumunda ikinci ve temel mekanizma ise PIA (Polisakkarit İnterselüler Adezin) sentezidir. Bu sayede bakteriler birbirlerine tutunarak çok tabakalı biyofilm yapısını oluşturmaktadır (11, 12). Poli-N-süksinil- $\beta$ -1-6 glikozamin (PIA-PNSG) polisakkarit adezyon matriksinin üretiminden *icaADBC* operonu sorumludur. Biyofilm oluşumu ile *ica* gen varlığı arasında direk



korelasyon olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (13-15). Bu nedenle *icaADBC* operonu barındıran *S. aureus* suşları potansiyel birer biyofilm üreticisi kabul edilmektedir (16). Bu operon dört ana parçadan oluşur; *icaA*, *icaD*, *icaB* ve *icaC*. Tüm bu genler *ica R* tarafından kontrol edilir (17).

Biyofilm oluşumunu gösteren birçok yöntem vardır (18, 19):

- **Boyama yöntemleri:** Kristal viyole/safranin, 1,9-dimetil metilen blue (DMMB), fluorescein-di-acetate (FDA) ile biyofilm tabakasının komponentleri boyanarak biyofilm varlığı tespit edilebilir. Ayrıca biyofilm kitle kantitasyonu için boyama yöntemlerine ek olarak CFU (Colony Forming Unit) hücre sayımı, total protein miktarı ve kuru ağırlık ölçüm yöntemleri kullanılabilir.
- **Metabolik yöntemler:** MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide}, rezasurin, BioTimer yöntemi, lösin inkorporasyon ve ATP biyoluminesans ile biyofilm yapısını oluşturan canlı bakterilerin sayısı/yoğunluğu tespit edilebilir.
- **Mikroskopik yöntemler:** Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi (CLSLM), Tarayıcı Elektron Mikroskopi (SEM) ve Epiflorasans Mikroskopi ile hem biyofilm yapısını araştırmak hem de bilgisayar programları ile koordine kullanılarak biyofilm kantitasyonunu yapmak mümkündür.
- **Moleküler yöntemler:** PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile biyofilm oluşumundan sorumlu *icaADBC* operon üyeleri ve MSCRAMMlar tespit edilebilir.

Ayrıca Congo Red Agar Yöntemi ile koloni renk ve morfolojisine göre bakterideki *slime* faktör oluşumu gösterilebilir.

Çalışmanın amacı çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin moleküler ve konvansiyonel yöntemlerle araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Stafilokokların Genel Özellikleri

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış 0,5-1,5 µm çapında, yuvarlak, tüm hücreleri uniform, sporsuz ve hareketsiz gram pozitif koklardır. Tek tek hücreler, tetradlar ve kısa zincirler şeklinde görülebilmelerine rağmen genel olarak üzüm salkımına benzeyen (Yunanca: *staphylia* - üzüm) kümeler oluştururlar (20).

Stafilokoklar 1986'da Bergey'in yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflandırmasına göre Planokok, Mikrokok ve Stomatokoklarla birlikte *Micrococcaceae* ailesi içinde yer almıştır; ancak daha sonraları yapılan genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler sonucu bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduğu görülmüş ve stafilokoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin yeni baskısında *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımındaki Staphylococcaceae ailesi içinde sınıflandırılmıştır (21, 22). Günümüzde *Staphylococcus* cinsi içerisinde tespit edilmiş 35 tür bulunmasına karşın *S. aureus* bütün stafilokoklar içerisinde yer alan en önemli insan patojeni olarak izole edilmektedir (23).

*S.aureus* katı besiyerinde 18-24 saatte üreyen, genellikle S tipi altın sarısı pigment oluşturan (Latince: *aureus* - altın), 1-3 mm boyutlarında, yuvarlak, yüzeyden hafif kabarık kolonilere sahip ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz zonu oluşturan bakterilerdir. Nonhemolitik *S.aureus* kolonileri de görmek mümkündür; ancak alfa hemoliz yapan stafilokok türüne rastlanmamıştır. Belirgin kapsül oluşturan suşlar mukoid görünümde kolonilere sahip olabilir. *S.aureus*'un özellikle kronik enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen formlarında besiyerinde küçük, bazen büyüteçle görülebilen, pigmentsiz, hemolizsiz koloniler şeklinde üreyen küçük (cüce) koloni çeşitleri de tanımlanmıştır (20, 24, 25).

*S. aureus* erişkinlerde %20-40 oranında burun taşıyıcılığının yanı sıra; intertrijinöz yani deri katlantı bölgeleri, perine, aksilla ve vajende de kolonize olurlar. Normal insan florasının bir parçası da olsa *S. aureus* lökosit kemotaksi ve antikor opsonizasyon defektleri, deri bütünlüğünün bozulduğu durumlar, yabancı cisim varlığı, kanser ve alkolizm gibi kronik altta yatan hastalık varlığı ve antibiyotik kullanımı gibi durumlarda önemli oportunistik enfeksiyonlara yol açabilir. Bu gibi durumlarda *S. aureus* lokal cilt enfeksiyonlarından hayatı tehdit

eden sistemik enfeksiyonlara kadar birçok hastalığa sebep olabilir. *S. aureus* ilişkili enfeksiyonlar Tablo 2.1’de gösterilmiştir (1, 22).

**Tablo 2.1. *S. aureus* ilişkili enfeksiyonlar**

<b><i>Pirojenik Enfeksiyonlar</i></b>	
Folikülit	Bakteriyemi - Endokardit
Fronkül - Karbonkül	Menenjit
İmpetigo	Perikardit
Süpüratif hidradenit	Pnömoni
Mastit	Osteomyelit – Septik Artrit
Yara yeri enfeksiyonları	Pyomiyozit
<b><i>Toksijenik Enfeksiyonlar</i></b>	
Stafilokokkal besin zehirlenmesi	
Stafilokokkal toksik şok sendromu	
Stafilokokkal haşlanmış deri sendromu	

*S. aureus*’un bu geniş hastalık spektrumuna sahip olmasında rol oynayan virulans faktörleri mevcuttur. Temel virulans faktörü olan A proteini koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) bulunmaz ve IgG’nin (G1, G2, G4) Fc bölgesine bağlanarak opsonizasyonu ve kompleman aktivasyonunu engelleyen tek proteindir. *S.aureus*’un sahip olduğu virulans faktörleri Tablo 2.2’de özetlenmiştir (24-27).

**Tablo 2.2. *S.aureus* virulans faktörleri**

<b>Virulans Faktörü</b>	<b>Biyolojik Aktivitesi</b>
<b>Yüzeyel Yapıları</b>	
Kapsüler polisakkarit	Adezyon, antifagositer etki
Protein A	IgG (G3 dışında) Fc parçasına bağlanma
Teikoik asit	Mukozal yüzeylere tutunma
Peptidoglikan	Zayıf endotoksin benzeri etki
<b>Enzimleri</b>	
Katalaz	Antifagositer etki
Koagülaz	Fibrinojen – fibrin dönüşümü
β - laktamaz	β - laktam halkasının hidrolizi
Hyalüronidaz, Lipaz, Fibrinolizin, Nükleaz	Bakteri yayılımını kolaylaştıran yıkıcı enzimlerdir
<b>Toksinleri</b>	
Eksfoliyatif (epidermolitik) toksin (ET-A, ET-B)	Epidermisteki desmosom köprülerini parçalar, haşlanmış deri sendromuna neden olur
Enterotoksin (A-E,H,I)	Stafilokokkal besin zehirlenmesine sebep olan süper antijenlerdir
Sitotoksin (α, β, γ, δ, Panton-Valentin Lökosidin)	Farklı hücreler özellikler lökositler üzerinde sitolitik etkinlik
Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)	Toksik Şok Sendromuna sebep olan süper antijendir

## 2.2. *Staphylococcus aureus* Tanısı

Stafilokoklar bir başka gram (+) kok olan mikrokoklarla gerek hücre morfolojisi, gerekse katalaz reaksiyonunun pozitifliği sebebiyle sıklıkla karışabilmektedir. Bu nedenle laboratuvarlarda stafilokok tanısı koymak için öncelikle bu bakteriyi *Micrococcus* cinsinden ayırmak gerekir (22). Mikroorganizmanın doğru tanımlanması; patojenin klinik öneminin, hasta ve sağlık çalışanı için oluşturduğu risklerin belirlenebilmesi, uygun antimikrobiyal tedavi seçimi, mikroorganizmaya ait olağan dışı duyarlılık profillerinin görülebilmesi ve antimikrobiyal direnç belirlenmesinde uygun laboratuvar testinin seçimi için gereklidir (22).

Stafilokok olduğu düşünülen bir bakterinin tanımlanması için gram boyama, katalaz testi, furazolidon, lizostafin ve basitrasin duyarlılık deneyleri, glikoz fermentasyonu deneyi, gliserolden asit oluşturma deneyi ve modifiye oksidaz testleri yapılabilir. Stafilokoklar lizostafin ve furazolidona duyarlı, basitrasine dirençlidir. Mikrokoklar ise lizostafin ve furazolidona dirençli, basitrasine duyarlıdır. Stafilokoklar anaerobik koşullarda glikozdan asit oluştururken; zorunlu aerob bir mikroorganizma olan mikrokoklar oluşturmaz. 0,4 µg/mL eritromisin varlığında 3 günlük inkübasyon sonunda stafilokoklar gliserolden asit oluştururken, mikrokoklar asit oluşturmadan ürer. Ayrıca mikrokokların modifiye oksidaz testi pozitifdir (22). Tablo 2.3'te stafilokok - mikrokok ayırımında kullanılan laboratuvar testleri belirtilmiştir.

**Tablo 2.3. Stafilokok - Mikrokok ayırımında kullanılan laboratuvar testleri**

Test adı	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
<b>Koloni Boyutu</b>	0,6 - 1,5 µm	1 - 1,8 µm
<b>Koloni Morfolojisi</b>	kabarık	konveks
<b>Üreme Hızı</b>	Yavaş - hızlı	Çok yavaş
<b>Anaerobik Koşullarda Glukozdan Asit Üretme</b>	+	-
<b>Lizostafin</b>	Duyarlı	Dirençli
<b>Eritromisin Varlığında Gliserolden Asit Oluşturma</b>	+	-
<b>Furazolidon Duyarlılığı</b>	Duyarlı	Dirençli
<b>Basitrasin Duyarlılığı</b>	Dirençli	Duyarlı
<b>Modifiye Oksidaz Testi</b>	-	+

Sitokrom c varlığını gösteren modifiye oksidaz testinde su yerine dimetil sülfoksit (DMSO) içinde %6'lık TMpPD (tetrametil-*p*-fenilenediamin dihidroklorid) ayırıcı kullanılır. Test oksidaz testi ile aynı şekilde uygulanır. Tüm

stafilokok türleri içerisinde *S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* gibi nadir izolatlar dışında modifiye oksidaz testi pozitif olan bir tür belirlenememiştir (22).

Stafilokok cinsi içerisinde *S. aureus* tanısı için koagülaz testi (lamda veya tüpte), mannitol fermantasyon deneyi, termostabil endonükleaz ve deoksiribonükleaz (DNaz) testleri kullanılabilir. Koagülaz testi *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırmak için en yaygın olarak kullanılan ve en değerli testtir. Tüm *Staphylococcus* cinsi içerisinde *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subspecies *coagulans* gibi hayvan izolatları dışında koagülaz reaksiyonu pozitif olan tek tür *S. aureus*'tur. Koagülaz reaksiyonu pozitif olan diğer stafilokok türleri içerisinde VP (Voges - Proskauer) testi pozitif olan iki tür *S. aureus* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans*'tır. *S. aureus* PYR testinin negatif olmasıyla *S. schleiferi* subsp. *coagulans*'tan ayrılır (28).

Tüm stafilokok türleri glukoz fermentasyonu yapar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltoz gibi karbonhidratları da fermente edebilirler. Mannitolu ise sadece *S. aureus* fermente ederek asit son ürün oluşturur. Ayrıca *S. aureus* diğer stafilokok türlerinden ayrı olarak nükleik asitleri hidroliz eden DNaz ve ısıya dirençli (termostabil) endonükleaz oluşturur (20, 22).

Stafilokok tanısında kullanılan alternatif manuel ve otomatize ticari sistemler de mevcuttur;

- API Staph-IDENT, API Staph ve API ID32 Staph (BioMerieux)
- Minitek Gram Positive Panel (BD Microbiology System)
- RapiDEC Staph ve Vitek Gram-Positive Identification (GPI) card (BioMerieux)
- MicroScan Rapid Pos Combo Panel ve MicroScan Pos ID panel (Dade/MicroScan)
- BBL Crystal GP Identification System (BD Biosciences)
- Microbact Staphylococcal 12S (Oxoid)
- Staph-Zym (ROSCO)

bunlar arasında sayılabilir (20, 22).

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry) son yıllarda mikroorganizma tanımlamasında kullanılan hızlı, ve ucuz bir sistemdir. Bu sistemde mikroorganizmaya ait protein, peptit, karbonhidrat gibi küçük biyomoleküller ve bunların polimeri büyük

makromoleküller lazer ışınları ile iyonize edilerek ortaya çıkan iyonlar elektromanyetik bir tüpten geçirilir. Farklı kütlelere sahip iyonlar tüpte ilerleyerek iyon dedektörüne farklı zamanlarda ulaşır ve kaydedilen bu değerler veri tabanındaki kütle spektrofotometrileriyle karşılaştırılarak mikroorganizma tanımlaması yapılır. Yüksek duyarlılıklı bu sistemde *S. aureus* tanısı koymak mümkündür (29).

Ayrıca sürveyans çalışmalarının bir parçası olarak kullanılan epidemiyolojik araştırmalar için antibiyotip, faj ve kapsül tiplendirilmesi, plazmid profili, ribotipleme, PZR, PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), MLST (multilocus sequence typing), kromozomal DNA restriksiyon analizi gibi testler de yapılmaktadır (23).

### **2.3. *Staphylococcus aureus* Antibiyotik Direnci**

Stafilokoklar yaklaşık 2800 baz çifti (bç) uzunluğunda, plazmidler, profajlar ve transpozonlar içeren sirküler bir genoma sahiptir. Antibiyotik direnci ve virulanstan sorumlu genler genellikle kromozomal kaynaklı olsa da ekstrakromozomal yapılardan da kaynaklanabilir. Ekstrakromozomal yapılardan kaynaklanan bu direnç stafilokok türleri ve diğer gram pozitif bakterilere aktarılabilir (30).

*S. aureus* antibiyotik direnci ilk kez 1930'lerde kullanıma giren sülfonamidlere karşı saptanmıştır. Özellikle penisilinin keşfi ve klinik kullanımının yaygınlaşmasından önce *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonlarda mortalite hızı %80'lere kadar ulaşmıştır (31). 1928'de penisilinin keşfi sonrası stafilokok enfeksiyonları büyük oranda tedavi edilebilir hale gelmiştir; ancak 1944 yılında ilk beta-laktamaz (penisilinaz) üreten stafilokokların varlığı bildirilmiştir (32). Günümüzde ise stafilokokların büyük bir çoğunluğu tedavide ilk basamak ilaç olan penisiline dirençlidir (duyarlı suş oranı <%5). Penisilin grubu antibiyotiklerin sahip olduğu beta-laktam halkasını parçalayan ve stafilokokların %90'ından fazlasının sahip olduğu beta-laktamaz plazmidle kodlanan bir virulans faktörüdür ve serin proteaz yapısındadır (33). Bu sebeple günümüzde stafilokokkal enfeksiyonların tedavisinde penisilin G'nin rolü son derece kısıtlıdır.

Stafilokokların penisilin direncine çözüm getirebilmek adına beta-laktamaz hidrolizine dirençli metisilin, nafsilin, oksasilin, diklokzasilin gibi semisentetik penisilinler (antistafilokokal penisilinler) geliştirilmiştir. İlk antistafilokokal penisilin olan metisilinin 1960 yılında kullanıma girmesinin ardından çok kısa bir

süre sonra 1961’de ilk metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları Avrupa’da bildirilmeye başlanmış ve ilk epidemik MRSA suşu 1980 yılında İngiltere’de tanımlanmıştır (34). Bu tarihten itibaren stafilokok suşlarında başta diğer beta laktam antibiyotikler olmak üzere içinde makrolid, tetrasiklin, kinolon, linkozamid, aminoglikozit grubu antibiyotiklerin de bulunduğu çoklu antibiyotik direnci giderek artan sıklıkta görülmeye başlanmıştır (35).

Çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA suşlarının hem toplum hem hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir etken olması sebebiyle glikopeptit antibiyotikler tedavide tercih edilir hale gelmiştir. 1958’de klinik kullanıma giren vankomisine karşı uzun yıllar boyunca direnç saptanmamıştır. İlk defa 1996 yılında Japonya’da vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA suşunun tanımlanmasının hemen ardından (36) kısa süre içerisinde ABD, Fransa ve Uzak Doğu’dan da çeşitli olgular bildirilmiştir (37-40).

İlk vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) suşunun 2002 yılında ABD’de tanımlanmasından sonra kısa sürede, içerisinde ABD, İran ve Hindistan’ın da bulunduğu çeşitli ülkelerden VRSA olguları bildirilmeye başlanmıştır (41).

MRSA kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlar direnç probleminin de giderek artmasıyla beraber tüm dünyada giderek ciddiyetini artıran bir sağlık sorunu haline gelmektedir.

### **2.3.1. *Staphylococcus aureus*’ta Metisilin Direnci**

Metisilin direnci beta-laktamaz hidrolizine dirençli antistafilokokal penisilinlere (metisilin, oksasilin, nafsilin, temosilin, kloksasilin, diklokzasilin) karşı meydana gelen dirençtir. Metisilin direncinin 1961 yılında tanımlanmasının ardından özellikle 80’li yıllardan sonra yeni *SCCmec* kasetlerinin kazanılmasının da etkisiyle farklı direnç profillerine sahip nozokomiyal MRSA enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir epidemiyolojik sorun haline gelmiştir. Toplum kökenli MRSA enfeksiyonları 90’lı yıllardan itibaren görülmeye başlanmış ve günümüzde görülme sıklığı giderek artmıştır (3, 31, 42).

MRSA enfeksiyonları dünya genelinde yüksek oranda görülmesine rağmen prevelans ülkeler, hastaneler, hatta aynı hastanelerin farklı klinikleri arasında bile oldukça değişkenlik göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevelansı %2’nin altındayken Orta Avrupa’da yaklaşık %10, Balkan ülkeleri ve Türkiye’de

%25, Çin ve bazı Asya ülkeleri, Amerika ve Afrika'da %50 ve Doğu Asya'da %60-80'lere varan oranda metisilin direnci görülmektedir (3, 43).

### **2.3.1.1. Metisiline Direnç Mekanizmaları**

#### **2.3.1.1.1. Modifiye penisilin bağlayıcı protein senteziyle oluşan direnç**

MSSA suşlarında beş, MRSA suşlarında 7 adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunur. 78 kDa ağırlığındaki PBP2a penisilin bağlayan proteinin değişimiyle oluşur. Bu değişimi *mecA* olarak adlandırılan ve stafilokokal kaset kromozomu (Staphylococcal Cassette Chromosome; SCC) üzerinde bulunan gen kodlar (31). SCC bakteriyel kromozom replikasyon bölgesinin yakınında bulunan *mec* ve *ccr* gen komplekslerinden oluşan bir direnç adasıdır. *mec* gen kompleksi metisilin direncine neden olurken *ccr* kasetin mobilizasyonundan yani; bakteriyel genomu integrasyon ve eksizyonundan sorumludur (44).

PBP2a ekspresyonu metisilin duyarlı izolatlarda görülmezken; *mecA* geni tüm dirençli suşlarda bulunmaktadır. Bu modifiye proteinin ekspresyonu mikroorganizmada beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük bağlanma ilgisine neden olur. Beta-laktam grubu antibiyotikler bakteri PBP yapısına bağlanır ve hücre duvarı peptidoglikan sentezini bozarak etki ederler. PBP2a varlığında peptidoglikan sentezi devam eder ve böylece mikroorganizma antibiyosidal etkinlikten kurtulmuş olur (42, 45).

#### **2.3.1.1.2. Penisilin bağlayıcı proteinlerin beta-laktam afinitesinin azalması ile oluşan direnç**

*mecA* geni taşımadığı halde mikroorganizmada hali hazırda var olan PBP'lerdeki nokta mutasyonu veya PBP hiperekspresyonu sonucu beta-laktam antibiyotiklere düşük bağlanma ilgisi gösteren stafilokokların varlığından bahsedilmiştir (46). Çok az sayıda görülen bu türlerin oksasiline MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değerleri 8-16 mg/L arasında bulunmuş, bu suşların bir kısmında PBP2 ve PBP4'te nokta mutasyonu olduğu, bir kısmında ise PBP4'ün aşırı üretildiği görülmüştür (35, 46).

#### **2.3.1.1.3. Aşırı beta-laktamaz enzim üretimi sonucu oluşan direnç**

Beta-laktamaz enzim üretimi plazmid kaynaklı *blaZ* geni ile kodlanır. Beta-laktamaz plazmidine sahip olan bakteride aşırı beta-laktamaz aktivitesi görülür. Bunun sonucunda metisilin kısmen yıkılarak metisiline dirençli bakteriler görülmesine neden olabilir (47).



### **2.3.1.2. Metisilin Direncinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler**

MRSA suşlarındaki çoklu antibiyotik direnci sebebiyle metisilin dirençli izolatların doğru teşhis edilmesi son derece önemlidir. Yanlış MSSA tanısı etkisiz antibiyotik kullanımıyla tedavide başarısızlığa ve dirençli suşların yayılmasına sebep olur. Aynı şekilde yanlış MRSA tanısı ise tedavide son seçenek olarak saklanması gereken glikopeptid antibiyotiklerin gereksiz yere kullanılması ve bunun sonucunda bu antibiyotiklere direnç gelişiminin hızlanmasına neden olur (48). Tüm bu sebeplerle metisilin direncinin doğru tespit edilmesi büyük bir önem arz etmektedir.

#### **2.3.1.2.1. Genotipik Yöntemler**

Günümüzde MRSA tespitinde PZR ile *mecA* gen varlığının gösterilmesi altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (49). PZR ile çoğaltılan *mecA* genine ait DNA parçaları agaroz jel elektroforezde yürütülerek gösterilebildiği gibi *real-time* PZR ile eş zamanlı olarak hem amplifikasyonun gerçekleştirilmesi hem de *mecA* genine ait artmış sinyalin gösterilmesi mümkündür.

MRSA tanısında moleküler yöntemler altın standart olarak kabul edilse de her laboratuvar PZR için yeterli özel donanım ve eğitilmiş personele sahip değildir. Bu nedenle MRSA tanısında fenotipik testler hala önemini korumaktadır.

#### **2.3.1.2.2. Fenotipik Yöntemler**

**2.3.1.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi:** Yakın bir geçmişe kadar CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) MRSA tanısında hem metisilin diskine oranla daha stabil olması hem de daha yüksek özgüllük göstermesi sebebiyle diğer bir antistafilokokal ajan olan oksasilin diskinin kullanımını önermekteydi; ancak oksasilin disk difüzyon testinin özellikle heterojen direnç gösteren MRSA suşlarının ayrımını yeterince yapamadığı gerekçesiyle günümüzde oksasilin disk difüzyon testinin metisilin direncinin araştırılmasında tek başına kullanımı önerilmemektedir (50, 51). Günümüzde en sık kullanılan fenotipik yöntem sefoksitin disk difüzyon (SDD) yöntemidir. Bu yöntemde 0,5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanarak Mueller-Hinton Agar (MHA) yüzeyine steril bir eküvyon yardımıyla yayılır. 30 µg'lık sefoksitin diski yerleştirilir ve plak 35°C'de 16-18 saat inkübe edildikten sonra antibiyotik diskinin çevresinde

üreme olmayan (tam inhibisyonun gözleendiği) zon çapı ölçülerek duyarlılık belirlenir. Tablo 2.4'te CLSI ve EUCAST tarafından belirlenen SDD yöntemi duyarlılık zon çapları belirtilmiştir (50,51).

**Tablo 2.4. SDD yöntemi eşik sınır değerleri**

	<b>Duyarlı (S)</b>	<b>Dirençli (R)</b>
<b>CLSI</b>	≥22 mm	≤21 mm
<b>EUCAST</b>	≥22 mm	<22 mm

Yurtiçi ve yurtdışında yapılan birçok çalışma SDD yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü yüksek (duyarlılık %98,6 -100; özgüllük %99,1-100) bulmuş ve bu testin metisilin direncinin tespitinde moleküler yöntemlere bir alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (52-54).

#### **2.3.1.2.2.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi:**

Oksasilin duyarlılığı için sıvı dilüsyon yönteminde %2 NaCl içeren katyon ayarlı Mueller Hinton Buyyon, agar dilüsyon yönteminde %2 NaCl içeren MHA kullanılır. Ayrıca bir MİK belirleme yöntemi olan gradient difüzyon testi de tanıda önemli yer tutmaktadır. Disk difüzyon yöntemi ile aynı şekilde hazırlanan plaklara oksasilin içeren gradient stripleri yerleştirilir ve oluşan elips şekilli inhibisyon zonunun test sribini kestiği nokta MİK değeri olarak kabul edilir. CLSI MRSA tanısında oksasilin MİK değerini ≥4 µg/ml olarak kabul ederken, EUCAST 2 mg/L üzeri konsantrasyonları MRSA olarak kabul etmektedir (50, 51). MİK değeri ≥4 µg/ml olan suşlar *mecA* veya PBP2a yönünden negatif dahi olsalar MRSA olarak bildirilmelidir (50).

Yapılan çalışmalar gradient difüzyon testinin SDD yöntemine oranla duyarlılık ve özgüllükte bir artışa neden olmadığını göstermekle birlikte bu testin yüksek özgüllüğü sayesinde yanlış pozitif sonuç verme olasılığının son derece düşük olduğunu göstermiştir (49, 55).

**2.3.1.2.2.3. Agar Tarama Yöntemi:** MRSA tespitinde kullanılan bir diğer yöntem olan agar tarama yönteminde 6 µg/mL oksasilin ve %4 NaCl içeren MHA besiyeri hazırlanır. Bakteri süspansiyonundan ekim yapılır ve 24 saatlik inkübasyonun ardından plaklar kontrol edilir. Plakta tek bir koloninin varlığı bile MRSA tanısı lehinedir (50, 56).

Oksasilin agar tarama yöntemi maliyeti düşük ve uygulaması kolay bir fenotipik yöntemdir. Yapılan çalışmalar bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün %90'ın üzerinde olduğunu göstermekle beraber düşük ekspresyon gözlenen heterorezistan suşlarda kullanıldığında duyarlılığının azaldığını göstermiştir (57-59).

**2.3.1.2.2.4. Kromojenik Besiyeri:** Piyasada ticari olarak bulunabilen ve çeşitli enzim substratları içeren bu besiyerleri son yıllarda fenotipik tanı yöntemleri içerisinde yerini almıştır. Besiyerindeki substratlar enzim varlığında meydana gelen reaksiyon sonucu renkli son ürünlerin; dolayısıyla da renkli kolonilerin oluşmasına neden olur.

Kromojenik besiyeriyle ilgili yapılan çalışmalar farklı duyarlılık ve özgüllük oranları vermiştir (49, 60, 61). Özellikle özgüllük değerleri bazı çalışmalarda düşük bulunmuştur (48, 62). Bu nedenle her ne kadar pratik ve nispeten hızlı bir tanı yöntemi de olsa kromojenik besiyerinin yanlış pozitif sonuç verme olasılığı göz önünde bulundurulmalı ve metisilin direncinin pozitif saptandığı izolatlarda sonucun diğer yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir.

**2.3.1.2.2.5. Lateks Aglütinasyon:** Ticari olarak bulunabilen ve PBP2a varlığında aglütinasyon oluşumuna dayanan bir yöntemdir. MRSA tanısında kolay uygulanabilen ve hızlı sonuç veren (yaklaşık 20 dakika) testlerdir. Aynı anda çok sayıda örnek çalışma olanağı vardır. Kolay uygulanması ve hızlı sonuç vermesi sebebiyle çabuk karar verilmesi gereken ciddi enfeksiyonların tanısında veya diğer fenotipik yöntemlerle konulan MRSA tanısını doğrulamak amacıyla kullanılabilir (59, 63).

Yapılan çalışmalar MRSA tanısında lateks aglütinasyon testinin yüksek duyarlılık ve özgüllükte olduğunu göstermiştir (duyarlılık %97-100, özgüllük %95-99) (59, 64). Ayrıca PBP2a yokluğunda lateks aglütinasyon testleri pozitif sonuç verebilir. Bunun sebebi daha önce bahsedilen metisilin direnç mekanizmalarından PBP4'ün hiperekspresyonu veya PBP2 ve PBP4'teki nokta mutasyonlar olabilir (63).

**2.3.1.2.2.6. Otomatize Duyarlılık Sistemleri:** Metisilin direncini kalitatif veya kantitatif olarak saptayan otomatize sistemler mevcuttur. Vitek (bioMerieux Vitek, Mo.) ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) gibi bu otomatize sistemler antibiyotik duyarlılık sonucunu yaklaşık 16-24 saat içerisinde verir.

Yurtiçi ve yurtdışında MRSA tanısı koymada otomatize sistemleri birbiriyle ve diğer fenotipik yöntemlerle karşılaştıran çalışmalarda özgüllük değeri %100 olarak görülürken, duyarlık sonuçlarında farklılıklar gözlenmiştir (duyarlılık %80-97,5) (65, 66). Ayrıca 254 MRSA suşunun kullanıldığı bir çalışmada Vitek sisteminin suşların %14,2'sinde yanlış duyarlı sonuç verdiği ve MRSA tanısında otomatize sistemlerin kullanılmaması gerektiğinden bahseden eski bir çalışma da mevcuttur (67). Otomatize iki sistemin eş zamanlı olarak metisilin direncini belirleme oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada Phoenix sisteminin duyarlılığı %99,8 tespit edilmiş ve hem Phoenix hem de Vitek otomatize sisteminin metisilin direncinin saptanmasında güvenilir olduğu ve rutin laboratuvarlarda kullanımının uygun olduğu kanısına varılmıştır (68).

## **2.4. Biyofilm Yapısının Tanımı ve Tarihçesi**

Biyofilm kavramının ortaya atılmasından önce mikrobiyolojik araştırmalar bir mikroorganizmayı kültür ortamında invitro şartlarda üretmek ve o mikroorganizmayla ilgili çalışmaların sonuçlarını hem invitro hem de invivo formlara genellemek şeklindeydi. Ancak konfokal lazer mikroskopisi, nükleer manyetik rezonans görüntüleme ve floresan probaları gibi yeni tanı yöntemlerinin kullanıma girmesiyle birlikte mikroorganizmaların invivo formlarının invitro formlarından çok farklı özellikler taşıdığı keşfedilmiştir. Biyofilm kavramı da bu invivo mikro-sistemlerden biridir (69).

Leeuwenhoek'un 17. yüzyılda mikroskopu keşfi ve kendi diş plaklarında ilk defa mikroskopik canlıları görmesinin ardından 1943 yılında Zobelli, daha sonrasında Characklis ve Costerton bugün bildiğimiz şekliyle biyofilm yapısından söz etmiştir (70). Bu tarihten sonra biyofilmin genel yapısı, oluşum süreci, özellikleri, oluşumunu etkileyen faktörler, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi, antibiyotik duyarlılığı ve direnç paternleri ile ilgili çalışmalar giderek artmıştır. Günümüzde özellikle oluşum mekanizmasında rol alan moleküler temeller ile ilgili çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır.

Biyofilm yapısı ile ilgili çok sayıda tanımlama yapılmıştır. Mikroorganizmaların ekzopolimer matriksle oluşturduğu yapı, yüzeye yapışmış organik matrikse bakterilerin gömülmesiyle ortaya çıkan organizasyon gibi tanımlar almıştır (71, 72). Post ve arkadaşları biyofilm yapısını birbirleriyle haberleşerek ve

belli bir yapısal bütünlük içerisinde yaşayarak devamlılığını sağlayan hücrel organizasyon olarak tanımlanmış ve biyofilm yapısını oluşturan bakterilerin “*quorum sensing*” özelliğine dikkat çekmiştir (73). Biyofilm tam tanım olarak; kendi ürettikleri polisakkarit yapıda ekstraselüler organik matriks içinde gömülü birbirine ve katı bir taban veya ara yüzeye tutunmuş sıkı ağ yapısında, hareketsiz ve birbirleriyle iletişim halinde bir hücre topluluğudur. Gerek büyüme ve gen ekspresyonu, gerekse antibiyotik duyarlılığı açısından plaktonik formlarından farklılaşmış bir yapıdır ve konakta kronik bir enfeksiyon kaynağıdır (5, 6).

## 2.5. Biyofilm Yapısının Oluşumu

Biyofilm oluşumu beş aşamadan oluşan dinamik bir süreçtir (3, 70, 73-75):

**2.5.1. Yüzey Koşullandırması:** Mikrobiyal birikimden önce makromoleküler organik komponentlerin yüzeye adsorbsiyonu biyofilm oluşumunda ilk aşamayı oluşturur. Örneğin damar içindeki bir santral venöz kateter (SVK) hemen plateletler, plazma ve albümin, kollajen, fibrinojen gibi doku proteinleri tarafından kaplanır. Oluşan bu yüzey bazı bakteriyel yüzey proteinlerinin tutunması için uygun bir ortam sağlar.

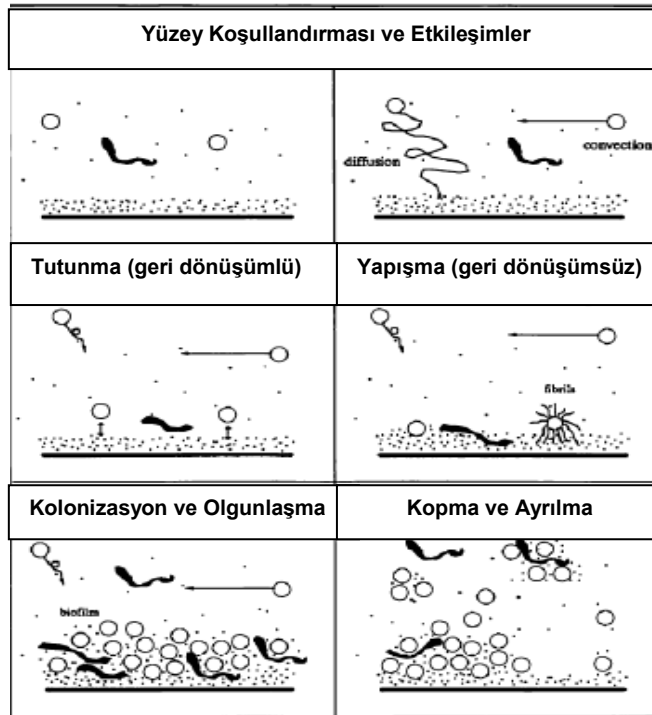
**2.5.2. Tutunma:** Glikoprotein, müsin, aktin ve DNA gibi organik moleküllerin yüzey adsorbsiyonunun ardından bu komponentlere mikroorganizmalar başlangıçta tersinir olarak bağlanır. Mikroorganizmaların yüzeye bu tersinir bağlanması planktonik bakteri yükü ve aktif bakteri hareketliliğinden etkilenir. Ayrıca adezyon bakteri ile yüzey arası spesifik veya spesifik olmayan fizikokimyasal ve elektrostatik etkileşimler sonucu gerçekleşir. Spesifik olmayan etkileşim kuvvetleri arasında Van der Waals kuvveti, asit-baz etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimler sayılabilir. Spesifik etkileşimler (örn. stafilokokkal yüzey proteinleri) bu spesifik olmayan etkileşimler sonucu oluşan ve 1,5 nm’den daha küçük yüzeylerde etkili olan kuvvetlerdir.

**2.5.3. Yapışma:** Tutunma işleminin ardından planktonik bakterilerdeki *quorum sensing* mekanizmasıyla fenotipik değişiklikler ve yüzeye geri dönüşümsüz tutunma başlar. Yüzeye tutunan bakteriler matriksin ana maddesi olan ekzopolisakkaritleri sentezlerler ve böylece hem yüzeye yapışma artar hem de hücreler arası köprüler kurulur.

**2.5.4. Kolonizasyon ve Olgunlaşma:** Yüzeye yapışan bakterilerin giderek çoğalmasıyla mikrokoloniler oluşur. Mikrokolonilerin büyümesi ve ortamdaki

planktonik bakterilerin de mikrokoloni yüzeyine tutunmasıyla kompleks bir yapı oluşur ve kolonizasyon gerçekleşir. Mikrokoloni formasyonuna sekrete edilen yüzey makromolekülleri aracılık eder. Bu makromoleküllerden en önemlisi PIA'dır. PIA adherans sonrası hücre-hücre etkileşiminde rol oynar. PIA negatif suşların polimer yüzeylerde birikmediği ve klasik mikrokoloni yapısında olmadığı gösterilmiştir.

**2.5.5. Kopma ve Ayrılma:** Tek bir bakteri veya bakteri agregatları biyofilm tabakasından koparak çevreye dağılır. Bu ayrılma akışkanların uyguladığı kuvvet veya ekstraselüler matriksin degradasyonu gibi eksternal faktörlere bağlı olabileceği gibi ayrılan hücrelerin embolizasyonu veya biyofilm topluluğunun yüzey boyunca dalgalanma hareketi gibi aktif biyofilm kaynaklı bir süreçten de kaynaklanabilir. Besin ve oksijen eksikliği, antimikrobiyal ajanlara maruziyet, bakterilerin sentezlediği sürfaktan gibi kayganlaştırıcı moleküllerin varlığı kopma ve ayrılma sürecini hızlandıran etmenlerdir. Üst tabakadan koparak ayrılan bu planktonik hücreler farklı yüzeylerde yeni biyofilm odakları oluşturabilirler. Biyofilm yapısı olgunlaştıktan sonra bu süreç kalıcı hale gelir. Biyofilm oluşum basamakları Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir (76).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum basamakları (76)

## 2.6. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Bakteriler canlı ve cansız çok çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşumunda bakterinin biyofilm oluşturma yetisi, hücre duvar yapısı, hareketliliği; biyofilm oluşacak yüzeyin özellikleri ve ortam pH'ı, iyonik denge, ortamdaki besin kaynaklarının miktarı ve içeriği, sıcaklık gibi çevresel faktörler rol oynar. Bakterilerin bu yüzeylere tutunması yüzey hidrofilikliği ve elektriksel yükü, serbest yüzey enerjisi, yüzey pürüzlülüğü ve yüzeyin kimyasal yapısıyla yakından ilgilidir (77, 78). Bakteriler ortam koşulları olumsuzlaştıkça biyofilm oluşturma eğilimlerini artırır. Uygun olmayan ortam koşullarında üretilen biyofilmlerin sertliğinin arttığı ve böylece mekanik kırılmalara karşı daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (6).

Her bakteri farklı yüzeylerde farklı miktarlarda biyofilm oluşturabilir. Örneğin *Legionella pneumophila* biyofilm oluşumu için daha çok lateks ve plastik yüzeyleri tercih ederken, *Aeromonas hydrophila* polibütilen gibi demir ve bakıra oranla daha hidrofobik yüzeyleri tercih eder (79, 80). *S. aureus*'un da 28°C ve üzeri sıcaklıklarda biyofilm oluşumu için polipropilen yüzeyleri daha çok tercih ettiği gösterilmiştir (81). Genel olarak materyalin yüzey hidrofobikliği ile biyofilm ve yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması arasında pozitif yönlü bir ilişki söz konusudur (77).

Yüzey pürüzlüğünün de biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Ancak yüzey pürüzlülüğü başlangıç adezyonunu artırmaktan ziyade oluşan biyofilm yapısının ayrılmasını zorlaştırarak biyofilm oluşumunu destekler. Yüzey pürüzlülüğü - bakteriyel adezyon ilişkisini inceleyen bir çalışmada pürüzsüz yüzeylerde kolonizasyonunun da pürüzlü yüzeyler kadar kolay olduğu ve yüzeyin fiziksel özelliklerinin bakteri adezyonuna minimal etki ettiği gösterilmiştir (82).

Bir diğer önemli etmen olan serbest yüzey enerjisi termodinamik etkileşimlerle hem adezyonu artırıp azaltarak hem de biyofilm yapısının geri dönüşümlü veya dönüşümsüz oluşuna sebep olarak biyofilm formasyonunu etkiler. Yüzey elektriksel yükü de adezyon prosesine etki eder. Pozitif yüklü yüzeyler başlangıç adezyonunu artırmasına rağmen bakterinin yüzeyde çoğalmasını inhibe ederek biyofilm kaynaklı enfeksiyon riskini azaltır (77).

Çalışmalar adezyon prosesinde bakteri yüzey özelliklerinin en az yabancı cisim yüzey özellikleri kadar, hatta bu ara yüzey özelliklerinden daha önemli olduğunu

göstermiştir. Örneğin hücre hidrofobikliği arttıkça hem hidrofobik hem de hidrofilik yüzeylere tutunma artar. Hidrofilik özellik gösteren bakteriler hidrofobik yüzeylerden daha kolay ayrılırlar (77).

Son yıllarda biyofilm oluşumunu inhibe edici çeşitli ajanlarla kaplanmış tıbbi malzemeler kullanılarak biyofilm kaynaklı enfeksiyonların önüne geçmek amaçlanmıştır. Gümüş kaplı üriner kateterlerin kullanımıyla üriner enfeksiyon sıklığında azalma olabileceği, heparin kaplı intravenöz kateterler ile tıkanıklık ve biyofilm oluşumunun engellenebileceğinden bahsedilmiştir (83, 84). Siprofloksasin ve vankomisin ile antikoagülan madde kombinasyonlarının, polivinil klorid ve polietilen gibi polimerlerle yapılmış malzemelerin biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan tutunma evresini inhibe ederek biyofilm oluşumunun önüne geçtiğinden bahsedilmiştir (85).

### **2.6.1. Biyofilm Oluşumunu Düzenleyen Moleküler Mekanizmalar ve *ica* Operonu**

Biyofilm oluşumu farklı aşamalardan oluşan dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Biyofilm oluşumunda ilk aşama mikroorganizmanın mikrobiyal adeziv matriks molekülleri yani MSCRAMM'lar olarak bilinen yüzey proteinleriyle uygun yüzeyli yabancı maddeler veya konak doku ligandlarına tutunmasıdır (9, 10).

*S. aureus* farklı protein yapılarına sahip birçok MSCRAMM içerir ve böylece konakta birçok farklı yapıda hücreye tutunabilir. *S. aureus*'un sahip olduğu MSCRAMMlar;

- elastin bağlayıcı protein (*ebpS*)
- laminin bağlayıcı protein (*eno*)
- kollajen bağlayıcı protein (*cna*)
- fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (*finbA* - *finbB*)
- fibrinojen bağlayıcı protein (*fib*)
- clumping faktörler A and B (*clfA* - *clfB*)
- kemik siyaloprotein bağlayıcı protein (*bbp*)'dir (10, 16).

Bu MSCRAMM'lar birden fazla matriks proteinine birden bağlanabilir. Bu da *S. aureus*'un farklı dokularda biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar yapma yeteneğini artırır (86, 87).



*S. aureus* biyofilm oluşumunda ikinci ve temel mekanizma ise PIA sentezidir. Bu sayede yüzeye tutunan bakteriler birbirine yapışarak çok tabakalı biyofilm yapısını oluşturur (interselüler adezyon) (11, 12). Poli-N-süksinil- $\beta$ -1-6 glikozamin polisakkarit adezyon matriksinin üretiminden *icaADBC* operonu sorumludur. Biyofilm oluşumu ile *ica* gen varlığı arasında direk korelasyon olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (13, 15, 88). Bu nedenle *icaADBC* operonu barındıran *S. aureus* suşları potansiyel birer biyofilm üreticisi kabul edilmektedir (16).

*S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarında *icaADBC* operonu bulunmaktadır. Başta *S. lugdunensis* olmak üzere diğer KNS türlerinde de operonun homolog sekanslarına rastlanmıştır (88, 89).

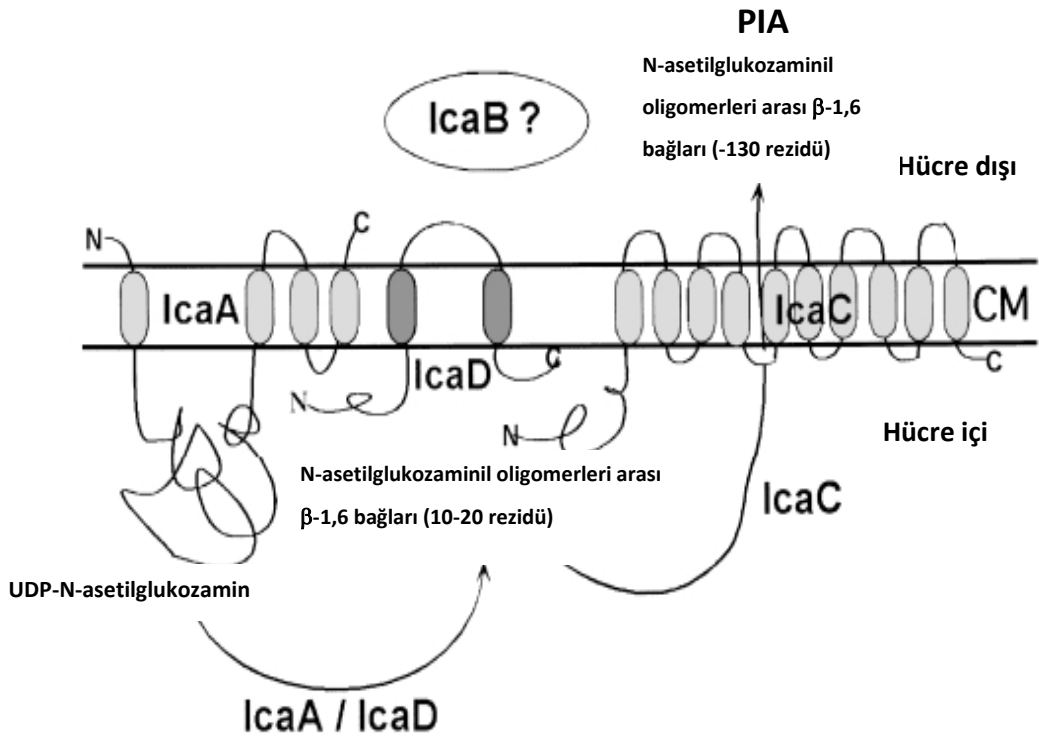
Bu operon üç ana parçadan oluşur; *icaA*, *icaD*, *icaB* ve *icaC*. Tüm bu genler *ica R* tarafından kontrol edilir (17). *icaA* PIA sentezinden sorumlu olan N-asetilglukozamil transferaz enziminin sentezinde rol alır. N-asetilglukozamin biyofilm tabakasının ana yapıtaşıdır. *icaB* deasetilasyon aşamasında katalizör görevi yaparak PIA'nın olgunlaşmasından sorumlu iken, *icaC* deasetilasyon aktivitesiyle polisakkaritin elongasyonundan sorumludur. *icaD* geni ise N-asetilglukozamil transferaz'ın maksimal ekspresyonunda rol oynar ve *icaA* geni ile koekspresyonu N-asetilglukozamin transferaz aktivitesinde belirgin derecede artışa yol açar (13, 90-92). *icaA* her ne kadar N-asetilglukozamil transferaz aktivitesinde önemli bir role sahip olsa da yalnızca *icaA* içeren suşların düşük ekspresyon gösterdiği; ancak *icaD* ile beraber *icaA* içeren bakterilerin kapsüler polisakkarit fenotipinde ve dolayısıyla biyofilm oluşumunda artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 92, 93).

*icaADBC* operonunun özellikle ortam koşulları anaerop yöne kaydıkaçta ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Biyofilm yapısı da mikroorganizmalara nisbi bir anaerop ortam sağlar. Ayrıca ortam osmolaritesi ve sıcaklığı ile ortamdaki glukoz, etanol ve antibiyotik gibi maddelerin varlığı *ica* regülasyonunda rol alan diğer etmenlerdir (16).

*S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumu ve PIA-PNSG üretiminde *ica* operonunun önemli rolüne rağmen PIA-bağımsız biyofilm mekanizmalarının varlığından da bahsedilmiştir. Bu bakterilerde *ica* yokluğunda bakterinin biyofilm oluşumu konak ekstraselüler matriksine tutunmayı sağlayan MSCRAMMlar sayesinde gerçekleşmektedir (94, 95). Yapılan bir çalışmada cilt florasından izole edilen saprofitik stafilokok suşlarında *ica* gen bölgesinin bulunmadığını

göstermiştir. Hastane çalışanları ve sağlıklı erişkinler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise sağlık çalışanlarının florasındaki stafilkok türlerinin hastane dışındaki sağlıklı erişkinlerinkinden belirgin derecede yüksek oranda *ica* gen bölgesini içerdiği gözlenmiştir (13, 93). Tüm bu sebeplerle *ica* operonu stafilkok türlerinin biyofilm formasyonunda önemli bir role sahiptir.

Şekil 2.2’de *icaADBC* operonunun biyofilm oluşumundan sorumlu PIA biyosentezindeki rolü görülmektedir (90).



Şekil 2.2. *icaADBC* operonu ve PIA sentezi (90)

## 2.7. Biyofilm Yapısının Organizasyonu ve Genel Özellikleri

Doğada bakteriler planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız, tek başlarına dolaşan serbest formda veya bir yüzeye tutunup diğer bakterilerle birlikte bir tabaka oluşturarak “sesil form” yani bağlı formda bulunabilirler. Planktonik form bakterinin çoğalıp yayılması için önemliyken sesil form bakteriyi antimikrobiyal ajanlardan ve çevre koşullarından koruyarak bakteri popülasyonunun kalıcılığını sağlar (6).

Bir biyofilmin kütlece %97’si sudan oluşur. %2-5 mikroorganizma, %1-2 ekzopolisakkarid, %1-2 protein (olitik enzimler ve diğer proteinler), %1-2 DNA (nükleik asit, fosfolipid) ve yapıyı çevreleyen iyonlar biyofilm yapısının diğer

bileşenleridir. Bu değerler ve dolayısıyla matriks dansitesi bakteri türü ve ortam özelliklerine göre az miktarda değişkenlik gösterebilir (8, 96).

Biyofilm yapısının ana komponentlerinden biri olan ekstraselüler matriks biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Biyofilmler tek bir mikroorganizma kökenli olabildiği gibi birden fazla mikroorganizma çeşidini de içerebilir. Heterojenik biyofilmlerde her mikroorganizma kendi mikrokolonisini oluşturur ve biyofilm yapısı genellikle düzensiz olur (96). Farklı mikroorganizmalardan salgılanan ekzopolisakkaritler kimyasal ve fiziksel olarak farklı özellikler gösterebilirler ve bunun sonucunda farklı matriks yapıları ortaya çıkar. Örneğin gram negatif bakterilerin oluşturduğu biyofilmler daha çok nötral veya anyonik yapıdayken, gram pozitif bakteriler katyonik tabiatta biyofilmler oluştururlar (97).

Kalın ve hücre yüzeyini bir ağ gibi ören bu ekstraselüler matriks hücrelerin su ve besin ihtiyacını karşılamak amacıyla su kanalları içerecek şekilde organize olmuştur. Mikrokoloniler birbirinden bu kılcal yapıdaki su kanallarıyla ayrılmış durumdadır. Biyofilmin mevcudiyetini devam ettirmesi için gerekli olan besin, su ve oksijen bu gözenekli yapı sayesinde biyofilm tabanına taşınır. Primitif kılcal damarlara benzeyen bu yapı sayesinde toksik metabolitler de biyofilm yüzeyine taşınarak uzaklaştırılır (82, 96).

Biyofilm yapısının %90'ından fazlasını oluşturan ekstraselüler matriks sayesinde bakteriler hem fagositozdan ve oksidatif mekanizmalardan korunur hem de konak immün sisteminden saklanmış olur. Biyofilm içerisindeki bakterilerin planktonik formlarına göre antibiyotiklere 200-500 kat daha dirençli olduğunu gösteren invitro çalışmalar mevcuttur (5, 8, 98). Biyofilm antijenine karşı antikor oluşsa da bu antikorlar yalnızca planktonik formları elimine etme özelliğine sahiptir; çünkü ekstraselüler matriksi geçip biyofilm oluşturan hücrelere ulaşamaz. Benzer şekilde antimikrobiyal ajanlar da biyofilm tabanına ulaşmakta yetersiz kalarak yalnızca planktonik formlara etki ederler. Böylece semptomlar bir miktar baskılanır ve yetersiz tedavi sonucu antibiyoterapi sonrası tekrarlayan kronik enfeksiyonlar meydana gelir (82, 99).

Bakteri yüzeyini kalın bir katman olarak saran bu ekstraselüler matriks yalnızca antimikrobiyal ajanlara değil, kimyasal maddelere karşı da mekanik kalkan görevi yapar. Biyofilm tabakası içindeki sesil bakteriler dezenfektanlara planktonik

formlarına göre 10 ila 100 kat daha dirençlidir. Dezenfektanlara dirençli biyofilm üreten suş kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (5)

Biyofilmin bu direnç paterninde aktif eflüks, ilacı modifiye eden enzim sentezi ve hedef bölge değişikliği gibi klasik direnç mekanizmaları primer olarak rol almaz. Biyofilimde antimikrobiyal ve antibiyosidal ajanlara karşı dirençte şu mekanizmalar tanımlanmıştır (5, 6, 100, 101):

**2.7.1. Biyofilm içerisindeki hücelere penetre olamama:** Kalın ve hidrate matriks yapısının bariyer görevi üstlenmesiyle antimikrobiyal ajanlar ve dezenfektanlar bu matriks yapısının altındaki bakterilere nüfuz edemez. Ayrıca antimikrobiyal ajanlar biyofilm yapısının sahip olduğu elektriksel yük sayesinde adsorbe edilerek hücelere ulaşmadan ekstraselüler matriks polimerlerince bağlanmış olur. Matriks yapısı antimikrobiyal ajanların difüzyonuna karşı kesin geçilmez bir engel oluşturamaz; ancak penetrasyonu geciktiren bir başlangıç bariyeri görevini üstlenir. Biyofilm kalınlığı ile antimikrobiyal direnci arasında pozitif yönlü bir korelasyon vardır.

**2.7.2. Büyümenin duraksaması ve stres cevabı:** Biyofilmin mevcudiyetini devam ettirmesi için gerekli olan besin maddelerinin eksikliği biyofilm büyüme hızını yavaşlatır. Logaritmik büyümeden yavaş büyümeye geçiş veya büyümenin durağan faza geçmesi antibiyotik direncini de beraberinde getirir. Özellikle olgun biyofilmler düşük büyüme hızına ve dolayısıyla antimikrobiyal direncine sahiptir. Düşük üreme hızıyla antibakteriyel etkinlik arasında pozitif yönlü bir korelasyon vardır.

**2.7.3. Heterojenite:** Biyofilmin farklı kısımlarında bulunan bakteriler farklı mikroçevre koşullarına maruz kalırlar. Katmanın dış kısımlarında bulunan bakteriler derindeki hücelere oranla besin ve oksijenden daha zengin bir mikroçevreye sahiptir. Bunun sonucu olarak biyofilm yapısı farklı büyüme hızlarına sahip bir bakteri popülasyonu ve dolayısıyla da bir heterojeniteye sebep olur. Bu heterojenite de farklı antimikrobiyal duyarlılık paternlerine neden olur. Özellikle biyofilmin yüzey katmanlarından aşağı doğru inildikçe oksijen yoğunluğu azalır ve aminoglikozid gibi bazı antibiyotik gruplarının etkinliği de oksijen miktarıyla korele olarak azalır.

**2.7.4. Persiste hücrelerin oluşması:** Biyofilmi oluşturan bakterilerin büyük bir kısmı uzun süreli antibiyoterapiyle eradike edilir; ancak özellikle apoptoz yeteneği olmadığı düşünülen hücrelerden oluşan küçük bir bakteri popülasyonu

canlılığını koruyarak persiste olur, yani elimine edilemez. Persiste olan bu hücrelerin biyofilmlerin canlılıklarını sürdürmesinde ve dirençli biyofilmlerin oluşmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Görüldüğü gibi biyofilm yapısının antimikrobiyal direncinde klasik direnç fenotiplerinin aksine farklı multifaktöriyel direnç mekanizmaları etkilidir. Ayrıca biyofilm ortamı yapısı itibariyle bakterilerin kendi aralarında plazmid aktarımı ve ekstrakromozomal DNA değişimi sonucu antibiyotik direncinde artmaya sebep olan mikroortamlardır.

## **2.8. Biyofilm Yapısının Klinik Önemi**

Fosil kayıtları prokaryotların 3 milyar yıldan fazladır biyofilmler içerisinde yaşadığını göstermiştir. Günümüzde biyofilm yapısının yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere canlılarda birçok kronik enfeksiyona sebebiyet vermesinin yanında derin yer altı suları, okyanus derinlikleri gibi aşırı oligotrofik ortamlar dışında tüm doğal ekosistemde de oluşabildiği kabul edilmektedir (69, 73, 82).

Biyofilm yapısı bu yapının aletler üzerinde meydana getirdiği hasarlar, buna bağlı enerji kayıpları ve ürün kontaminasyonları nedeniyle endüstriyel sistemlerde; neden oldukları enfeksiyonlar sebebiyle de tıp alanında önemli bir sorun haline almıştır. Enfekte olmuş cihazların çıkarılması hem hasta morbiditesini hem de tedavi maliyetini büyük ölçüde artırır. Örneğin sadece 2000 yılında tıkanmış ve enfekte olmuş üriner cihazların tedavi maliyeti yalnızca Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da bir milyar dolardan fazla zarara sebebiyet vermiştir (102). Yapılan çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inin biyofilm kaynaklı olduğunu ve bu durumun tedavi maliyetinde büyük oranda artışa neden olduğunu göstermiştir. Biyofilm yapısının tedavi maliyetini artırıcı etkisi yalnızca oluşturduğu kronik enfeksiyonlar sebebiyle değil, aynı zamanda kalıcı tıbbi cihazlarda mekanik fonksiyon kaybına neden olmasından da kaynaklanmaktadır (5).

Biyofilm insan vücudunda kullanılan üriner ve santral venöz kateter (SVK), ortopedik protez, kontakt lens, protez kalp kapakçığı, koroner stent, rahim içi araç, endotrakeal tüp ve koklear implant gibi tıbbi malzemeler ile böbrek ve safra taşı, dişler, akciğer dokusu ve safra yolları gibi canlı yüzeylerde de oluşabilir (78).

Özellikle tıbbi girişimlerin ve kalıcı protezlerin artması biyofilm enfeksiyonlarının sıklığında bir artışa neden olmuştur (5).

Tablo 2.5'te farklı biyomedikal cihazlardaki biyofilm kaynaklı enfeksiyonların insidansı ve bu bölgelerdeki enfeksiyonların en sık etkeni olan mikroorganizmalar görülmektedir (75).

**Tablo 2.5. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların farklı biyomedikal cihazlardaki insidansı ve bu bölgelerde biyofilm kaynaklı enfeksiyonların en sık etkenleri**

Vücut Bölgesi	Biyomedikal Cihaz	İnsidans (%)	Mikroorganizma
Üriner Sistem	Kateter	10-20	<i>Escherichia coli</i>
Perkütan	SVK	4-12	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	Geçici pacemaker	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	Periton diyalizi	3-5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Ortopedik çiviler	50	<i>Staphylococcus aureus</i>
Subkütan	Kardiyak pacemaker	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Yumuşak Doku	Meme protezi	1-7	<i>Staphylococcus aureus</i>
	İntraoküler lens	0,13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Dolaşım Sistemi	Prostetik kalp kapağı	1,88	<i>Staphylococcus aureus</i> viridans streptokoklar
	Vasküler greft	1,5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Kemikler	Prostetik kalça	2,6-4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	Total diz protezi	3,5-4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların azaltılması amacıyla bazı antimikrobiyal ajanlar ve biyofilm oluşumunu inhibe eden kimyasallar ile kaplanmış tıbbi malzemeler denenmektedir. Bu çalışmaların bir kısmında kaplanmış malzemelerin bakteri tutunmasını engelleyerek biyofilm ilişkili enfeksiyonları azalttığı gösterilmiştir (103); ancak yapılan birçok çalışma piyasadaki antibiyotik, gümüş, karbon, platin gibi malzemelerle kaplı kateterlerin bakteri kolonizasyonu ve bakteriyemi miktarında anlamlı bir azalma oluşturmadığını, sistemik enfeksiyon

oranlarında standart kateterlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (104, 105).

Günümüzde biyofilm ilişkili enfeksiyonların önüne geçmek amacıyla kullanılacak etkili ve biyolojik yönden uyumlu biyoteknoloji ürünleriyle ilgili araştırmalar devam etmektedir (106).

## **2.9. Biyofilm Oluşturmanın Bakteriye Kazandırdığı Avantajlar ve Konak İmmün Sisteminin Yanıtı**

Biyofilm oluşturan bakteriler *invivo* ve *invitro* ortamlarda biyofilm oluşturmayan bakterilere göre bir takım avantajlara sahiptir. Biyofilm içerisinde gömülü bakteriler fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkilerden korunmakta, reepitelizasyonu bozmakta ve böylece kronik bir enfeksiyon odağı haline gelmektedir (7, 82). Özellikle enfeksiyon kliniği olan hastalarda kültürün negatif bulunması, direk mikroskopide bakteri görülmesi; ancak kültürde üreme olmaması, üremenin çok az miktarda olması, üreyen mikroorganizmalarda yüksek antibiyotik direnci görülmesi gibi durumlarda biyofilm enfeksiyonları akla gelmelidir.

Biyofilm oluşumu bakterilerin konak immün mekanizmalarına karşı dirençli olmasını sağlar; çünkü bakterilerin kalın matriks yapısıyla kaplı biyofilmlerde toplanması hem onları fagosite edilemeyecek kadar büyütür, hem de humoral immün sistem komponentlerinin bakterilere erişilebilirliğini azaltır. Matriks yapısı sayesinde antimikrobiallerin ve antiseptik maddelerin de bakterilere ulaşımı kısıtlanır; yüzeydeki bakteriler bu ajanlardan etkilenirken derindeki kronik bir enfeksiyon odağı olarak persiste olur (3, 73). Ayrıca biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar durağan büyüme fazında olduğu ve yavaş ürettiği için antibiyotik etkisine daha az maruz kalırlar (100).

Biyofilmler birtakım potansiyel immünmodülatör özelliklere sahiptir. T ve B lenfositleri gibi mononükleer hücrelerin oluşumunu inhibe ederek hem sitotoksik hem de humoral immün sistem üzerinde baskılayıcı etkilere sahiptir (74).

Konak immün sistem hücreleri biyofilme penetre olsa dahi bakterileri fagosite etmekte yetersiz kalır. Aynı suşun planktonik formları konak polimorfonükleer lökositlerini (PMNL) uyararak yıkımın başlatılmasına sebep olurken biyofilm oluşturan formlar fagositik etkiden korunur. Yüksek çözünürlüklü videolarla yapılan çalışmalar stafilokok biyofilmlerinde PMNL'lerin immobilize olduğunu;

ancak fagositozun yalnızca yakın çevredeki bakterilerle sınırlı olduğunu göstermiştir (107).

Bu fiziksel bariyer etkisine ek olarak biyofilm yapısındaki PIA fagositik hücrelerden lizozimlerin erken salınımını da inhibe eder. PIA ayrıca bakterilerin antikolar tarafından tanınmasını ve kompleman birikimini inhibe ederek hücreleri immünglobülin atağından korur. Kompleman sistemi sesil hücelere karşı daha az aktive olur (74).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin yakın konumu hücre-hücre etkileşimlerini de büyük oranda artırır. Biyofilm yapısının kapalı ortamı sayesinde bakteriler arasında kolaylıkla gen transferi gerçekleşebilir. Bu horizontal gen aktarımı çoklu ilaca dirençli bakterilerin oluşmasına sebep olur (108).

## **2.10. Hücrelerarası İletişim (*Quorum Sensing*)**

Katı bir yüzeye tutunmuş mikroorganizmaların oluşturduğu her yapı biyofilm demek değildir. Biyofilm yapısında olmayan mikroorganizmaların oluşturduğu bu topluluklar planktonik hücreler gibi davranmaya devam ederler; yani biyofilm yapısının karakteristik geri dönüşümsüz bağlanma ve direnç gibi özelliklerini taşımazlar. Bu mikroorganizmalar ekstraselüler polimerik bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunmazlar ve biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin ürettiği genlerin transkripsiyonunu yapamazlar. Bu biyofilm olmayan topluluklar, örneğin agar yüzeyinde üreyen bakteri kolonileri yüzeye batırılmış planktonik formlar gibi davranırlar ve gerçek biyofilmlerin doğal direnç özelliklerinden hiçbirini sergilemezler (6).

Biyofilm yapısını oluşturan bakterilerin ise zamanla ekstraselüler matriksten koparak ayrılmasıyla oluşan planktonik formlarının ayrıldıkları topluluğun tüm direnç özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir (6).

Doğrudan mikroskopik gözlem ve çeşitli incelemeler ile farklı yüzeylerde oluşmuş bu bakterilerin % 99,9'dan fazlasının biyofilm yapısı içerisinde ürettiği gösterilmiştir. Biyofilmlerin bu üstünlüğü tüm doğal ekosisteme yayılmış haldedir (98).

Biyofilm yapısının rasgele bir araya gelmiş bakteri topluluklarından ayrılmasını sağlayan temel mekanizma *quorum sensing* yani sinyal molekülleri vasıtasıyla hücrelerarası iletişim sistemidir. Bu mekanizmayla mikroorganizmalar yüzeye yapışan her bir bakterinin ürettiği sinyal molekülleri sayesinde çevredeki



bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu algılayabilir ve bu bilgiyi diğer mikroorganizmalara iletebilir. Çevresinde yoğun mikroorganizma topluluğu olan bir bakteri o topluluğa katılma eğilimi gösterir. Türler arası veya tür içi iletişimi sağlayan bu kompleks regülatuar sistem sayesinde mikroorganizmalar değişen çevre koşullarına uyum göstermelerini sağlayan virülans genlerini eksprese eder ve biyofilm yapısının çevre adaptasyonu ve patojenitesini düzenler. *Quorum sensing* sayesinde üreme hızı ve koloni oluşumu kontrol edilir, toksin üretimi ve invaziv özellikler belirlenir. (109, 110).

*S. aureus*'ta haberleşmeyi sağlayan temel mekanizma kendiliğinden sinyal üretebilen ve üretildiği hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etkinliği olan *auto-inducer* (AI) olarak adlandırılan peptid yapıda moleküllerdir. Gram negatif bakterilerde ise Açıl-homoserin lactonlar (AHL) *quorum sensing* sisteminde daha ön plandadır. Biyofilmi oluşturan mikroorganizma sayısı arttıkça üretilen AI sinyal moleküllerinin lokal konsantrasyonu da artar. Konsantrasyon belli bir eşik değeri aştığı zaman virülans faktörleri de dahil olmak üzere birtakım genlerin ekspresyonu düzenlenir (109). Böylece bakteri virülans faktörlerini düzenleyerek değişen koşullara uyum sağlar ve enfeksiyonun seyri sırasında konak immün yanıtından korunabilir (111).

AI sinyal molekülleri hücre zarındaki reseptör kinazlara bağlanır ve hücre içinde gen ekspresyonunu düzenleyici birtakım transkripsiyonel değişikliklere neden olur veya kendisi oligopeptid permeazlarla direk hücre içine girerek hücre içi reseptörlerle etkileşime geçer. Gram pozitif bakterilerde farklı aminoasit sekansına sahip AI sinyal molekülü içeren çok sayıda *quorum sensing* sistemi tanımlanmıştır ve bu sistemlerin reseptörleri genellikle hücre zarında bulunmaktadır (110, 112).

Sonuç olarak; sinyal molekülleri spesifik fizyolojik şartlar veya çevresel değişikliklere karşı ortaya çıkan, hücre dışına salgılanan ve diğer hücrelerdeki spesifik reseptörlerine bağlanarak etki eden ve belli bir eşik konsantrasyon değerinin üzerinde istenilen fizyolojik yanıtın ortaya çıkmasını sağlayan bakteriler arası özelleşmiş bir haberleşme sistemi, bir yoğunluğu algılama mekanizmasıdır (7, 111).

## 2.11. Biyofilm Tespit Yöntemleri

Biyofilm tespit yöntemleri ideal olarak kolay uygulanabilir, tekrar edilebilir ve *in vivo* biyofilm fenotipini temsil edebilir nitelikte olmalıdır. Aynı bakterinin farklı sistem veya çalışma yöntemlerinde biyofilm oluşumu başlangıç bakteri ve besin konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, biyofilme uygulanan sıvı basıncı gibi etmenlerle değişkenlik gösterebilir. Bu sebeple farklı biyofilm tespit yöntemleri birbirini tamamlar (74). Biyofilm oluşumunu gösteren birçok yöntem vardır (18, 19, 70, 99):

**2.11.1. Boyama yöntemleri:** Mikrotitrasyona dayalı bu statik yöntemler biyofilm araştırmalarının ilk zamanlarından beri özellikle uygulama kolaylığı, kullanılan malzemelerin ulaşılabilir olması ve düşük maliyetli testler olmalarından dolayı günümüzde halen yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyofilm tabakasının komponentleri aşağıdaki kimyasallar ile boyanarak biyofilm varlığı tespit edilebilir;

- Kristal viyole
- Safranin
- 1,9-dimetil metilen blue (DMMB)
- Alcian Blue
- Syto9
- Fluorescein-di-acetate (FDA)

Bu yöntemlerle kesin bakteri sayısı veya canlılığı bilinemez; ancak biyofilm kitlesi hakkında bilgi sahibi olunur. Ayrıca biyofilm kitle kantitasyonu için boyama yöntemlerine ek olarak sonikasyon işlemi sonrası koloni oluşturan birim hücre sayımı, total protein miktarı ve kuru ağırlık ölçüm yöntemleri kullanılabilir.

Mikroplaklarda oluşan bu biyofilmlerin minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonunun ölçümü için Calgary Biyofilm Cihazı geliştirilmiştir ve duyarlılık için nispeten kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (98).

**2.11.2. Metabolik yöntemler:** Metabolik yöntemlerle canlı hücrelere zarar vermeyen ve bu hücreler tarafından metabolit olarak kullanılan biyolojik boyalar kullanıldığından direk biyofilmdeki canlı hücre sayısı hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Aşağıdaki çeşitli yöntem ve kimyasallar ile biyofilm yapısını oluşturan canlı bakterilerin sayı ve yoğunluğunun tespit edilebilmesi mümkündür;

- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
- XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]
- CTC [5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride]
- Rezasurin (alamar blue)
- BioTimer yöntemi
- Lösin İnkorporasyon
- ATP biyoluminesans

### 2.11.3. Mikroskopik yöntemler:

- Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi (CLSLM) (Syto9 floresan boyasıyla)
- Tarayıcı Elektron Mikroskopi (SEM)
- Konfokal Raman Mikroskopi (CRM)
- Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)
- X-ray Mikroskopi
- Epiflorasans Mikroskopi ile hem biyofilm yapısını araştırmak hem de bilgisayar programları ile koordine kullanılarak biyofilm kantitasyonunu yapmak mümkündür.

**2.11.4. Moleküler yöntemler:** PZR ile biyofilm oluşumundan sorumlu *icaADBC* operon üyeleri ve MSCRAMM'lar tespit edilebilir. Ayrıca ‘‘Floresans in situ hibridizasyon’’ (FISH) yöntemiyle biyofilmi oluşturan canlı hücreler floresan boyayla boyanarak görünür hale getirilebilir.

**2.11.5. *Slime* oluşumunun tespiti:** Stafilokokların yüzeylere kolay yapışması ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkeni olması bu bakterilerin hücre dışına salgıladıkları *slime* faktör üretimi ile yakından ilişkilidir. *Slime* faktörü ekzopolisakkarit, teikoik asit ve proteinlerden oluşan visköz bir glikokaliks yapısıdır. *Slime* faktör sayesinde bakterilerin adherans ve yüzey kolonizasyonu kolaylaşır (4). Christensen'in biyofilm kavramının tam olarak oturmasından önce ortaya attığı ve *slime* faktör oluşumunu gösteren testi günümüzde birtakım değişikliklerle Modifiye Christensen Yöntemi olarak biyofilm boyama yöntemleri içerisinde sayılmaktadır (113). Congo Red Agar Yöntemi (CRA) ile oluşan koloni renk ve morfolojisine göre bakterideki *slime* oluşumu gösterilebilir. CRA ilk olarak

stafilokoklardaki *slime* oluşumunu gösteren, uygulaması kolay, hızlı, tekrarlanabilir ve nitel bir fenotipik yöntem olarak geliştirilmiştir (85, 114).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 11.08.2016 tarihinde KA 16/264 proje numarasıyla onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

#### 3.1. Bakteri izolatları

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 107 adet yara, 72 adet kan ve 21 adet kateter örneğinden izole edilmiş toplam 200 *S. aureus* suşu (100 adet MRSA, 100 adet MSSA) çalışmaya dahil edildi. Hastaların cinsiyet, yaş, yattığı servis gibi demografik bilgileri kayıt edildi. Suşlar çalışılincaya kadar “*Skim Milk*” saklama besiyeri içeren mikrosantrifüj tüplerinde -80°C’de saklandı.

İzolatların saf koloni olup olmadıklarının kontrolü amacıyla Gram boyası yapıldı ve sırasıyla katalaz ve koagülaz aktivitelerine bakıldı. Lamda koagülaz testi şüpheli sonuç veren suşlara ayrıca tüpte koagülaz testi uygulandı.

**3.1.1. Katalaz Testi:** Gram pozitif kok olarak boyanan tüm suşlara katalaz testi uygulandı (22, 115).

**3.1.1.1. Temel Prensi:** Katalaz enzimi üreten bakteriler metabolizmalarının son ürünü olarak ortaya çıkan hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene parçalar. Oluşan oksijen lam üzerinde köpük veya gaz kabarcıkları şeklinde gözlenir.

##### 3.1.1.2. Gerekli Malzemeler:

- %3'lük  $H_2O_2$  (Merck, Almanya)
- Cam lam (Citotest Labware, Çin)
- Steril plastik öze (Loopplast, LP Italiana SPA, İtalya)

**3.1.1.3. Testin Uygulanışı:** Temiz bir lam üzerine birkaç damla  $H_2O_2$  damlatıldı. Taze kültürden steril plastik öze ile alınan koloniler hidrojen peroksitle karıştırıldı. Eritrositlerde var olan katalaz aktivitesi nedeniyle yanlış pozitif sonuç almamak için bu testte kanlı agar besiyeri kullanılmadı.

**3.1.1.4. Sonuçların Yorumlanması:** Saniyeler içerisinde oluşan hava kabarcığı varlığı gözlemlendi.

**3.1.1.5. Kalite Kontrol:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 - pozitif kontrol  
*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 - negatif kontrol

**3.1.2. Koagülaz Testi:** Katalaz testi pozitif olan tüm suşlara koagülaz testi uygulandı (22, 116).

**3.1.2.1. Lamda Koagülaz Testi:**

**3.1.2.1.1. Temel Prensi:** Stafilokoklar içerisinde *S. aureus* koagülaz reaksiyonunun pozitif olmasıyla diğer türlerden ayrılır. Koagülaz fibrinojenin fibrin pıhtısına dönüşmesini sağlayan, trombine benzeyen, termostabil bir enzimdir. Oluşan fibrin yapısı kümeleşme olarak gözlenir.

**3.1.2.1.2. Gerekli Malzemeler:**

- EDTA'lı tavşan plazması (BD, ABD)
- Cam lam (Citotest Labware, Çin)
- Steril öze
- Distile su

**3.1.2.1.3. Testin Uygulanışı:** Temiz bir lam üzerine 1 damla distile su damlatıldı ve şüpheli kolonilerle homojenize edildi. Bakteri süspansiyonunun üzerine bir damla 1/5 oranında sulandırılmış EDTA'lı tavşan plazması damlatıldı ve 10-30 saniye elde çevirme hareketi uygulandı. Mannitol tuz agar gibi yüksek tuz oranına sahip olan besiyerindeki koloniler otoaglutinasyon sonucu yanlış pozitif sonuç verebilir; bu nedenle koagülaz testi için koloniler kanlı agar gibi nonselektif bir besiyerinden alındı.

**3.1.2.1.4. Sonuçların Yorumlanması:** İşlemin sonunda bakteriyel kümeleşme oluşturduğu görülen suşlar lamda koagülaz testi pozitif olarak kabul edildi.

**3.1.2.1.4. Kalite Kontrol:** *S. aureus* ATCC 25923 - pozitif kontrol

*S. epidermidis* ATCC 12228 - negatif kontrol

**3.1.2.2. Tüpte Koagülaz Testi:** Lamda koagülaz testi negatif veya şüpheli bulunan her bakteride serbest koagülaz varlığının araştırılması için tüpte koagülaz testi yapılmalıdır. Bazı stafilokok suşlarının özellikle de MRSA suşlarının kapsül yapısının hücre duvarındaki protein A'yı maskelediği ve bu yolla aglutinasyonun engellendiği belirlenmiştir. Bu nedenle özellikle MRSA şüpheli kolonilerde tüpte koagülaz testinin kullanılması önerilmektedir.

**3.1.2.2.1. Temel Prensi:** *S. aureus* identifikasyonu için referans yöntem olarak kabul edilen tüpte koagülaz testi lamda koagülaz testi ile aynı çalışma prensibine sahiptir.

#### 3.1.2.2.2. Gerekli Malzemeler:

- EDTA'lı tavşan plazması (BD, ABD)
- Düz kapaksız cam tüp (S&H Labware, Türkiye)
- Steril öze
- Distile su

**3.1.2.2.3. Testin Uygulanışı:** Steril bir tüp içerisine 1/5 oranında sulandırılmış EDTA'lı tavşan plazmasından 0,5 ml konuldu. Maksimum 24 saatlik taze koloniler özeyle alınıp plazma içerisine inoküle edildi. 35-37°C'de 4 saat inkübasyonun ardından tüpler kontrol edildi. 4 saat sonunda aglütinasyon gözlenmediyse tüpler 22-25°C oda sıcaklığında 20 saat daha bekletildi ve tekrar kontrol edildi.

**3.1.2.2.4. Sonuçların Yorumlanması:** Uygun inkübasyon süresinin sonunda tüp çalkalanmadan hareket ettirilerek pıhtı oluşumuna bakıldı. 24 saat içerisinde oluşan herhangi bir miktardaki aglütinasyon varlığı pozitif olarak kabul edildi.

**3.1.2.2.5. Kalite Kontrol:** *S. aureus* ATCC 25923 - pozitif kontrol

*S. epidermidis* ATCC 12228 - negatif kontrol

**3.1.3. Metisilin Direnci:** Metisilin duyarlılığının tespiti için Phoenix (Becton Dickinson - BD, ABD) otomatize sisteminde oksasilin MİK değeri >2 mg/L olan suşlar MRSA olarak kabul edildi. Phoenix'te oksasiline duyarlı ve dirençli çıkan tüm suşlara ayrıca sefoksitin disk difüzyon (SDD) testi uygulanarak sonuçlar doğrulandı (117).

**3.1.3.1. Temel Prensiptir:** McFarland 0,5 bulanıklık ölçüsündeki *S. aureus* bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar (MHA) üzerine uygun şekilde sürülür. 30 µg sefoksitin içeren antibiyotik duyarlılık diskleri agar üzerine yerleştirilerek bir gecelik inkübasyonun ardından oluşan zon çapları ölçülerek belirlenen standartlara göre duyarlı, orta duyarlı, dirençli şeklinde değerlendirilir.

#### 3.1.3.2. Gerekli Malzemeler:

- %5 Koyun Kanlı Agar (BD, Almanya)
- Phoenix Spec Nephelometer (BD, ABD)
- Steril %0,9 NaCl çözeltisi (Polifarma, Türkiye)
- Mueller Hinton II Agar (MHA) (BD, ABD)
- Steril plastik petri plakları (Fıratmed, Türkiye)
- Sefoksitin antibiyotik duyarlılık diskleri (30 µg) (BD, ABD)

- Otoklav (HMC - Hirayama, Japonya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Steril eküvyon çubuğu (Tru Medikal, Türkiye)
- Düz kapaksız cam tüp (S&H Labware, Türkiye)

**3.1.3.3. Testin Uygulanışı:** SDD testi için 1 L distile su içerisine 38 g Mueller Hinton II Agar tartıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Soğuduktan sonra petri plaklarına döküldü. Derin dondurucuda -20°C'de saklanan sefoksitin diskleri kullanmadan 10-15 dakika önce oda sıcaklığına çıkarıldı. %5 koyun kanlı agarda üremiş 24 saatlik saf kolonilerinden alınarak %0,9 NaCl (SF) içerisinde bir süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon yoğunluğu Phoenix Spec Nephelometer ile üretici firmanın hazırladığı hazır eşelerle kalite kontrolü yapıldıktan sonra spektrofotometrik olarak 0,5 McFarland bulanıklık derecesine ayarlandı ve hazırlanan süspansiyon MHA besiyeri yüzeyine steril bir eküvyonla yayıldı. Besiyeri plağına steril bir pens yardımıyla sefoksitin diskleri yerleştirildi ve üzerlerine hafifçe bastırılarak besiyeri yüzeyiyle tamamen temas etmesi sağlandı. Hazırlanan plaklar 35–37°C'de 18–24 saat süre ile inkübe edildi(51).

**3.1.3.4. Sonuçların Yorumlanması:** İnkübasyon süresinin sonunda test sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından önerilen eşik sınır değerlere göre zon çapı <22 mm olan suşlar MRSA, ≥22 mm olan suşlar ise MSSA olarak tanımlandı (51).

**3.1.3.5. Kalite Kontrol:** *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) - pozitif kontrol  
*S. aureus* ATCC 25923 - negatif kontrol

## **3.2. Biyofilm Deneyleri**

### **3.2.1. Konvansiyonel Biyofilm Tespit Yöntemleri**

#### **3.2.1.1. Modifiye Christensen Yöntemi**

**3.2.1.1.1. Temel Prensi:** Bu yöntemde biyofilm tabakayı oluşturan bakteri ve ekstrasellüler matriksin negatif yüklü molekülleri bazik bir boya olan kristal viyole ile boyanarak spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Bu yöntemde canlı ve ölü hücrelerin yanı sıra biyofilm yapısını oluşturan diğer komponentler de boyanmaktadır. Christensen ve arkadaşlarının tanımladığı ilk yöntemde yalnızca kuyucuk tabanında oluşan biyofilm tabakası ölçülmekteydi (113). Modifiye

Christensen Yöntemi'nde ise kullanılan boya çözülerek kuyucuğun hem tabanı hem de duvarında oluşan biyofilm ölçülmüş olur (118).

#### **3.2.1.1.2. Gerekli Malzemeler:**

- %5 Koyun Kanlı Agar (BD, Almanya)
- Triptik Soy Broth (BD, Fransa)
- Düz kapaksız cam tüp (S&H Labware, Türkiye)
- Otoklav (HMC - Hirayama, Japonya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Distile su
- Phoenix Spec Nephelometer (BD, ABD)
- 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalak (Biosigma, İtalya)
- PBS tablet pH 7,2 (AppliChem, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Etanol (Merck, Almanya)
- ELx Universal Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., ABD)
- Steril eküvyon çubuğu (Tru Medikal, Türkiye)
- Çok kanallı pipet (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- pH metre (Inolab pH 7110 - WTW, Almanya)

**3.2.1.1.3. Testin Uygulanışı:** 1 L distile suya 30g liyofilize Triptik Soy Broth eklendi ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra pH 7,2 değerine ayarlanarak taze olarak kullanıldı.

%5 koyun kanlı agarda üremiş olan *S. aureus* kolonilerinden tek bir koloni alınarak Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyerinde 24 saat 35 - 37°C'de inkübe edildikten sonra 0,5 McFarland bulanıklık derecesinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalaklarda kuyucuklara 20 µl bakteri süspansiyonu, 180 µl deney ortamı (TSB) konuldu ve böylece yaklaşık  $1 \times 10^7$  CFU/ml bakteri konsantrasyonuna ulaşıldı. Her bir bakteri için üçer kuyucuk kullanıldı. Hazırlanan mikropalaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklar boşaltılıp uygun mikropipet kullanılarak steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH: 7,2) ile 3 kez yıkandı. Her yıkamanın sonunda kuyucuklarda kalan PBS



nazikçe vurularak boşaltıldı. Plaklar kurutulduktan sonra fiksasyon için her bir kuyucuk 200µl metanol ile 20 dakika muamele edildi. 15 dakika %2'lik kristal viyole ile boyama işleminden sonra plaklar tekrar yıkandı. %95'lik etanol ile kuyucuğun taban ve duvarlarındaki boya çözüldü ve mikroplakların optik dansiteleri 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (119, 120).

**3.2.1.1.4. Sonuçların Yorumlanması:** negatif kontrol kuyucuklarından (steril TSB buyyon) elde edilen ortalama değerlerin (OD) üzerine 3 standart değer (SD) eklenmesiyle sınır değer (cut-off/ODc) belirlendi ve buna göre her bir bakteri için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalaması sınır değer üzerinde olan suşlar biyofilm pozitif olarak kabul edildi. OD değeri sınır değeriyle bunun 2 katı arasında olanlar hafif (+), 2-4 katı arasında olanlar orta (++), 4 katı üzerinde olanlar ise kuvvetli biyofilm pozitif (+++) olarak sınıflandırıldı. Sınır değer hesaplama ve biyofilm yoğunluk kategorileri Tablo 3.1'de gösterilmiştir (118).

**Tablo 3.1. Sınır değer (ODc) ve biyofilm yoğunluk kategorileri**

ODc= OD (negatif kontrol) + 3×SD (negatif kontrol)	
OD ≤ ODc	→ biyofilm negatif
ODc ≤ OD ≤ 2×ODc	→ hafif düzeyde biyofilm pozitif (+)
2×ODc ≤ OD ≤ 4×ODc	→ orta düzeyde biyofilm pozitif (++)
4×ODc ≤ OD	→ kuvvetli düzeyde biyofilm pozitif (+++)

#### **3.2.1.1.5. Kalite Kontrol:**

*S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* ATCC 35984 - pozitif kontrol

*S. aureus* ATCC 29213 ve *S. epidermidis* ATCC 12228- negatif kontrol

#### **3.2.1.2. MTT Yöntemi**

**3.2.1.2.1. Temel Prensip:** Bir tetrazolium tuzu olan MTT'nin [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] NADH bağımlı dehidrogenaz enzimleriyle suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenme düzeyinin kantitatif olarak ölçüldüğü kolorimetrik bir yöntemdir. Bu renk değişimi

metabolik aktivitenin, dolayısıyla biyofilmdeki canlı bakteri hücre varlığının bir göstergesidir (121).

#### **3.2.1.2.2. Gerekli Malzemeler:**

- %5 Koyun Kanlı Agar (BD, Almanya)
- Triptik Soy Broth (TSB) (BD, Fransa)
- Düz kapaksız cam tüp (S&H Labware, Türkiye)
- Otoklav (HMC - Hirayama, Japonya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Distile su
- Phoenix Spec Nephelometer (BD, ABD)
- 96 kuyucuklu iğne kapaklı U tabanlı mikroplak (Nunc-TSP: Transferable Solid Phase Screening System) (Thermo Scientific, Danimarka)
- Orbital çalkalayıcı (RotoMix Orbital Shaker Type 50800, Barnstead International, ABD)
- PBS tablet pH 7,2 (AppliChem, Almanya)
- DMSO (Sigma, Fransa)
- ELx Universal Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., ABD)
- Steril eküvyon çubuğu (Tru Medikal, Türkiye)
- Çok kanallı pipet (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- pH metre (Inolab pH 7110 - WTW, Almanya)

**3.2.1.2.3. Testin Uygulanışı:** 1 L distile suya 30g liyofilize Triptik Soy Broth eklendi ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra pH 7,2 değerine ayarlanarak taze olarak kullanıldı.

%5 koyun kanlı agarda üremiş olan *S. aureus* kolonilerinden tek bir koloni alınarak TSB besiyerinde 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 0,5 McFarland bulanıklık derecesinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Biyofilm oluşturmak için steril iğne kapaklı 96 kuyucuklu U-tabanlı mikroplaklara 20 µl bakteri süspansiyonu, 180 µl deney ortamı (TSB) konuldu ve böylece yaklaşık  $1 \times 10^7$  CFU/ml bakteri konsantrasyonuna ulaşıldı. İğne kapağın tüm yüzeyinde homojen

bir biyofilm oluşumu için iğne kapaklı mikroplaklar 20 salınım/dakika olacak şekilde orbital çalkalayıcıda 35 - 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Her bir bakteri için üçer kuyucuk kullanıldı. İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra iğne kapak 200 µl steril PBS içeren 96 kuyucuklu mikroplakta üç kez çalkalanarak yıkanıp planktonik hücrelerin uzaklaşması sağlandı (122).

Her çalışma öncesi steril PBS içerisine 250 µg/ml konsantrasyonunda MTT solüsyonu taze olarak hazırlandı. Her kuyucuğa 200 µl MTT solüsyonundan eklenerek üzerine iğne kapaklar kapatıldı ve karanlık ortamda 37°C'de 3 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda canlı bakteri varlığında oluşan formazan kristalleri DMSO içerisinde çözüldü ve renk değişimi hem çıplak gözle kayıt edildi hem de sonuçlar 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (121).

**3.2.1.2.4. Sonuçların Yorumlanması:** Negatif kontrol kuyucuklarından (steril TSB buyyon) elde edilen ortalama değerlerin (OD) üzerine 3 standart değer eklenmesiyle sınır değeri belirlendi ve bu değerlere göre her bir bakteri için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalaması sınır değeri üzerinde olan suşlar biyofilm pozitif olarak kabul edildi. OD değeri sınır değeriyle bunun 2 katı arasında olanlar hafif (+), 2-4 katı arasında olanlar orta (++), 4 katı üzerinde olanlar ise kuvvetli biyofilm pozitif (+++) olarak sınıflandırıldı (118).

**3.2.1.2.5. Kalite Kontrol:**

*S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* ATCC 35984 - pozitif kontrol

*S. aureus* ATCC 29213 ve *S. epidermidis* ATCC 12228- negatif kontrol

**3.2.1.3. BioTimer Yöntemi**

**3.2.1.3.1. Temel Prensi:** Biyofilmin yapısındaki canlı bakterilerin sayısını belirlemede kullanılan bir diğer kolorimetrik yöntemdir. Belirteç olarak fenol kırmızısı içeren BT-PR besiyeri kullanılır. Bakterinin fermentatif metabolizması sonucu belirtecin rengi kırmızıdan sarıya dönmektedir. Renk değişimi için geçen süre bakteri konsantrasyonu ile ilişkilidir (123).

**3.2.1.3.2. Gerekli Malzemeler:**

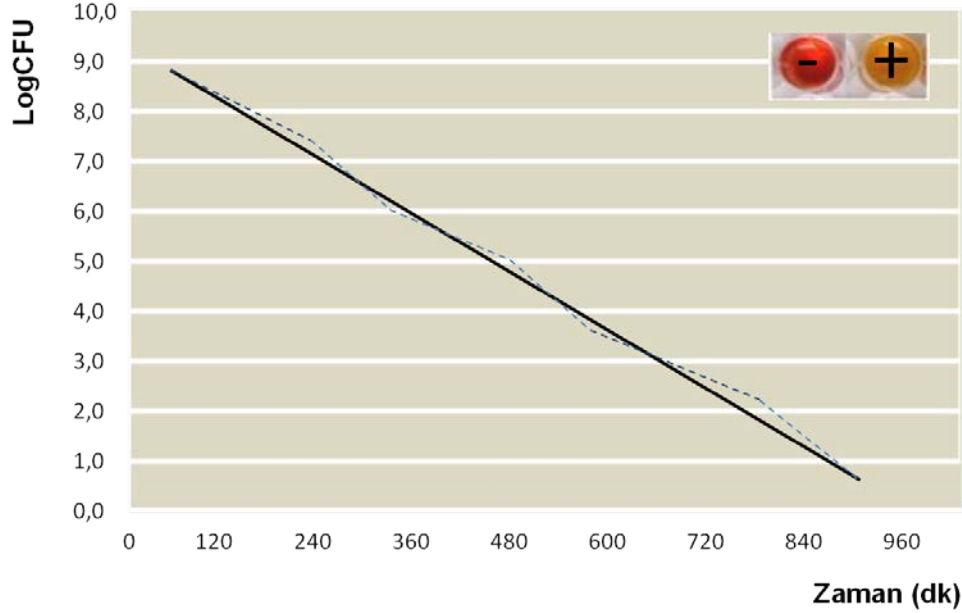
- Mueller Hinton Broth (MHB) (BD, Fransa)
- Phenol Red (Sigma Aldrich, ABD)
- D(+)-glukoz-monohidrat (Merck, Almanya)
- Otoklav (HMC - Hirayama, Japonya)

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Distile su
- Çok kanallı pipet (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplak (Biosigma, İtalya)
- Steril plastik eküvyon çubuğu (Tru Medikal, Türkiye)
- Düz kapaksız cam tüp (S&H Labware, Türkiye)
- Phoenix Spec Nephelometer (BD, ABD)
- Mueller Hinton II Agar (BD, ABD)
- 96 kuyucuklu iğne kapaklı U tabanlı mikroplak (Nunc-TSP: Transferable Solid Phase Screening System) (Thermo Scientific, Danimarka)
- Triptik Soy Broth (TSB) (BD, Fransa)
- Orbital çalkalayıcı (RotoMix Orbital Shaker Type 50800, Barnstead International, ABD)
- PBS tablet pH 7,2 (AppliChem, Almanya)
- pH metre (Inolab pH 7110 - WTW, Almanya)

**3.2.1.3.3. Testin Uygulanışı:** 1 L distile suya 21 g Mueller Hinton Broth (MHB), 25 mg fenol kırmızısı ve 10 g D(+)-glukoz-monohidrat eklenerek hazırlandı ve pH 7,2 değerine ayarlanarak taze olarak kullanıldı.

Öncelikle bakteri sayısı - renk değişim zamanı korelasyon eğrisini çizmek için hazırlanan bakteri süspansiyonu (*S. aureus* ATCC 6538) BT-PR besiyeri içeren tüplere eklenerek seri dilüsyon yapıldı. Tüpler uygun aralıklarla kontrol edilerek her bir tüpün renginin kırmızıdan sarıya döndüğü süre tespit edildi. Bunun için 900 µl BT-PR besiyeri içeren ilk tüpe 100 µl 0,5 McFarland bulanık derecesinde ayarlanmış olan bakteri süspansiyonu eklenerek 1/10 dilüsyona ulaşıldı ve seri dilüsyon ile  $10^{-6}$  konsantrasyona kadar ulaşıldı. Dilüsyon işleminden sonra her kuyucuktan 10 µl alınarak MHA besiyerlerine ekildi ve steril eküvyon ile plak yüzeyine yayıldı. 35 - 37°C'de 24 saat inkübasyon işlemi sonrası katı besiyerlerindeki koloniler sayılarak besiyerinin renk değiştirdiği süreye karşı gelen bakteri  $\log_{10}$ CFU grafiği çizildi. (124).

Şekil 3.1’de BioTimer yöntemi için kullanılan bakteri sayısı - renk değişim zamanı korelasyon eğrisi ve BT-PR besiyerinin renk değişimi gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bakteri sayısı ( $\log_{10}$ CFU) - Zaman (dk) eğrisi ve BT-PR besiyeri renk değişimi

Biyofilm deneyleri MTT yönteminde olduğu gibi U tabanlı 96 kuyucuklu iğne kapaklı mikropklarda gerçekleştirildi. Her izolattan tek koloni alınarak 4 ml TSB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 200 µl  $1 \times 10^7$  CFU/ml bakteri süspansiyonu eklenerek orbital çalkalayıcıda 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Her bir bakteri için üçer kuyucuk kullanıldı. İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra iğne kapak 200 µl steril PBS içeren 96 kuyucuklu mikropakta üç kez çalkalanarak yıkayıp planktonik hücrelerin uzaklaşması sağlandı. 200 µl BT-PR besiyeri dağıtılmış yeni bir mikropkta iğne kapak kapatıldı.

**3.2.1.3.4. Sonuçların Yorumlanması:** Yeni mikropkta iğne kapak kapatıldıktan sonra besiyerindeki dakikalık renk değişimi gözlemlendi. Oluşturduğumuz zaman/ $\log_{10}$ CFU eğrisi kullanılarak, iğne kapakta oluşan biyofilmde bulunan mikroorganizma sayısı hesaplandı (123, 124).

**3.2.1.3.5. Kalite Kontrol:**

*S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* ATCC 35984 - pozitif kontrol

*S. aureus* ATCC 29213 ve *S. epidermidis* ATCC 12228- negatif kontrol

Her üç biyofilm tespit yönteminde de olası kontaminasyonu ekarte etmek amacıyla üreme olan kuyucuklardan 10'ar µl örnek alınıp koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıldı. Biyofilm oluşumunun saf *S. aureus* kaynaklı olduğu teyit edildi.

#### **3.2.1.4. Congo Red Agar (CRA) Yöntemi**

**3.2.1.4.1. Temel Prensi:** Kongo kırmızısı benzidin ve naftionik asitten meydana gelen bir sodyum tuzudur. Polisakkarit, selüloz, amiloid ve sialik asit gibi organik polimerlere afinite gösterir. Kongo kırmızısı bakterilerin ekzopolisakkarit yapısındaki *slime* faktörü ile birleşerek koyu bir renk oluşturur ve böylece bakterilerdeki *slime* oluşumunu gösterir (114).

##### **3.2.1.4.2. Gerekli Malzemeler:**

- Sükroz (Merck, Almanya)
- Brain - Heart Infusion Agar (BD, Fransa)
- Congo Red (AppliChem, Almanya)
- Distile su
- Otoklav (HMC - Hirayama, Japonya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Steril öze

**3.2.1.4.3. Testin Uygulanışı:** 1 litre distile suya 36 g sükroz, 52 g beyin kalp infüzyon agar ve 0.8g Kongo kırmızısı boyası eklenerek CRA hazırlandı.

İzolatların CRA besiyerinde oluşturdukları kolonilerin görünüm farklılıklarına dayanan Congo Red Agar yöntemiyle tüm izolatların *slime* faktör oluşumları araştırıldı. Bu amaçla %5 koyun kanlı agarda üremiş saf kolonilerden CRA besiyerine tek koloni ekim yöntemiyle ekildi ve 35 - 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar not edildikten sonra plaklar 24 saat daha 22 - 25 °C oda sıcaklığında bekletilerek 48 saatin sonunda plaklardaki renk değişimi tekrar incelendi. Her agara en az bir pozitif kontrol, bir de negatif kontrol ekimi yapıldı.

**3.2.1.4.4. Sonuçların Yorumlanması:** Koyu kırmızı - siyah renkli veya pürüzlü - kuru koloni oluşturan suşlar *slime* faktörü pozitif; pembe - kırmızı, bordo veya yalnızca orta kısımları koyu renkte koloni (öküz gözü paterni) oluşturanlar *slime* faktörü negatif olarak değerlendirildi (85, 95).

#### **3.2.1.4.5. Kalite Kontrol:**

*S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* ATCC 35984 - pozitif kontrol

*S. aureus* ATCC 29213 ve *S. epidermidis* ATCC 12228- negatif kontrol

### **3.3. Biyofilm Genlerinin Varlığının Araştırılması**

#### **3.3.1. DNA Ekstraksiyonu**

##### **3.3.1.1. Gerekli Malzemeler:**

- %5 Koyun Kanlı Agar (BD, Almanya)
- 1 µl'lik steril plastik öze (Looplast, LP Italiana SPA, İtalya)
- DNA ekstraksiyon kiti (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel, Almanya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Orbital çalkalayıcı (RotoMix Orbital Shaker Type 50800, Barnstead International, ABD)
- Kuru blok ısıtıcı (Biosan, Bio TDB-100, Letonya)
- Santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen, mikro200R, Almanya)
- Santrifüj tüpü (1,5 ml, DNA-RNA free, flat cap, PCR use) (Isolab, Almanya)
- Pipet (Eppendorf, Almanya)
- Steril filtreli pipet ucu (epT.I.P.S., Eppendorf, Almanya)

##### **3.3.1.2. DNA Ekstraksiyon Yönteminin Uygulanışı**

Her bir suş koyun kanlı agar besiyerinde bir gecelik inkübasyonu takiben bir öze (1 µl'lik) dolusu koloni 200 µl'lik ‘‘proteinaz k’’ içeren lizis solüsyonu içerisine toplandı. Solüsyon 56°C’de orbital çalkalayıcıda bir gece inkübe edildikten sonra sonra ekstraksiyon işlemine gram pozitif bakteriler için uyumlu DNA ekstraksiyon kitiyle üretici firmanın önerileri doğrultusunda devam edildi.

#### **3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

##### **3.3.2.1. Gerekli Malzemeler:**

- 10X Tampon (buffer) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (New England Biolabs, Birleşik Krallık)
- dNTP (New England Biolabs, Birleşik Krallık)

- MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific, Danimarka)
- *icaA*, *icaD*, *icaB* veya *icaC* forward primer (Sentegen, Türkiye)
- *icaA*, *icaD*, *icaB* veya *icaC* reverse primer (Sentegen, Türkiye)
- Taq polimeraz (New England Biolabs, Birleşik Krallık)
- Pipet (Eppendorf, Almanya)
- Steril filtreli pipet ucu (epT.I.P.S., Eppendorf, Almanya)
- Reaksiyon tüpü (0,2 ml, DNA-RNA free, flat cap, PCR use) (Isolab, Almanya)
- PZR Kabini (EN 12469, Bilser, Türkiye)
- Thermal Cycler Cihazı (Multigene Optimax, Labnet International, Inc., ABD)
- Deiyonize distile su (ddH<sub>2</sub>O)

**3.3.2.2.Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:** Kullanılan reaksiyon karışımı total hacim 50 µl × N olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı:

- ddH<sub>2</sub>O × N
- 10X Tampon (buffer) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> × N
- 200 µM dNTP × N
- 3 mM MgCl<sub>2</sub> × N
- 20 pmol *icaA*, *icaD*, *icaB* veya *icaC* forward primer × N
- 50 pmol *icaA*, *icaD*, *icaB* veya *icaC* reverse primer × N
- 1.5 U Taq polimeraz × N
- 5 µL DNA × N

### 3.3.2.3. PZR Programı:

Başlangıç denatürasyonu --- 94°C'de 3 dakika

Denatürasyon aşaması --- 94 °C'de 45 saniye 30 döngü

Primer yapışması (annealing) --- \*\* °C'de 45 saniye 30 döngü

Sentez (uzama) aşaması --- 72 °C'de 1 dakika 30 döngü

Son uzama --- 72 °C'de 7 dakika

\*\* *icaA*: 53°C, *icaB*: 55°C, *icaC*: 46°C, *icaD*: 47°C



### 3.3.3. Biyofilm Gen Bölgelerinin Agaroz Jel Elektroforezde Gösterilmesi

#### 3.3.3.1. Gerekli Malzemeler:

- EDTA disodium salt molecular biology grade (AppliChem, Almanya)
- Tris molecular biology grade (AppliChem, Almanya)
- Borik asit molecular biology grade (AppliChem, Almanya)
- Agarose D-1 Low Eeo (Conda, İspanya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Ethidium bromide (AppliChem, Almanya)
- Blue Loading Dye (SNP Biyoteknoloji, Türkiye)
- Elektroforez tankı ve jel tarağı (Owl EasyCast B2, Thermo Scientific, Danimarka)
- Elektroforez güç kaynağı (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
- UV transillüminatör (Apollo Instruments, ABD)
- Steril filtreli pipet ucu (epT.I.P.S., Eppendorf, Almanya)
- Pipet (Eppendorf, Almanya)
- 100 bp DNA ladder (Bioron, Almanya)
- Deiyonize distile su (ddH<sub>2</sub>O)
- pH metre (Inolab pH 7110 - WTW, Almanya)

#### 3.3.3.2. 5x TBE Solüsyonunun Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Kuyucuklara Yüklenmesi

4,68 g EDTA, 54 g Tris ve 27,5 g Borik asit 1 L deiyonize distile su içerisinde çözülerek pH 8,3 olacak şekilde ayarlandı. TBE 0,5x solüsyonu TBE 5x solüsyonunun 1/10 oranında deiyonize distile su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

%1'lik agaroz jel için 0,9 g agaroz 90 ml 0,5x TBE içerisinde mikrodalga fırında kaynatılarak bir miktar soğuduktan sonra üzerine 3µl etidyum bromid eklenerek uygun tarak yerleştirilmiş jel küvetine döküldü. Jel donduktan sonra elektroforez tankı 0.5x TBE solüsyonuyla jelin üst yüzeyini de kapatacak şekilde dolduruldu.

PZR ürünlerinden 4 µl alınarak temiz bir parafilm üzerinde 2 µl blue loading dye (bromofenol) ile karıştırılarak her bir kuyucuğa yüklendi. 1,5 saat 100V elektrik gerilimi altında jel elektroforez uygulandıktan sonra 312 nm'de UV transillüminatör ile değerlendirilip fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde 100 bç'lik DNA büyüklük belirteci (DNA ladder) kullanıldı.

### 3.3.3.3. Biyofilm Genlerinin Saptanmasında Kullanılan Primerler (14, 95)

*icaA*: F: 5'- CCT AAC TAA CGA AAG GTA G -3' → (1315 bp)  
R: 5'- AAG ATA TAG CGA TAA GTG C -3'

*icaB*: F: 5'- ATC GCT TAA AGC ACA CGA CGC -3' → (526 bp)  
R: 5'- TAT CGG CAT CTG GTG TGA CAG -3'

*icaC*: F: 5'- ATA AAC TTG AAT TAG TGT ATT -3' → (989 bp)  
R: 5'- ATA TAT AAA ACT CTC TTA ACA -3'

*icaD*: F: 5'- AGG CAA TAT CCA ACG GTA A -3' → (371 bp)  
R: 5'- GTC ACG ACC TTT CTT ATA TT -3'

### 3.3.3.4. Kalite Kontrol:

*S. epidermidis* ATCC 35984 - pozitif kontrol

*S. aureus* ATCC 29213 ve *S. epidermidis* ATCC 12228- negatif kontrol

## 3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 18.0 programı kullanıldı. P değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

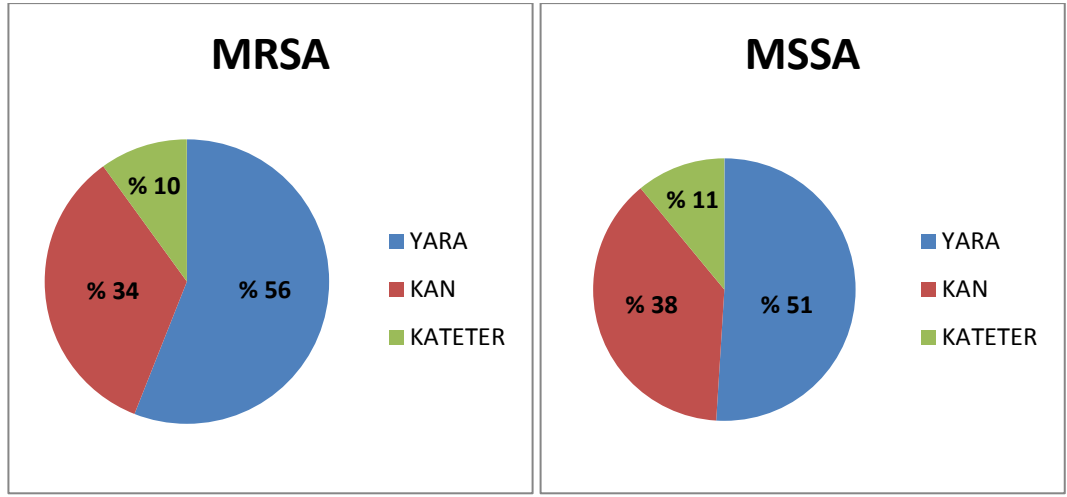
Veriler sayı, yüzde ve ortanca (25-75. persentil) olarak gösterildi. Nümerik verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan nümerik verilerin bağımsız gruplar arası karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi; bağımlı gruplar arası karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Nominal değerlerin karşılaştırmasında bağımsız gruplar için Ki-Kare testi, bağımlı gruplar için McNemar testi uygulandı.

Modifiye Christensen yöntemine karşı diğer yöntemlerin ve PZR'ye karşı konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık, özgüllük ile pozitif ve negatif prediktif değerleri çapraz tablolar yapılarak hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Staphylococcus aureus* İzolatları

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 107 yara (% 53,5), 72 kan (% 36) ve 21 kateter (% 10,5) örneği olmak üzere toplam 200 *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edildi. 200 suşun 100'ü metisiline dirençli iken, 100'ü metisiline duyarlı idi. 100 MRSA izolatının 56'sı yara, 34'ü kan ve 10'u kateter örneklerinden izole edilirken; 100 MSSA izolatının 51'i yara, 38'i kan, 11'i kateter örneklerinden izole edildi. Şekil 4.1'de metisilin direncine göre izolatların dağılımı gösterilmiştir.



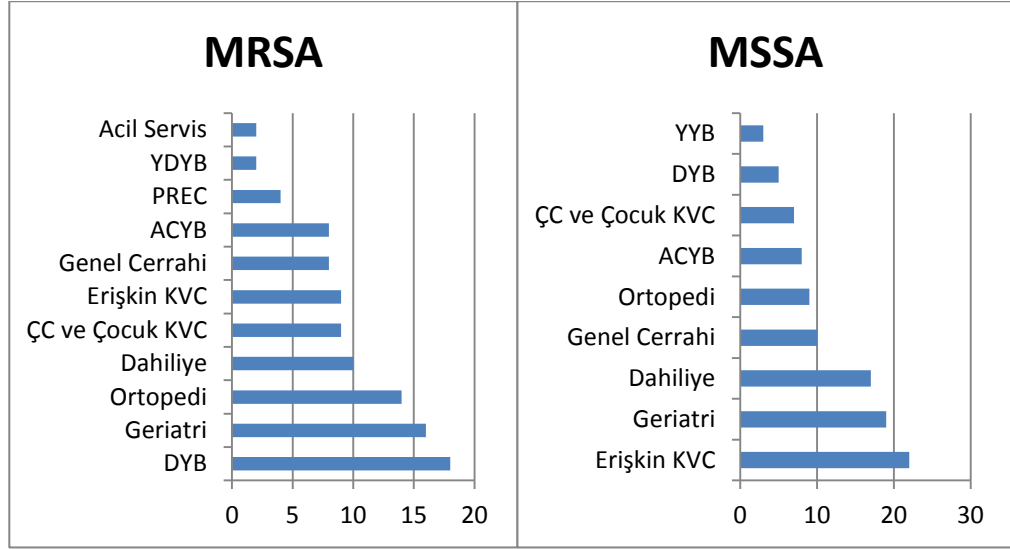
Şekil 4.1. MRSA ve MSSA suşlarının örneklere göre dağılımı

Hastaların kliniklere göre dağılımına bakıldığında 100 MRSA izolatının 18'i dahiliye yoğun bakım (DYB), 16'sı geriatri, 14'ü ortopedi, 10'u dahiliye, 9'u çocuk cerrahisi (ÇC) ve çocuk kalp damar cerrahisi (Çocuk KVC), 9'u erişkin kalp damar cerrahisi (Erişkin KVC), 8'i genel cerrahi, 8'i anestezi - cerrahi yoğun bakım (ACYB), 4'ü plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi (PREC), 2'si yenidoğan yoğun bakım (YYB) ve 2'si de acil serviste yatmakta olan hastalardan izole edildi. Genel olarak toparlandığında izolatların %46'sı cerrahi, %26'sı dahili kliniklerden izole edilirken; %28'i yoğun bakım ünitelerinden izole edildi.

100 MSSA izolatının 22'si erişkin kalp ve damar cerrahisi, 19'u geriatri, 17'si dahiliye, 10'u genel cerrahi, 9'u ortopedi, 8'i anestezi - cerrahi yoğun bakım, 7'si çocuk cerrahisi ve çocuk kalp damar cerrahisi, 5'i dahiliye yoğun bakım ve 3'ü yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastalardan izole edildi. Genel

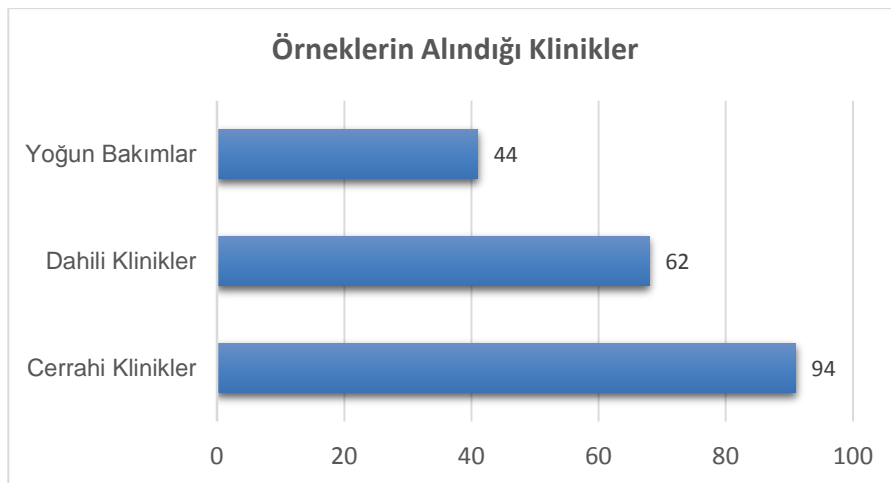
olarak bakıldığında izolatların %48'i cerrahi, %36'si dahili kliniklerden; %16'sı ise yoğun bakım ünitelerinden izole edildi.

Şekil 4.2'de MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri bölümlere göre dağılımı görülmektedir.



Şekil 4.2. MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri bölümlere göre dağılımı

Metisilin duyarlı ve dirençli tüm suşlar bir arada değerlendirildiğinde örneklerin izole edildiği klinikler sıklık sırasına göre; cerrahi klinikler 94 (%47), dahili klinikler 62 (%31) ve yoğun bakım üniteleri 44 (%22) şeklinde bulundu. Şekil 4.3'te çalışmaya alınan tüm bakterilerin izole edildikleri servislere göre dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Çalışmaya alınan tüm bakterilerin izole edildikleri servislere göre dağılımı (n)

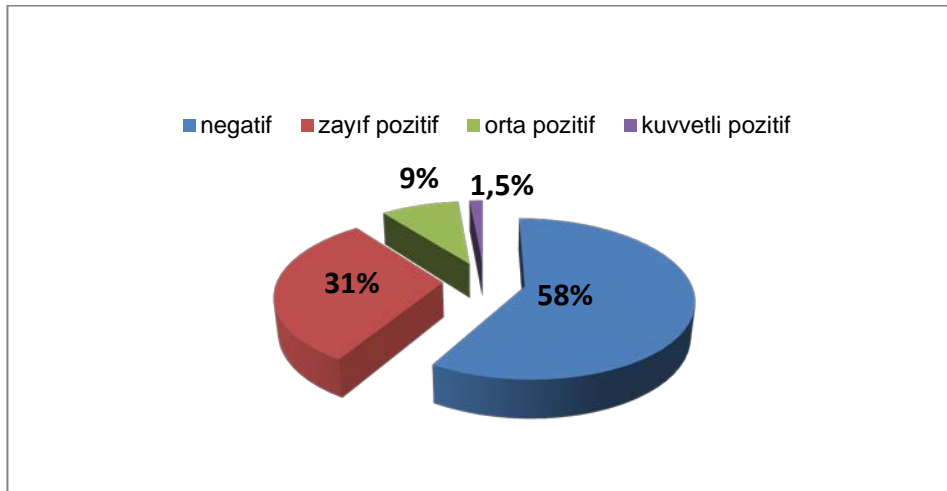
MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri kaynak (yara veya kan-kateter) ve gönderildikleri klinikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0,05$ ). İki grup istatistiksel olarak karşılaştırılmaya uygun bulundu.

## 4.2. Biyofilm Tespit Yöntemleri

### 4.2.1. Konvansiyonel Yöntemler

#### 4.2.1.1. Modifiye Christensen Yöntemi

Çalışmaya alınan toplam 200 *S. aureus* izolatının 83'ü (%41,5) modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturdu, 117'si (%58,5) ise oluşturmadı. Kantitatif olarak bakıldığında biyofilm oluşturan 83 bakteriden 62'sinin zayıf (%31), 18'inin orta (%9), 3'ünün kuvvetli (%1,5) derecede biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 4.4'te çalışmaya alınan tüm bakterilerin biyofilm oluşturma oranları ve biyofilm pozitiflik dereceleri görülmektedir.



Şekil 4.4. Modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm pozitiflik oranları

Biyofilm oluşturan örneklerin 49'u (%59) MRSA, 34'ü (%41) ise MSSA idi. Bu sonuçlara göre Christensen yönteminde MRSA suşlarının biyofilm oluşturma oranı MSSA suşlarına göre anlamlı yüksek bulundu ( $p = 0,031$ ). Buna ek olarak kuvvetli derecede biyofilm oluşturan 3 bakterinin tamamı MRSA iken, orta derecede biyofilm oluşturan 18 bakteriden yalnızca 2'si MSSA idi. Tablo 4.1'de MRSA ve MSSA suşlarındaki biyofilm pozitiflik oranları karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.1. Biyofilm oluşumu açısından MRSA ve MSSA suşlarının karşılaştırılması**

		MSSA (n=100)		MRSA (n=100)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
<b>Modifiye</b>	(-)	66	66,0	51	51,0	4,634	<b>0,031</b>
<b>Christensen</b>	(+)	34	34,0	49	49,0		

\*Ki-kare testi ile

Kan (kan + kateter) ve yaradan izole edilen suşlar iki ayrı alt grup olarak belirlenip biyofilm oluşturma oranları karşılaştırıldığında yaradan izole edilen suşların kandan izole edilenlere göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu gözlemlendi (p=0,029). Tablo 4.2’de Modifiye Christensen yöntemine göre kan ve yara izolatlarının biyofilm pozitiflikleri görülmektedir.

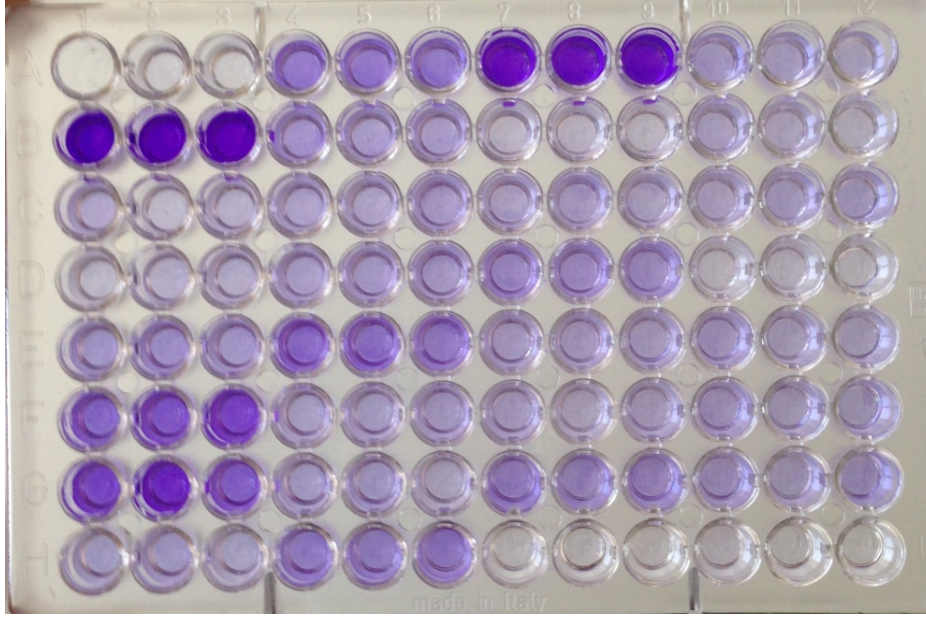
**Tablo 4.2. Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları (Modifiye Christensen)**

		Yara (n=107)		Kan (n=93)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
<b>Modifiye</b>	(-)	55	51,4	62	66,7	4,775	<b>0,029</b>
<b>Christensen</b>	(+)	52	48,6	31	33,3		

\*Ki-kare testi ile

Kateterden izole edilen suşları kan izolatlarından ayrı tutarak kan, kateter, yara şeklinde üç alt gruba ayırıp ikili karşılaştırmalar yapıldığında ise kateter/yara ile kateter/kan örnekleri arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).

Şekil 4.5’te 96 kuyucuklu mikroplakta oluşturulan 24 saatlik biyofilmlerin optik okuyucu öncesi %2’lik kristal viyole ile boyanma işleminden sonraki makroskopik görünümü görülmektedir.

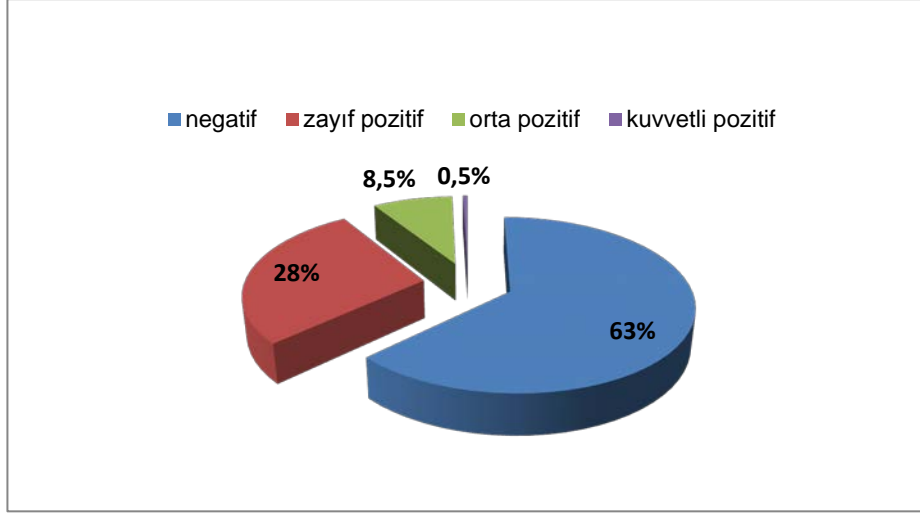


**Şekil 4.5. Modifiye Christensen yöntemiyle biyofilm oluşumunun gösterilmesi**  
\*Her bakteri üçer kuyucukta çalışılmıştır. Sağ alt köşe son 6 kuyucuk negatif kontroldür.

#### 4.2.1.2. MTT Yöntemi

Modifiye Christensen yöntemi uzun yıllardır rutin laboratuvar uygulamalarında güvenilirliği kabul edilmiş bir konvansiyonel yöntem olduğundan, biyofilm varlığını gösteren diğer konvansiyonel yöntemler modifiye Christensen yöntemine göre değerlendirildi. Sonrasında tüm konvansiyonel yöntemler PZR gen pozitifliği standart kabul edilerek kendi içlerinde bir kez daha karşılaştırıldı.

Biyofilm varlığını göstermede kullanılan bir metabolik yöntem olan MTT yöntemine göre çalışmaya alınan toplam 200 *S. aureus* izolatının 74'ü (%37) biyofilm oluşturdu, 126'sı (%63) ise oluşturmadı. Kantitatif olarak bakıldığında biyofilm oluşturan 74 bakteriden 56'sı zayıf (%28), 17'si orta (%8,5) ve 1'i ise kuvvetli (%0,5) derecede biyofilm oluşturdu. Şekil 4.6'da MTT yöntemine göre çalışmaya alınan tüm bakteriler içerisindeki biyofilm oluşturma oranları görülmektedir.



Şekil 4.6. MTT yöntemine göre biyofilm pozitiflik oranları

Biyofilm oluşturan örneklerin 47'si (%63,5) MRSA, 27'si (%36,5) ise MSSA idi. Bu sonuçlara göre MTT yönteminde MRSA suşlarının biyofilm oluşturma oranı MSSA suşlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p = 0,003$ ). Ayrıca kuvvetli derecede biyofilm oluşturduğu gözlenen bakteri ile orta derecede biyofilm oluşturan 17 bakteriden 16'sı MRSA idi. Tablo 4.3'de MTT yöntemine göre MRSA ve MSSA suşlarındaki biyofilm pozitiflik oranları karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.3. Biyofilm oluşumu açısından MRSA ve MSSA suşlarının karşılaştırılması (MTT)

		MSSA (n=100)		MRSA (n=100)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
MTT	Negatif	73	73,0	53	53,0	8,580	0,003
	Pozitif	27	27,0	47	47,0		

\*Ki-kare testi ile

Kan ve yaradan izole edilen suşlar iki ayrı alt grup olarak belirlenip biyofilm oluşturma oranları karşılaştırıldığında kandan izole edilen suşlarla yaradan izole edilenler arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). Tablo 4.4'de MTT yöntemine göre kan ve yara izolatlarının biyofilm pozitiflikleri görülmektedir.



**Tablo 4.4. Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları**

		Yara (n=107)		Kan (n=93)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
		<b>MTT</b>	(-)	61	57		
	(+)	46	43	28	30,1		

\*Ki-kare testi ile

Yine kateter alt grubu kandan ayrı bir grup olarak değerlendirildiğinde kateter-yara ile kateter-kan örnekleri arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

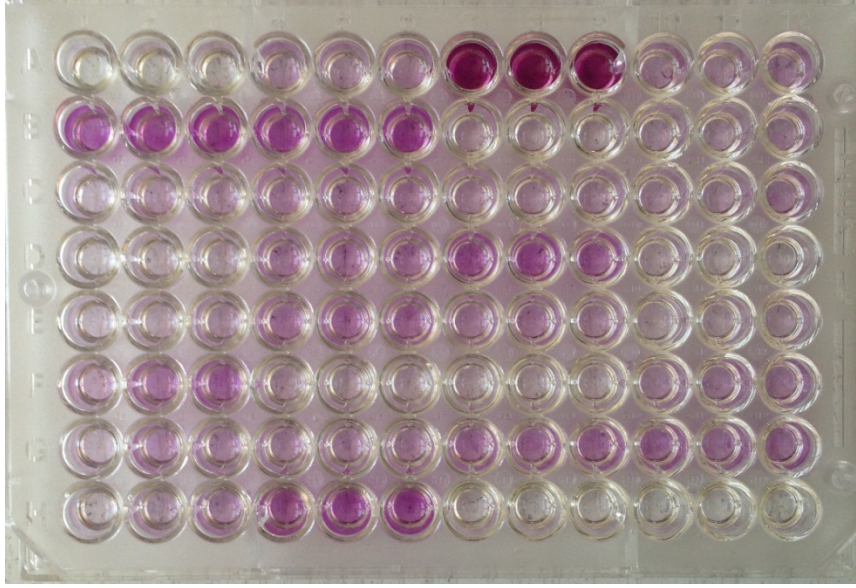
Christensen yöntemi referans yöntem olarak kabul edildiğinde Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturmadığı gözlenen 117 suştan 3'ünün MTT yönteminde pozitiflik verdiği gözlendi. Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan ise 12'sinin MTT yöntemine göre negatif sonuç verdiği gözlendi. Buna göre biyofilm varlığını tespit etme açısından iki yöntem arasında anlamlı bir fark görüldü ( $p=0,035$ ). Christensen ve MTT yöntemleri biyofilm kantitasyon derecelerine göre (zayıf, orta, kuvvetli) karşılaştırıldığında aralarındaki farkın daha da belirgin olduğu gözlendi ( $p<0,01$ ). Tablo 4.5'te biyofilm yoğunluk dereceleri baz alınarak Christensen ve MTT yöntemlerinin pozitiflikleri karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.5. Christensen ve MTT yöntemlerine göre biyofilm yoğunluk derecesi karşılaştırması**

		Christensen				*P
		Negatif	Zayıf (+)	Orta (+)	Kuvvetli (+)	
		Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	
<b>MTT</b>	<b>Negatif</b>	114 (97,4)	12 (19,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	<b>0,003</b>
	<b>Zayıf (+)</b>	3 (2,6)	49 (79,0)	4 (22,2)	0 (0,0)	
	<b>Orta (+)</b>	0 (0,0)	1 (1,6)	14 (77,8)	2 (66,7)	
	<b>Kuvvetli (+)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	

\*Wilcoxon Signed Rank Testi ile

Şekil 4.7'de 96 kuyucuklu mikroplakta 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşturan bakterilerin DMSO'da çözünmesinin ardından makroskopik görünümü görülmektedir.



**Şekil 4.7. MTT yöntemiyle biyofilm varlığının gösterilmesi**

\*Her bakteri üçer kuyucukta çalışılmıştır. Sağ alt köşe son 6 kuyucuk negatif kontroldür.

#### **4.2.1.3. BioTimer Yöntemi**

Biyofilm varlığını tespit etmenin yanı sıra yapısındaki canlı mikroorganizma kantitasyonu da yapma olasılığı sağlayan BioTimer yöntemine göre çalışmaya alınan 200 *S. aureus* suşundan 88'i biyofilm oluştururken (%44), 112'sinde biyofilm oluşumu gözlenmedi (%56). Biyofilm oluşumu gözlenen 88 örnekten 40 tanesi (%45,5) MSSA iken, 48 tanesi MRSA idi. BioTimer yöntemine göre biyofilm oluşturan bakteriler arasında karşılaştırma yapıldığında metisilin dirençli grubun duyarlı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde hem daha erken sürede hem de daha yoğun biyofilm oluşturduğu gözlemlendi.

Tablo 4.6'da biyofilm oluşturan MRSA ve MSSA suşlarının BioTimer yöntemiyle biyofilm oluşturma zamanları ve biyofilm yapısındaki koloni sayılarının karşılaştırılması gösterilmiştir. Buna göre metisilin dirençli suşlar duyarlı suşlara göre anlamlı düzeyde yoğun ve hızlı biyofilm formasyonu oluşturmaktadır ( $p=0,011$ ).

**Tablo 4.6. BioTimer yöntemiyle metisilin duyarlı ve dirençli stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma zamanları ve koloni sayılarının karşılaştırılması**

	MSSA (n=100)			MRSA (n=100)			*P
	25.	75.	25.	75.			
	Median	Persentil	Persentil	Median	Persentil	Persentil	
BioTimer(dk)	480	360	480	360	120	480	<b>0,011</b>
(logCFU)	5	5	6	6	5	8	<b>0,011</b>

\* Mann-Whitney U testi ile, P<0,05

Kan ve yaradan izole edilen suşlar iki ayrı alt grup olarak belirlenip biyofilm oluşturma oranları karşılaştırıldığında BioTimer yönteminde modifiye Christensen yönteminde olduğu gibi yaradan izole edilen suşların kandan izole edilenlere göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu gözlemlendi (p=0,005). Tablo 4.7’de BioTimer yöntemine göre kan ve yara izolatlarının biyofilm pozitiflikleri görülmektedir.

**Tablo 4.7. Kan ve yara izolatlarının biyofilm oluşturma oranları (BioTimer)**

		Yara (n=107)		Kan (n=93)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
		<b>BioTimer</b>	(-)	50	46,7		
	(+)	57	53,3	31	33,3		

\*Ki-kare testi ile

Kateter alt grubu kan grubunun içerisinde ayrı ayrı olarak değerlendirildiğinde kateter-yara ile kateter-kan örnekleri arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).

Modifiye Christensen yöntemi referans yöntem olarak kabul edildiğinde bu yöntemle göre biyofilm oluşturmadığı gözlenen 117 suştan 9’unun BioTimer yönteminde pozitiflik verdiği gözlemlendi. Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan ise 4’ünün BioTimer yöntemine göre negatif sonuç

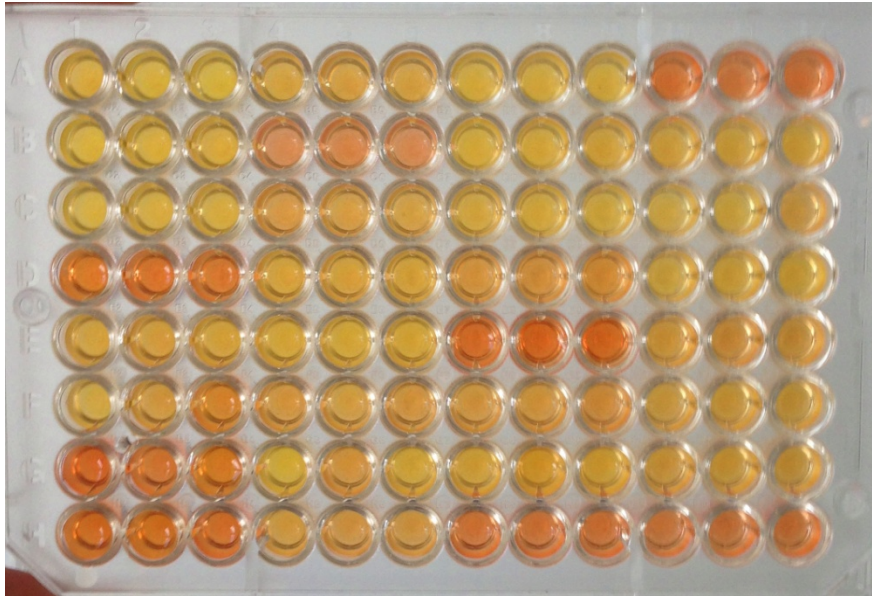
verdiği gözlemlendi. Buna göre biyofilm varlığını tespit etme açısından iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ). Tablo 4.8’de BioTimer ve modifiye Christensen yöntemleri biyofilm pozitiflikleri bakımından karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.8. Modifiye Christensen ve BioTimer yöntemleri biyofilm pozitiflikleri karşılaştırması**

		Modifiye Christensen				*P
		Negatif		Pozitif		
		Sayı	%	Sayı	%	
BioTimer	Negatif	108	92,3	4	4,8	0,267
	Pozitif	9	7,7	79	95,2	

\*McNemar testi ile

Şekil 4.8’de BT-PR besiyeri doldurulmuş 96 kuyucuklu mikroplakta biyofilm oluşturan suşlardaki renk değişimi görülmektedir (840. dk).



**Şekil 4.8. BioTimer yöntemiyle biyofilm varlığının araştırılması**

\*Her bakteri üçer kuyucukta çalışılmıştır. Sağ alt köşe son 6 kuyucuk negatif kontroldür.

#### 4.2.1.4. Congo Red Agar (CRA)Yöntemi

Günümüzde halen kullanılmaya devam edilen CRA yönteminde agar içerisindeki kongo kırmızısı bakterilerin ekzopolisakkarit yapısındaki *slime* faktörüyle birleşir ve koyu renk oluşumuna sebep olur. Çalışmada çeşitli konvansiyonel yöntemlerle biyofilm oluşumunun araştırılmasının yanında bakterilerdeki *slime* faktör oluşumu CRA yöntemiyle araştırılmıştır.

Kısmen subjektif bir metot olması sebebiyle plak okumaları ayrı ayrı iki kişi tarafından yapılmış ve plaklar 37°C'de 24 ve ardından oda sıcaklığında 48 saat inkübasyon sonrası iki kere değerlendirilmiştir.

CRA 24. saat değerlendirmesinde çalışmaya alınan 200 suştan 128 tanesinin (%64) *slime* faktör oluşturmadığı, 72 suşun (%36) ise plakta *slime* faktör oluşumunu destekler nitelikte koyu kırmızı, kahverengi - siyah renkli veya pürüzlü, kuru koloniler oluşturduğu gözlemlendi. Aynı plaklar bir gün daha oda sıcaklığında bekletilip tekrar değerlendirildiğinde *slime* faktörü yönünden pozitif olan suşlarda bir değişiklik gözlenmediği; ancak 24. saat sonunda *slime* faktör negatif olarak okunan 20 suşun 48. saat sonunda pozitifleştiği gözlemlendi. Buna göre CRA 48. saat değerlendirmesinde 108 suş (%54) *slime* faktör oluşturmazken, 92 (%46) suşun oluşturduğu görüldü.

CRA 24 ve 48. saat okumaları karşılaştırıldığında iki değerlendirme arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). Tablo 4.9'da CRA yöntemi 24 ve 48. saat değerlendirme sonuçları karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.9. CRA yöntemiyle 24. ve 48. saatlerdeki *slime* faktör pozitiflik oranlarının karşılaştırılması**

		CRA 24. Saat		*P
		Negatif	Pozitif	
		Sayı (%)	Sayı (%)	
CRA 48. Saat	Negatif	108 (100,0)	0 (0,0)	<0,001
	Pozitif	20 (21,7)	72 (78,3)	

\*McNemar testi ile

CRA 24. saat değerlendirmesinde *slime* faktörü pozitif olan 72 suştan 41'i (%57) MSSA, 31'i (%43) MRSA iken 48. saat değerlendirmesinde pozitif olan 92 suştan 51'i (%55,4) MSSA, 41'i (%44,6) MRSA idi. Buna göre *slime* oluşumu bakımından MRSA ve MSSA suşları arasında 24. ve 48. saat değerlendirmelerinde anlamlı bir fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

Kan ve yaradan izole edilen suşlar iki ayrı alt grup olarak belirlenip *slime* faktör oluşturma oranları karşılaştırıldığında hem 24. hem de 48. saat değerlendirmelerinde kandan izole edilen suşlarla yaradan izole edilenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p<0,05$ ). Tablo 4.10'da CRA yöntemi 24 ve 48. saat değerlendirmelerine göre kan ve yara izolatlarının *slime* faktör pozitiflikleri görülmektedir.

**Tablo 4.10. Kan ve yara izolatlarının *slime* faktör pozitiflikleri (CRA 24 ve 48. saat)**

	Yara (n=107)		Kan (n=93)		$\chi^2$	*P	
	Sayı	%	Sayı	%			
CRA 24. saat	(-)	63	58,9	65	69,9	2,620	0,106
	(+)	44	41,1	28	30,1		
CRA 48. saat	(-)	51	47,7	57	61,3	3,719	0,054
	(+)	56	52,3	36	38,7		

\*Ki-kare testi ile

Kateter alt grubu kan grubundan ayrılarak üç grup halinde değerlendirildiğinde kateter-yara ile kateter-kan örnekleri arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ).

Modifiye Christensen yöntemi referans yöntem olarak kabul edildiğinde CRA 24. saat değerlendirmesinde Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturmadığı gözlenen 117 suştan 25'inin pozitiflik verdiği gözlendi. Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan 36'sı negatif okundu. CRA 48. saat değerlendirmesinde ise biyofilm negatif olan 117 suştan 35'i pozitif olarak okunurken, biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan 26'sının *slime* faktörü oluşturmadığı görüldü. Christensen yöntemi ile saptanan biyofilm pozitifliği ile CRA 24. ve 48. saat değerlendirmelerinde gözlenen *slime* faktör pozitifliği arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ). Tablo 4.11'de CRA *slime* faktör pozitifliği ile Christensen yöntemi biyofilm varlığı karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.11. CRA 24 ve 48. saat *slime* faktör pozitifliği ve Christensen yöntemi biyofilm varlığı**

		Christensen				*P
		Negatif		Pozitif		
		Sayı	%	Sayı	%	
CRA 24. saat	Negatif	92	78,6	36	43,4	0,200
	Pozitif	25	21,4	47	56,6	
CRA 48. saat	Negatif	82	70,1	26	31,3	0,306
	Pozitif	35	29,9	57	68,7	

\*McNemar testi ile

Şekil 4.9'da CRA besiyerinde *slime* faktörün fenotipik olarak ifadenmesi görülmektedir.



Şekil 4.9. CRA besiyerinde *slime* faktör oluşumu

Christensen yöntemi esas alınarak diğer konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri değerlendirildiğinde; duyarlılığı en yüksek yöntemin BioTimer yöntemi olduğu gözlenirken (%95,2), duyarlılığı en düşük yöntemin CRA 24. saat değerlendirmesi olduğu görüldü. Özgüllüğü en yüksek yöntemin MTT yöntemi (%97,4), en düşük özgüllüğe sahip yöntemin ise CRA 48. saat değerlendirmesi olduğu görüldü (%70,1). Tablo 4.12’de Christensen yöntemi esas alındığında diğer konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri görülmektedir.

Tablo 4.12. Christensen yöntemi baz alındığında diğer konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

P o z i t i f		Christensen			
		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
P r e	<b>BioTimer</b>	95,2	92,3	89,8	96,4
	<b>MTT</b>	85,5	97,4	95,9	90,5
	<b>CRA 24. saat</b>	56,6	78,6	65,3	71,9
	<b>CRA 48. saat</b>	68,7	70,1	62,0	75,9

## 4.2.2. Moleküler Biyofilm Tespit Yöntemleri

*S. aureus* biyofilm oluşumundaki temel mekanizma olan PIA sentezinde rol alan 4 gen bölgesi ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmiştir.

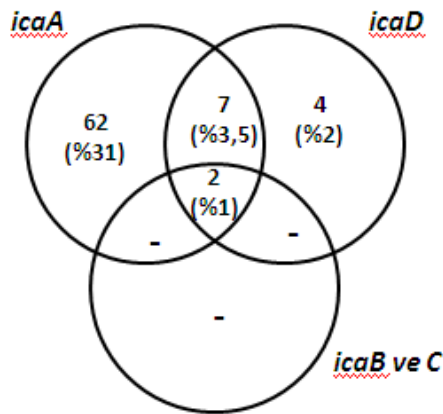
### 4.2.2.1. *icaADBC* Operonu

PIA sentezinden sorumlu olan N-asetilglukozamil transferaz enziminin sentezinde rol alan *icaA*, biyofilm tabakasının ana yapıtaşı olan N-asetilglukozamin sentezini sağlar. *icaB* PIA olgunlaşmasından, *icaC* polisakkarit elongasyonundan sorumludur. *icaD* geni ise N-asetilglukozamil transferaz'ın maksimal ekspresyonunda rol oynar ve *icaA* geni ile koekspresyonu N-asetilglukozamin transferaz aktivitesinde belirgin artışa sebep olur (13).

Çalışmaya katılan 200 *S. aureus* suşu bir arada değerlendirildiğinde *icaADBC* gen bölgeleri pozitifliği sırasıyla *icaA* %35,5, *icaD* %6,5, *icaB* ve *icaC* %1 olarak bulundu.

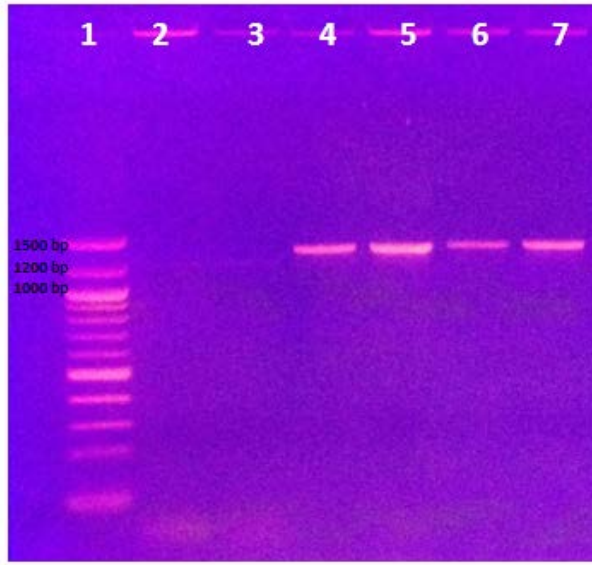
Biyofilm formasyonunda anahtar rol oynayan *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinden yalnızca birini içeren bakteri sayısı 66 (%33), tek başına *icaA* pozitifliği gösteren bakteri sayısı 62 (%31), hem *icaA* hem de *icaD* gen bölgelerini birlikte içeren bakteri sayısı ise 9 (%4,5) olarak tespit edildi. Her 4 gen bölgesini birlikte içeren 2 bakteri (%1) olduğu görüldü. Tek başına *icaD* gen bölgesi içeren 4 suş (%2) tespit edilirken; *icaA* içermeksizin *icaB* ve *C* gen bölgelerini bulduran hiçbir suş bulunmadı.

Şekil 4.10'da çalışılan tüm suşlar içerisindeki *icaADBC* pozitiflikleri, Şekil 4.11-14'de sırasıyla *icaA*, *icaB*, *icaD* ve *icaC* PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri görülmektedir.



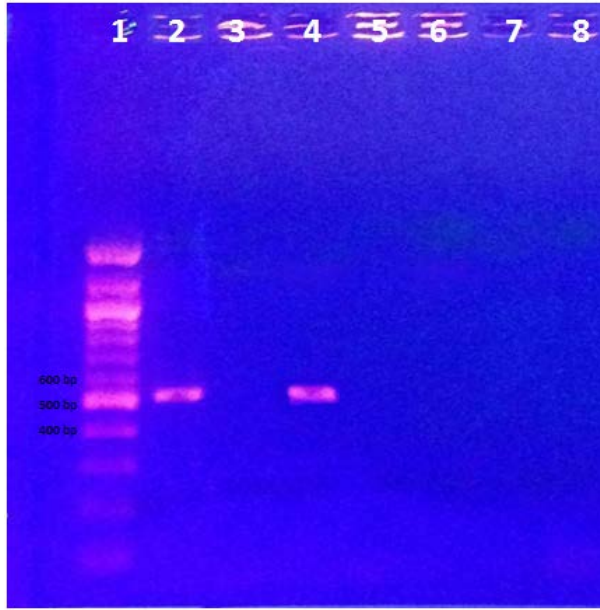
Şekil 4.10. *S. aureus* suşlarındaki *icaADBC* pozitiflikleri





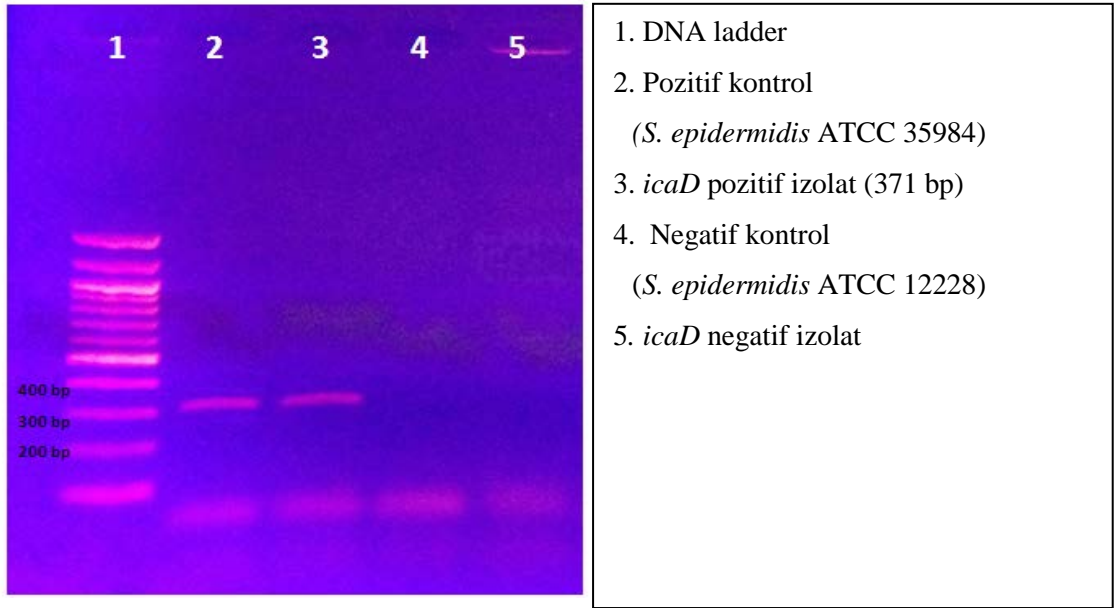
1. DNA ladder
2. Negatif kontrol  
(*S. epidermidis* ATCC 12228)
3. *icaA* negatif izolat
4. Pozitif kontrol  
(*S. epidermidis* ATCC 35984)
- 5,6,7. *icaA* pozitif izolatlar (1315 bp)

Şekil 4.11. *icaA* gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi

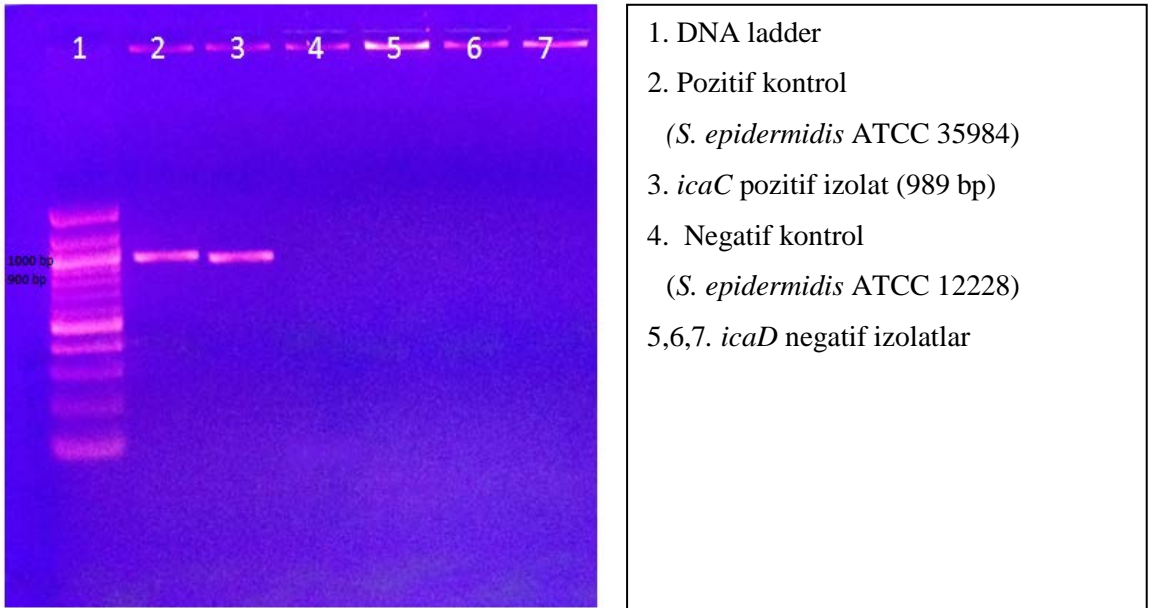


1. DNA ladder
2. Pozitif kontrol  
(*S. epidermidis* ATCC 35984)
3. Negatif kontrol  
(*S. epidermidis* ATCC 12228)
4. *icaB* pozitif izolat (526 bp)
- 5-8. *icaB* negatif izolatlar

Şekil 4.12. *icaB* gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi



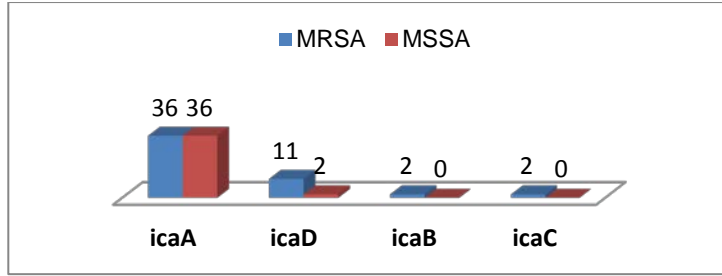
Şekil 4.13. *icaD* gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi



Şekil 4.14. *icaC* gen bölgesine ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezde gösterilmesi

Operondaki gen bölgeleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde en fazla pozitiflik *icaA* lokusunda görüldü (%35,5). Metisilin dirençli ve duyarlı suşlar arasında *icaA* pozitifliği bakımından anlamlı bir fark saptanmadı (%35/%36). *icaD* pozitifliği MRSA grubunda MSSA grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu (%11/%2) ( $p=0,01$ ). *icaB* ve *C* gen bölgelerinin tek başına pozitifliği gözlenmezken; *icaA* ve *D* pozitifliği de gösteren 2 suşta *icaB* ve *C* gen bölgelerinin de pozitif oldukları görüldü. *icaB* ve *C* pozitifliği gösteren her iki suş da MRSA idi.

*icaA* ve *D* gen bölgelerini birlikte içeren suşlarla, *icaADBC* operonu yönünden negatif olan suşlar karşılaştırıldığında MRSA grubunda her iki gen bölgesinin birlikte pozitifliğinin MSSA grubuna göre anlamlı yüksek olmasının etkisiyle (%11/%1) iki grup arasında *icaA* ve *icaD* birlikte pozitifliği bakımından anlamlı fark olduğu gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Şekil 4.15’de *icaADBC* operonunun metisilin duyarlı ve dirençli suşlardaki pozitifliği görülmektedir.



Şekil 4.15. MRSA ve MSSA suşlarındaki *icaADBC* pozitiflikleri

Kan ve yara izolatlarının tek tek *icaADBC* operonuna ait gen bölgeleri bulundurması bakımından karşılaştırılması sonucunda; *icaA* pozitifliğinin yaradan elde edilen izolatlarda, kandan elde edilenlere kıyasla anlamlı yüksek olduğu bulundu ( $p=0,005$ ). *icaD*, *icaB* ve *icaC* gen pozitifliği bakımından kan ve yaradan elde edilen izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). Tablo 4.13’te kan ve yara izolatlarının *icaADBC* pozitifliği görülmektedir.

Tablo 4.13. Kan ve yara izolatlarının *icaADBC* pozitiflikleri

		Yara (n=107)		Kan (n=93)		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
<i>icaA</i>	(-)	60	56	69	74,2	7,840	0,005
	(+)	47	44	24	25,8		
<i>icaD</i>	(-)	102	95,3	85	91,4	1,264	0,261
	(+)	5	4,7	8	8,6		
<i>icaB</i>	(-)	107	100	91	97,8	2,324	0,127
	(+)	0	0,0	2	2,2		
<i>icaC</i>	(-)	107	100	91	97,8	2,324	0,127
	(+)	0	0,0	2	2,2		

\*Ki-kare testi ile

Kan ve yara izolatları *icaADBC* operonuna ait herhangi bir *ica* gen bölgesi bulundurmalarına göre karşılaştırıldığında ise *icaA* lokusundan kaynaklı olarak yara izolatlarında kan izolatlarına göre *ica* bulundurma oranı anlamlı derecede yüksek bulundu (%45,8/%29) ( $p=0,015$ ). Tablo 4.14'te herhangi bir *ica* gen bölgesi bulundurma oranı açısından kan ve yara izolatlarının karşılaştırılması görülmektedir.

**Tablo 4.14. Kan ve yara izolatlarının herhangi bir *ica* gen bölgesi içermesi bakımından karşılaştırılması**

		Yara		Kan		$\chi^2$	*P
		Sayı	%	Sayı	%		
<i>icaA, B, C</i> veya <i>D</i>	(-)	58	54,2	66	71,0	<b>5,934</b>	<b>0,015</b>
	(+)	49	45,8	27	29,0		

\*Ki-kare testi ile

Konvansiyonel yöntemler içerisinde referans olarak aldığımız modifiye Christensen yöntemi ile biyofilm oluşumunun temel bileşeni olan *icaA* gen bölgesi varlığı karşılaştırıldığında; *icaA* pozitifliği gösteren 71 suştan 13 tanesinin (%18,3) modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturmadığı, 58'inin (%81,7) ise çeşitli derecelerde biyofilm formasyonu gösterdiği görüldü. Buna göre PZR'de *icaA* pozitifliği saptanan suşlar ile modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ).

Modifiye Christensen yöntemiyle herhangi bir *ica* gen bölgesi varlığı karşılaştırıldığında *icaADBC* operonuna ait herhangi bir gen bölgesini bulunduran 75 bakteriden 13'ünün (%17,3) biyofilm oluşturmadığı, 62'sinin (%82,6) ise çeşitli derecelerde biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. PZR ile *icaADBC* operonuna ait herhangi bir gen bölgesini içeren suşlarla modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturan suşlar arasında da anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

Modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan 25 tanesi (%30,1) *icaA* negatifken, 19'unun (%22,8) hiçbir *ica* gen bölgesi içermediği görüldü. Tablo 4.15'te modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu belirlenen suşlar yalnızca *icaA* gen lokusu ve herhangi bir *ica* bulundurma durumlarına göre karşılaştırılmıştır.

**Tablo 4.15. PZR’de saptanan biyofilm gen bölgeleri pozitifliği ile modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm varlığının karşılaştırılması**

		Modifiye Christensen Yöntemi				*P
		Negatif		Pozitif		
		Sayı	%	Sayı	%	
<i>icaA</i>	(-)	104	88,9	25	30,1	0,074
	(+)	13	11,1	58	69,9	
<i>icaABCD</i>	(-)	104	88,9	21	25,3	>0,05
	(+)	13	11,1	62	74,7	

\*McNemar testi; sütun yüzdeleri verilmiştir

Kullanılan diğer konvansiyonel yöntemler ile *icaADBC* operonuna ait herhangi bir gen pozitifliği ilişkisine bakıldığında herhangi bir *ica* gen bölgesi bulundurduğu bilinen 75 bakteriden 19’u (%25,3) MTT yönteminde biyofilm oluşturmazken, 56’sı (%74,7) çeşitli derecelerde biyofilm oluşturdu. Buna göre PZR’de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile MTT yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ).

BioTimer yönteminde *ica* pozitifliği gösteren 75 suştan yalnızca 10 tanesi (%13,3) biyofilm oluşturmazken, 65 suş (%86,7) çeşitli derecede biyofilm oluşturdu. Buna göre PZR’de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile BioTimer yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ).

*ica* pozitifliği gösteren 75 suştan 20’sinde (%26,7) CRA’da *slime* oluşumu gözlenmezken, 55 (%73,3) suşta *slime* yapısına rastlandı. Buna göre PZR’de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile CRA’da *slime* yapısı oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ).

Christensen yöntemi ile oluşan biyofilm formasyonu kantitatif olarak değerlendirildiğinde *icaADBC* operonundaki gen bölgelerinden iki ve daha fazlasının birlikte pozitifliğinin oluşan biyofilm yapısını anlamlı derecede kuvvetlendirdiği görüldü ( $p<0,05$ ).

Tek bir *ica* lokusu içeren suşların hiç *ica* gen bölgesi içermeyenlere göre anlamlı derecede kuvvetli biyofilm oluşturmasının yanı sıra, iki ve daha fazla *ica* lokusu içeren suşların da yalnızca tek bir *ica* pozitifliği gösteren suşlara göre anlamlı derecede kuvvetli biyofilm oluşturduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

Pozitif *ica* gen sayısının artışına paralel olarak Christensen yöntemi ile gösterilen biyofilm yapısının da giderek daha kuvvetli pozitiflik verdiği gözlemlendi.

Bunun yanı sıra tüm *ica* operonunun pozitif olduğu iki suş da orta derecede biyofilm oluştururken, Christensen yönteminde kuvvetli pozitiflik veren her 3 suşun da yalnızca tek bir *ica* (*icaA*) yönünden pozitif olanlar olduğu görüldü. Buna göre 2 *ica* pozitifliği gösteren suşlar ile 2'den fazla *ica* gen bölgesi içeren suşlar arasında biyofilm yoğunluk derecesi açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ).

2'den fazla *ica* içeren suşlar hem 2 ve daha fazla *ica* lokusu içerenler şeklinde gruplandırıldığında, hem de ayrı bir grup olarak değerlendirildiğinde *ica* negatif olan ve yalnız 1 *ica* pozitifliği gösteren suşlara oranla anlamlı derecede kuvvetli yoğunlukta biyofilm oluşturduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Tablo 4.16'da *ica* pozitiflik sayısı ile (*ica* negatif, 1 *ica* pozitif, 2 ve/veya daha fazla *ica* pozitif) biyofilm formasyonundaki kuvvetlenme dereceleri arasındaki ilişki görülmektedir.

**Tablo 4.16. *ica* pozitifliği ile biyofilm yoğunluk derecesi ilişkisi**

		Modifiye Christensen Yöntemi								*P
		Negatif		Zayıf (+)		Orta (+)		Kuvvetli(+)		
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
<i>ica</i> pozitifliği	<i>ica</i> (-)	103	83,1	19	15,3	2	1,6	0	0,0	
	1 <i>ica</i> (+)	13	19,4	40	59,7	11	16,4	3	4,5	0,008
	2 ve üstü <i>ica</i> (+)	1	11,1	3	33,3	5	55,6	0	0,0	
<i>ica</i> pozitifliği	<i>ica</i> (-)	103	82,4	20	16,0	2	1,6	0	0,0	
	1 <i>ica</i> (+)	13	19,7	39	59,1	11	16,7	3	4,5	0,014
	2 <i>ica</i> (+)	1	14,3	3	42,9	3	42,9	0	0,0	
	<i>icaADBC</i> (+)	0	0,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0	

\*Wilcoxon testi; satır yüzdeleri verilmiştir.

Tüm *ica* gen bölgelerinin negatif olduğu 125 suş dışında bırakılarak yalnız 1 *ica* pozitif olan ve birden fazla *ica* pozitifliği gösteren suşlarda konvansiyonel yöntemlerin biyofilm varlığını tespit etme düzeyleri araştırıldığında kullanılan tüm yöntemlerin birden fazla *ica* pozitifliği gösteren suşlarda anlamlı derecede yüksek pozitiflik verdiği görüldü ( $p<0,001$ ). Tablo 4.17'de bir ve birden fazla *ica* pozitifliği gösteren suşlarda konvansiyonel yöntemlerin biyofilm pozitiflikleri görülmektedir.

**Tablo 4.17. Bir ve birden fazla *ica* gen pozitifliği bulunan suşlarda biyofilm yöntemlerinin pozitifliklerinin karşılaştırılması**

		Bir <i>ica</i> geni (+)		Birden fazla <i>ica</i> geni (+)		*P
		(n=66)		(n=9)		
		Sayı	%	Sayı	%	
<b>Christensen</b>	(-)	13	92,9	1	7,1	<0,001
	(+)	53	86,9	8	13,1	
<b>MTT</b>	(-)	20	95,2	1	4,8	<0,001
	(+)	46	85,2	8	14,8	
<b>BioTimer</b>	(-)	9	90,0	1	10,0	<0,001
	(+)	57	87,7	8	12,3	
<b>CRA 24. st</b>	(-)	32	94,1	2	5,9	<0,001
	(+)	34	82,9	7	17,1	
<b>CRA 48. st</b>	(-)	20	90,9	2	9,1	<0,001
	(+)	46	86,8	7	13,2	

\*McNemar testi ile

Tüm konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri PZR’de herhangi bir *ica* gen bölgesi pozitifliği altın standart kabul edilerek değerlendirildiğinde en duyarlı konvansiyonel biyofilm tespit yönteminin MTT, en özgül yöntemin ise BioTimer yöntemi olduğu görüldü. Bunun yanı sıra CRA dışındaki tüm konvansiyonel yöntemlerin duyarlılığının %80’in üzerinde olduğu tespit edildi. Hem duyarlılık hem de özgüllük bir arada değerlendirildiğinde modifiye Christensen ve BioTimer yöntemlerinin MTT yönteminin düşük özgüllüğü, CRA’nın ise hem düşük özgüllük hem de düşük duyarlılığı sebebiyle biyofilm varlığının tespitinde diğer yöntemlere göre daha etkili olduğu görüldü. Tablo 4.18’de PZR altın standart kabul edilerek konvansiyonel yöntemlerin biyofilm tespitindeki duyarlılık ve özgüllükleri görülmektedir.

**Tablo 4.18. Biyofilm tespitinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri**

	Herhangi bir <i>ica</i> geni pozitifliği	
	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
<b>Christensen</b>	82,4	81,3
<b>MTT</b>	84	72
<b>BioTimer</b>	81,6	86,7
<b>CRA (48. saat)</b>	68,8	70,7

## 5. TARTIŞMA

*S. aureus* impetigo, folikülit, karbonkül, fronkül, selülit gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pnömoni, osteomyelit, piyomyozit ve septik artrit gibi yaygın sistemik enfeksiyonlara sebebiyet veren, tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalite nedeni toplum ve hastane kökenli patojenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Özellikle cerrahi alan enfeksiyonları, kutanöz abseler ve pürülan selülitte en sık görülen etkindir (1).

*S. aureus* insanda deri, sindirim sistemi ve solunum yollarının normal flora üyesi olması sebebiyle geniş bir hastalık spektrumuna sahip olsa da yumuşak doku adezyonunu sağlayan başta *slime* faktör oluşumu, kapsüler polisakkarit ve hücre duvarındaki teikoik asit yapıları sebebiyle en sık deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır (24, 125).

Dünyada ve Türkiye’de yapılan pek çok sürveyans çalışmasında özellikle giderek artan MRSA prevalansı ile birlikte toplumsal ve hastane kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyon etkenleri içerisinde *S. aureus*’un en çok öne çıkan patojen olduğu saptanmıştır. Dünyada yapılan çalışmalar incelendiğinde deri ve yumuşak doku enfeksiyon etkeni olarak *S. aureus*’un Kuzey Amerika’da %44,6, Güney Amerika’da %33,5 ve Avrupa genelinde ise %37,5’lik bir oranla ilk sırada yer aldığı görülmüştür (126). ABD ile Avrupa ülkelerini içine alan toplumsal ve hastane kökenli deri ve yumuşak doku enfeksiyonu sebebiyle hospitalize olan hastalarda yapılan bir çalışmada *S. aureus* Fransa, Almanya ve İtalya’da en sık, ABD ve İspanya’da ikinci en sık etken olarak görülmüştür (24). Uzak doğuda toplumsal kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında *S. aureus*’un tüm patojenler içerisinde %42,3 ile en sık enfeksiyon etkeni olduğu tespit edilmiştir (127). ABD’de 11 büyük eyalette yapılan bir çalışmada deri ve yumuşak doku enfeksiyonu sebebiyle acil servise başvuran hastalardan en sık izole edilen etkenin *S. aureus* olduğu belirtilmiştir (128).

Ülkemizde yapılan çalışmalar da dünyadakilere paralel şekilde en sık deri ve yumuşak doku enfeksiyon etkeninin *S. aureus* olduğunu göstermiştir. 2175 yara kültürünün değerlendirildiği bir çalışmada izole edilen bakterilerden %21,8’inin gram pozitif bakteri kaynaklı olduğu; bunlar içerisinde en sık izole edilen etkenin *S. aureus* (%18) olduğu görülmüştür (129). Yine Türkiye’de çeşitli sebeplerle hastanede yatan hastaların yara kültürlerinden en sık izole edilen



mikroorganizmanın *S. aureus* olduğu (%36); ayrıca cerrahi alan enfeksiyon etkenleri arasında da ilk sırada yine *S. aureus*'un bulunduğu (%29,1) gösterilmiştir (130, 131).

Hospitalize hastalarda intravasküler kateter kullanımı %50-60'lar civarındadır. Bu oran yoğun bakım ünitelerinde daha da artmaktadır. Hospitalize hastalarda gelişen bakteriyemilerin yaklaşık %40'ı kateter kaynaklıdır. Nozokomiyal bakteriyemiler yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir ve nozokomiyal enfeksiyon kaynaklı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır (74, 132).

Bakteriyemiler primer ve sekonder kaynaklı olabilir. Vücudun başka bölgelerinde aynı patojen bakteriyle oluşan bir enfeksiyon odağı bulunmaksızın primer bakteriyemi şeklinde veya aynı patojen bakterinin vücutta başka bir anatomik bölgede bulunan bir enfeksiyon odağından embolizasyonu ile gelişen sekonder bakteriyemi şeklinde meydana gelebilir (132).

Kateter yüzeyi biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan yüzey koşullandırmasını kolaylaştırır. İntravenöz bir kateter damar içerisinde hızla plateletler, plazma ve albümin, kollajen, fibrinojen gibi doku proteinleri tarafından kaplanır. Bu yüzey bakteriyel yüzey proteinlerinin tutunmasını artırır (70, 75). Bazı bakteriler bu tutunmanın ardından hücre dışına *slime* faktörü yani glikokaliks salgılayarak hızla biyofilm formasyonu oluşturur ve konak savunması ile antikemoterapötik ajanlardan korunur (133). Bu nedenle *S. aureus*'a bağlı bakteriyemilerde kateter kullanımı etyolojide büyük önem taşımaktadır.

*S. aureus* bakteriyemileri kateter dışında sıklıkla deri, yumuşak doku ve cerrahi alan enfeksiyonları, pulmoner enfeksiyonlar, infektif endokardit ve osteoartiküler enfeksiyon odaklarından kaynaklanır (1).

Çalışmamızda tüm bu nedenlerden dolayı *S. aureus*'un en sık enfeksiyon etkeni olduğu deri ve yumuşak doku yara örnekleriyle, özellikle biyofilm oluşumunun bir göstergesi olan kateter kültür örnekleri ve çeşitli sebeplerle *S. aureus* bakteriyemisi olan hastaların kan kültür örnekleri kullanılmıştır.

Kan ve yara izolatlarının biyofilm pozitiflikleri karşılaştırıldığında konvansiyonel yöntemler içerisinde kullanılan MTT, BioTimer ve CRA yöntemlerinde her iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir; modifiye Christensen yönteminde ise yara izolatlarının kan izolatlarına oranla daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

Sağlıklı erişkinlerin burun kültürlerinden izole edilen ve kan kültüründe üreyen *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumunun karşılaştırıldığı bir çalışmada her iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (134). Türkiye’de kan kültüründen ve sağlıklı erişkinlerin el kültüründen izole edilen KNS türlerinde yapılan bir çalışmada iki grup arasında biyofilm oluşumu açısından bir fark saptanmamıştır (106). Yine lokal enfeksiyon, bakteriyemi ve endoprotez enfeksiyon etkeni MRSA ve MSSA suşlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada biyofilm oluşumu ile neden olunan enfeksiyon çeşidi arasında bir ilişki bulunamamıştır (11).

*S. aureus*’un sahip olduğu kalın teikoik asit yapısı sayesinde kolaylıkla cilde tutunma, eksfoliatif toksin ve hemolizinleriyle deride porlar açma ve invaze olma, salgıladığı antiopsonizan proteinlerle fagositozu engelleyerek disemine olma özelliği yara ve kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus*’ların küçük farklılıklarla beraber klonal olarak aynı soydan geldiğini gösterir niteliktedir (3, 134). Ayrıca özellikle diyabetik ayak, venöz staz ve bası yaraları gibi kronik ülseratif lezyonlarda *S. aureus* biyofilmlerinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar kronik yara ve ülserlerin %88-93,5’inde *S. aureus* ürediğini göstermiştir (16, 135). Ayrıca yaralardaki iyileşme gecikmesi ve reepitelizasyonun spesifik olarak biyofilm yapısına bağlı olduğu gösterilmiştir (7). Bu durum çalışmamızda kullanılan hospitalize hastaların yara kültürlerinden izole edilen suşlarla, bakteriyemi etkeni olan suşların biyofilm oluşturma karakteristiği açısından iki grup arasında bir fark bulunmamasını açıklamaktadır.

Yapılan çalışmalar hastane kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık %65’inin biyofilm kaynaklı olduğunu ve infekte olmuş cihazların çıkarılmasının hem tedavi maliyetini hem de hasta morbiditesini büyük oranda artırdığını göstermiştir. Biyofilm yapısı doğal dokuların yanı sıra çeşitli kateterler, ortopedik protez, kontakt lens, protez kalp kapakçığı, koroner stent, rahim içi araç, endotrakeal tüp ve koklear implant gibi insan vücudunda kullanılan tıbbi cihaz ve malzemelerde oluşabilir. Oluşan biyofilm yapısının bu tıbbi cihaz ve malzemelerde fonksiyon kaybı yapmasının yanı sıra sebep olduğu kronik enfeksiyonlar da tedavi maliyeti ve hasta morbiditesini artırıcı bir etkidir (5, 75, 78).

Cilt florasından izole edilen saprofitik stafilokok suşlarında *ica* gen bölgesinin bulunmadığını ve hastane çalışanlarının cilt florasındaki stafilokok türlerinin sağlıklı erişkinlerinkine göre belirgin derecede yüksek oranda *ica* gen bölgesi içerdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 93). Çalışmada kullandığımız

izolatların tamamı hospitalize hastalardan, bunların %69'u ise cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan izole edilmiştir. Böylece çalışmada *ica* operonu barındırma olasılığı daha düşük olan saprofit ve toplum kökenli türlerdence tıbbi malzemelere tutunma ve biyofilm oluşturma yeteneği daha fazla olan suşların kullanılması amaçlanmıştır.

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedaviye dirençli olması ve insanda hastalık yapmasının ardında biyofilm formasyonunun çeşitli özellikleri bulunur. Bunlardan biri antimikrobiyal ajanların kalın matriks yapısını geçerek alt tabakada bulunan hücrelere ulaşamaması, ulaşsa dahi belli bir olgunluğa erişmiş biyofilm yapısındaki bakterilerin büyümesinin duraksamasıyla oluşan antimikrobiyal dirençtir. Bir diğer mekanizma biyofilm yapısını oluşturan bakterilerin heterojenitesi ve farklı antimikrobiyal duyarlılık paternlerine sahip olması; ayrıca biyofilm yapısının alt katmanlarının kısmi anaerob yapısına bağlı olarak bazı antikemoterapötiklerin etkinliğinin azalmasıdır. Ayrıca biyofilm yapısından ayrılan planktonik bakteriler vücudun çeşitli yerlerinde farklı enfeksiyon odakları da oluştururlar (8, 100).

Biyofilm ortamı organizasyonu itibariyle bakterilerin birbirleriyle kolaylıkla plazmid, transpozon, insersiyon sekans aktarımı ve ekstrakromozomal DNA değişimi yapabildiği multifaktöriyel direnç mekanizmalarının bir arada görüldüğü bir mikroortamdır (6). Metisilin direnci *S. aureus*'ta zaten önemli bir sağlık problemiyken metisilin dirençli suşların biyofilm oluşturarak ekstra direnç paternleri kazanması ciddi bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır.

Metisilin dirençli suşlara ait biyofilmlerin metisilin duyarlı olanlara oranla daha dayanıklı bir biyofilm yapısı oluşturduğu bilinmektedir (78). Bunun yanı sıra biyofilm pozitifliği daha yüksek bulunan suşların antikemoterapötik ajanlara karşı da daha dirençli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (136). Bunun sebebi metisilin dirençli suşların diğer antikemoterapötik ajanlara karşı da daha dirençli olma eğilimlerinin yanı sıra MRSA kökenli biyofilm yapılarının MSSA kökenlilere göre daha kalın (yoğun) olmasından da kaynaklanmaktadır (122, 136, 137).

Kalın biyofilm tabakasının alt katmanlarındaki hücreler ilacın penetrasyon yetersizliğinden dolayı sürekli MİK değerinden düşük bir antibiyotik konsantrasyonuna maruz kalır ve bu da bakterinin direnç kazanma ihtimalini artırır. Ayrıca antibiyoterapi sırasında biyofilmin alt katmanlarında hayatta kalan hücrelerin ek biyofilm tabakası geliştirme olasılığı vardır (78, 136).

Antibiyotik direnci - biyofilm oluşumu ilişkisine diğer yönden bakıldığında bazı antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarının stafilokoklarda *ica* gen ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (138, 139). Böylece stafilokoklarda antibiyotik direnci - biyofilm oluşumu ilişkisi değerlendirildiğinde her iki sistemin de birbirlerini kaskat şeklinde tetiklediği söylenebilir.

Metisilin direnci ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişki MRSA suşlarının metisiline düşük seviyeli heterojen direnç veya yüksek seviyeli homojen direnç gösterebildiğinin gözlemlenmesiyle ile daha da karmaşık hale gelmiştir. *PBP2a* ekspresyonunun biyofilm oluşumu üzerinde doğrudan veya hücre duvar yapısını değiştirerek dolaylı yoldan etkileri olup olmadığı belirlenmeye devam edilmektedir (140). Yükselmiş *PBP2a* ekspresyonunun *quorum sensing* operonlarına etki ederek biyofilm oluşumuna pozitif yönde etki ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (42, 140).

Çalıştığımız 100 MRSA, 100 MSSA suşu biyofilm oluşturma oranı ve oluşan biyofilm kantitasyonu bakımından karşılaştırıldığında konvansiyonel biyofilm tespit yöntemlerinden referans olarak kullandığımız modifiye Christensen yönteminde MRSA suşlarının oluşturduğu biyofilm oranı ve oluşan biyofilm yapısının derecesi MSSA suşlarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Kullanılan diğer konvansiyonel yöntemlerden MTT yönteminde MRSA suşlarının MSSA suşlarına göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu, BioTimer yönteminde ise hem daha erken sürede hem de daha yoğun biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Bulduğumuz tüm bu sonuçlar biyofilm oluşumu - metisilin direnci ilişkisini inceleyen hem dünya hem de Türkiye'deki diğer çalışmaları destekler niteliktedir (78, 141-144).

*ica* varlığı stafilokok türlerinin biyofilm oluşumunda tanımlanmış temel mekanizmadır; ancak KNS türlerinde, daha az olarak da *S. aureus*'ta "MSCRAMM" adı verilen yüzey proteinlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu proteinleri içeren *ica* negatif olduğu halde biyofilm oluşturan suşlar da görülebilir (9). Çalışmamızda kullanılan MRSA suşlarının MSSA suşlarına göre daha yüksek oranda *ica* gen bölgesi içerdiği görülmüştür. Her iki bakteri grubunda da *ica* bağımsız biyofilm oluşturan suşlar görüle de biyofilm oluşumunda temel rol alan *ica* operonuna ait gen bölgesi pozitifliği arttıkça biyofilm yapısının yoğunluğunun da arttığı görülmüştür (13). Yalnızca *ica* gen bölgeleri bakımından daha zengin

olması dahi MRSA suşlarının MSSA suşlarına oranla daha yoğun ve kalın biyofilm oluşturmasının nedenlerinden biri olarak gözükmektedir.

Yapılan çalışmalar invaziv suşların büyük kısmında *mecA* ve *ica* gen bölgelerinin bir arada bulunduğunu göstermiştir (93, 145). *ica* gen varlığı bakterinin değişen çevresel koşullarına daha iyi adaptasyonunu sağlar; böylece bakteri invazyonunu artırıcı bir etkisi vardır. Bu sebeple *ica* gen bölgelerinin araştırılması virulan - nonvirulan suşların belirlenmesinde tek başına bile önemli bir belirteçtir (143).

Biyofilm kavramının tam olarak yerleşmesinden önce Christensen ve arkadaşlarının bakterilerdeki *slime* yapısını göstermek için ortaya attığı Christensen yöntemi (113) yıllar içerisinde çeşitli değişikliklerle modifiye edilmiş ve günümüzde biyofilm tespitinde kullanılan temel bir yöntem olmuştur. Modifiye Christensen yönteminde biyofilm tabakayı oluşturan bakteri ve ekstrasellüler matriksin negatif yüklü molekülleri bazik bir boya olan kristal viyole ile boyanarak spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Bu yöntemle hem canlı hem ölü hücreler, hem de biyofilm yapısını oluşturan diğer komponentler boyanmaktadır (19, 118).

Christensen ve arkadaşlarının tanımladığı ilk yöntemde yalnızca kuyucuk tabanında oluşan biyofilm tabakası kalitatif olarak değerlendirilmekteydi (113). Modifiye Christensen yönteminde ise kullanılan boya çözülerek kuyucuğun hem tabanı hem de duvarında oluşan biyofilm ölçülmüş olur (118). Oluşan biyofilm yapısı gözle değerlendirilebildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülerek kantitasyonu da yapılması sağlanabilir.

Çalışmamızda modifiye Christensen yöntemi ile biyofilm oluşumunun temel bileşeni olan *icaA* gen bölgesi varlığı karşılaştırıldığında PZR'de *icaA* pozitifliği saptanan suşlar ile Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Ayrıca modifiye Christensen yöntemiyle herhangi bir *ica* gen bölgesi varlığı karşılaştırıldığında PZR ile *icaADBC* operonuna ait herhangi bir gen bölgesini içeren suşlarla modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturan suşlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlara göre modifiye Christensen yöntemi moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda biyofilm varlığının tespiti açısından güvenilir bir yöntem olarak gözükmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalar da modifiye Christensen yönteminin biyofilm oluşumunu göstermekte güvenilir bir yöntem olduğunu; ayrıca *icaADBC* pozitifliğiyle yüksek korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (10, 120, 134). Benzer olarak kateterden izole stafilokoklarda yapılan bir çalışmada *ica* gen bölgelerinin varlığı ile mikropakta biyofilm oluşturma oranları karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında %97,7 gibi yüksek bir korelasyon olduğu saptanmıştır (92).

152 stafilokok suşunda yapılan bir başka çalışmada modifiye Christensen yöntemi stafilokoklarda biyofilm oluşumunun saptanması için en hassas, doğru ve tekrarlanabilir konvansiyonel bir tarama yöntemi olarak tanımlanmıştır. Ayrıca biyomedikal cihaz ve malzemeler üzerindeki stafilokok yapışmasını incelemek için niceliksel bir model olma avantajına sahip olduğu belirtilmiştir (146).

Modifiye Christensen yöntemi ile oluşan biyofilm formasyonu kantitatif olarak değerlendirildiğinde *icaADBC* operonundaki gen bölgelerinden iki ve daha fazlasının birlikte pozitifliğinin mikropakta oluşan biyofilm yapısını anlamlı derecede kuvvetlendirdiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre *ica* gen bölgesi varlığıyla modifiye Christensen yöntemindeki biyofilm pozitifliği arasında anlamlı bir korelasyon mevcuttur ( $p < 0,05$ ). Çalışmamızda ayrıca tek bir *ica* gen bölgesi içeren suşların hiç *ica* gen bölgesi içermeyenlere göre anlamlı derecede kuvvetli biyofilm oluşturmalarının yanı sıra, iki ve daha fazla *ica* lokusu içeren suşların da yalnızca tek bir *ica* pozitifliği gösteren suşlara göre anlamlı derecede kuvvetli biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

10 tanesi sağlıklı erişkinden izole edilen toplam 91 stafilokok türünde yapılan bir biyofilm çalışmasında izolatlardaki *ica* gen bölgesi varlığı arttıkça biyofilm kalınlığının da arttığı görülmüştür (13). Dice ve arkadaşları biyofilm kantitasyonu ve *ica* gen bölgesi arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğunu, *ica* varlığının biyofilm birikim derecesini pozitif yönde etkilediğini; ancak bunun her zaman genel geçer bir kural olmadığını belirtmiştir (17).

Çalışmamızda pozitif *ica* gen sayısı ile biyofilm kalınlığı arasında pozitif bir korelasyon görülmesine rağmen her dört *ica* gen bölgesinin pozitif olduğu iki suş da orta derecede biyofilm oluşturmuştur. Ayrıca modifiye Christensen yönteminde kuvvetli pozitiflik veren 3 suşun da yalnızca *icaA* pozitifliği gösterdiği görülmüştür. Yapılan bazı yayınlar da *ica* gen pozitifliği daha fazla olan suşların *ica* negatif veya tek bir *ica* pozitif olan suşlara göre her zaman daha fazla biyofilm birikimi

oluşturmadığını göstermiştir (17, 94). Bu durumun temel sebebini anlamak için biyofilm oluşumunda *icaADBC* operonunun görevini bilmek gerekir.

Çalışmamızda her dört *ica* gen bölgesini içeren suşlarla yalnızca *icaA* ve *icaD* gen bölgelerini içeren suşlar arasında biyofilm yoğunluk derecesi açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Bunun sebebi stafilokoklarda biyofilm oluşumunda esas ve en iyi anlaşılmiş mekanizma olan *ica* bağımlı biyofilm oluşumunda *icaADBC* operonundaki *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin kilit önemidir (90, 120). *icaA* hücre - hücre adezyonunu sağlayan PIA sentezinden sorumlu olan N-asetilglukozamil transferaz enziminin sentezinde rol alırken *icaD* geni bu enzimin maksimal ekspresyonunu sağlar. *icaB* ve *icaC* ise deasetilasyon aşamasında rol oynayan ve biyofilm formasyonuna daha minimal etkileri olan genlerdir (91). *icaD*'nin *icaA* geni ile koekspresyonunun N-asetilglukozamin transferaz aktivitesinde belirgin derecede artışa yol açtığı ve buna bağlı olarak biyofilm oluşumunda artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (13, 93, 94).

Çalışmamızda her dört *ica* gen bölgesini içeren suşlarla yalnızca *icaA* ve *icaD* gen bölgelerini içeren suşlar arasında biyofilm yoğunluk derecesi açısından anlamlı bir fark olmamasının sebebinin hem yukarıda bahsedilen *ica* bağımlı biyofilm oluşum mekanizması sebebiyle hem de her dört gen bölgesinin pozitif olduğu yeterli sayıda suş bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda *ica* gen pozitifliği ile modifiye Christensen yöntemindeki biyofilm varlığı istatistiksel olarak uyumlu bulunsa da PZR'de herhangi bir *ica* gen bölgesi içerdiği tespit edilen suşların %18,3'ü modifiye Christensen yönteminde hiç biyofilm oluşturmamıştır. *in-vivo* koşullarda bu durum mikrobiyal adeziv matriks moleküllerinin varlığı ile açıklanabilse de *in-vitro* yöntemlerde mikrobiyal adeziv matriks moleküllerinin bu yüzeylere tutunması mümkün olmadığından bu durumu 'MSCRAMM'lar ile açıklamak söz konusu değildir. Stafilokoklarda PIA üretim paterninin araştırıldığı bir çalışmada *ica* geni bulundurduğu halde biyofilm oluşturmadığı gözlenen suşlarda *ica* gen bölgesindeki nokta mutasyona bağlı olarak PIA sentezinde negatif yönde bir düzenlenme meydana geldiği ve buna bağlı olarak biyofilm yapısının oluşamadığı gösterilmiştir (147).

*ica* regülasyonunda rol alan bir takım genler de *ica* pozitif olduğu halde biyofilm oluşturmayan suş varlığını açıklar. *ica* gen transkripsiyonunda aktivatör görevi olduğu bilinen majör regülatörlerden biri olan stafilokokkal aksesuar

regülatör proteini *sarA* biyofilm oluşumunun erken aşamalarında nükleolitik ve proteolitik ekstraselüler enzimleri baskılayarak tutunmayı, dolayısıyla biyofilm oluşumunu artırıcı etkiye sahiptir (16). *sarA*'yı kodlayan aynı isimli genin mutasyonunda *S. aureus*'larda biyofilm oluşturma yeteneğinin belirgin derecede düştüğü gösterilmiştir (87, 148).

Bir diğer çalışma 112 *S. aureus* suşuyla yapılmış ve değişen çevresel koşullara adaptasyon için *ica* gen kümesinin heterojen ekspresyonunun alternatif bir transkripsiyon faktörü olan *SigB* kontrolünde olduğu gösterilmiş, ayrıca belirli çevresel koşullarda *SigB* varlığının biyofilm oluşumunda rol oynayan temel faktörlerden biri olduğundan bahsedilmiştir (149). *SigB* operonu defektif *S. aureus* suşlarında erken dönem biyofilm oluşum basamaklarının gerçekleşmediği; dolayısıyla biyofilm oluşumunun baskılandığı gösterilmiştir (16, 138).

*S. aureus*'un virulans faktörleri ve yüzey proteinlerinin sekresyonunda düzenleyici rolü olan bir diğer faktör olan aksesuar gen regülatörü *agr*, *S. aureus*'a ait hemen hemen tüm toksinlerin; ayrıca proteaz, lipaz, nükleaz gibi ekzoenzimlerin sentezinde aktivatör görevi üstlenir. *agr* bu düzenlemeyi belli miktarda hücrenin bir arada olduğu biyofilm gibi yapılarda *quorum sensing* mekanizmasıyla gen ekspresyonunda değişiklikler yaparak sağlar (27, 150). *agr* aracılı proteaz indüksiyonunun biyofilm oluşumunu sınırlandırdığı ve oluşan biyofilm yapısının dağılmasına sebep olduğunu belirten birçok çalışma vardır (27, 148, 151). *agr* lokusunun ayrıca *in vitro* koşullarda genetik olarak labil olduğu bilinmektedir (150). Biyofilm tespitinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerde de *agr* aktivasyonu oluşmuş, böylece *ica* pozitif olduğu halde biyofilm oluşturmeyen suşlar meydana gelmiş olabilir.

Tüm bu faktörler; *ica* gen bölgesindeki nokta mutasyonlar, *sarA* ve *agr* genlerindeki genetik değişiklikler ve *SigB* gibi transkripsiyon faktörlerinin yokluğu çalışmamızdaki *ica* pozitif olduğu halde biyofilm oluşturmadığı gözlenen az sayıdaki suşun varlığını açıklamaktadır. Bu gibi değişkenlere bağlı olarak *ica* gen varlığı ile *in vitro* biyofilm oluşumu arasında her zaman uyum olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (15, 88, 152).

Konvansiyonel biyofilm tespit yöntemlerinden MTT yöntemi bir tetrazolium tuzu olan MTT'nin NADH ve NADPH bağımlı dehidrogenaz enzimleriyle suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenme düzeyinin kantitatif olarak



ölçüldüğü kolorimetrik bir yöntemdir. Bu renk değişimi metabolik aktivitenin, dolayısıyla biyofilmdeki canlı bakteri hücre varlığının bir göstergesidir (18, 121).

Tıpkı modifiye Christensen yöntemi gibi biyofilm kantitasyonu yapmaya olanak sağlayan MTT yönteminde biyofilm yapısını oluşturan polisakkarit, protein, DNA gibi ekstraselüler matriks gibi komponentler değil; direk MTT'yi indirgeme kapasitesine sahip enzimatik aktivitesi olan canlı hücre sayısı tespit edilebilir (99).

Çalışmamızda MTT yönteminde modifiye Christensen yönteminde olduğu gibi MRSA suşlarının biyofilm oluşturma oranı MSSA suşlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu sonuçlar PZR'de MRSA suşlarının MSSA suşlarına oranla istatistiksel olarak daha yüksek oranda *ica* gen bölgesi içermesiyle uyumlu bulunmuştur.

Herhangi bir *ica* gen bölgesi bulundurduğu bilinen 75 bakteriden 19'u (%25,3) MTT yönteminde biyofilm oluşturmazken, 56'sı (%74,7) çeşitli derecelerde biyofilm oluşturmuştur. Buna göre PZR'de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile MTT yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ). Bu sonuçlara göre MTT yöntemi moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda biyofilm varlığının tespiti açısından güvenilir bir yöntem olarak gözükmektedir.

Referans konvansiyonel yöntem olarak kullandığımız modifiye Christensen yöntemiyle karşılaştırıldığında modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan ise 12'sinin MTT yöntemine göre negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. Buna göre biyofilm varlığını tespit etme açısından iki yöntem arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $p = 0,035$ ). İki yöntem biyofilm kantitasyon derecelerine göre (zayıf, orta, kuvvetli) karşılaştırıldığında aralarındaki farkın daha da belirgin olduğu gözlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Literatürde her iki yöntemin biyofilm tespiti bakımından karşılaştırılmasının yapıldığı pek fazla çalışma bulunmamakla beraber, MTT ve modifiye Christensen yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada MTT yönteminin modifiye Christensen yöntemine göre daha az güvenilir bir yöntem olduğundan bahsedilmiştir (153).

MTT yönteminin modifiye Christensen yöntemiyle uyumsuzluğuna rağmen kullanılan her bir konvansiyonel yöntemin PZR'deki sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Tüm konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri PZR'de herhangi bir *ica* gen bölgesi pozitifliği altın standart kabul edilerek değerlendirildiğinde en duyarlı konvansiyonel biyofilm tespit yönteminin %84 ile

MTT yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Buna göre MTT yönteminin biyofilm varlığının tespiti açısından diğer konvansiyonel yöntemlere oranla yanlış negatif sonuç verme olasılığı daha düşük bulunmuştur.

Çeşitli bakterilere ait biyofilmlerde büyüyen mikrobik popülasyonların boyutunu değerlendirmek için MTT yönteminin başarılı olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (154, 155). Ayrıca bakteriyel popülasyonun büyüklüğünü belirlemede agar dilüsyon yöntemine göre daha hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğundan bahsedilmiştir (155).

Tüm bunların yanı sıra MTT yöntemi canlı bakteri sayısı hakkında fikir verdiğinden özellikle biyofilm inhibisyon deneyleri, değişen çevresel koşullar karşısında biyofilm dayanıklılığı ve çeşitli antibakteriyel ajanların planktonik ve sesil hücreler üzerindeki etkinliğini araştırmada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yapılan çalışmalar MTT ile çalışılan mikropoplaklardaki spektrofotometride ölçülen formazan konsantrasyonu ile bakteri koloni sayısı arasında mükemmel derecede uyum olduğu gösterilmiştir (99, 101).

Biyofilmin yapısındaki canlı bakterilerin sayısını belirlemede kullanılan bir diğer kolorimetrik yöntem BioTimer yöntemidir. Belirteç olarak fenol kırmızısı içeren BT-PR besiyeri kullanılır. Bakterinin fermentatif metabolizması sonucu belirtecin rengi kırmızıdan sarıya dönmektedir. Renk değişimi için geçen süre bakteri konsantrasyonu ile ilişkilidir (123).

Biyofilm kantitasyonu yapmaya yarayan modifiye Christensen, MTT, Calgary biyofilm cihazı gibi yöntemler biyofilm içerisindeki gerçek bakteri sayısını tespit etmede yetersizdir. İnokulum miktarındaki bakteri sayısındaki değişiklikler de biyofilm inhibisyon testlerinin sonuçlarını etkileyebilir (123).

BioTimer yöntemi, BT-PR ortamının renk değiştirme zamanı ile planktonik bakterilerin başlangıç konsantrasyonu arasındaki zamanı ilişkilendiren cins spesifik bir korelasyon çizgisi ile deney ortamındaki bakteri sayısını tespit etmektedir. Yaptığımız çalışmada MRSA suşlarının MSSA suşlarına göre hem daha erken sürede hem de daha yoğun biyofilm oluşturduğu gözlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar PZR'de MRSA suşlarının MSSA suşlarına oranla istatistiksel olarak daha yüksek oranda *ica* gen bölgesi içermesiyle uyumlu bulunmuştur.

PZR'de *ica* pozitifliği gösteren 75 suştan yalnızca 10 tanesi (%13,3) BioTimer yönteminde biyofilm oluşturmazken, 65 suş (%86,7) çeşitli derecede biyofilm

oluşturmuştur. Buna göre PZR'de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile BioTimer yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen suşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlara göre BioTimer yöntemi moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda biyofilm varlığının tespiti açısından güvenilir bir yöntem olarak gözükmektedir.

Referans konvansiyonel yöntem olarak kullandığımız modifiye Christensen yöntemi ile karşılaştırıldığında biyofilm varlığını tespit etme açısından iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ).

Yapılan çalışmalar da bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte olup BioTimer yöntemini biyofilm varlığını ve duyarlılığını ölçmek için kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem olarak tanımlamışlardır (123, 156).

BioTimer yönteminin bakterileri doğrudan biyofilm yapısının içinde sayan ilk yöntem olduğundan bahsedilmiştir. Üstelik tıpkı MTT yöntemi gibi biyofilm duyarlılığını birkaç saat içerisinde verebilme kapasitesine sahiptir; ancak bunu yapabilmek için test edilen her bakteri cinsine spesifik ayrı bir korelasyon çizgisi çizmek gerekir (121, 156).

Çalışmamızda PZR'de herhangi bir *ica* gen bölgesi pozitifliği altın standart kabul edilerek özgülük ve duyarlılıkları değerlendirilen konvansiyonel yöntemler içerisinde biyofilm tespiti için en özgül yöntem BioTimer yöntemi olarak bulunmuştur (%86,7). Direk biyofilm içerisindeki canlı hücreler tespit edildiğinden testin yanlış pozitiflik verme olasılığı çok düşüktür. Konvansiyonel yöntemlerin duyarlılığına bakıldığında ise modifiye Christensen yönteminden sonra en duyarlı ikinci yöntemin yine BioTimer yöntemi olduğu görülmüştür.

Calgary biyofilm cihazı ve BioTimer yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada BioTimer yönteminin Calgary biyofilm cihazına göre daha güvenilir bir yöntem olduğundan bahsedilmiştir (157). Biyofilm oluşturmuş bakterilerin sonikasyon gibi bir işlemle manüplasyona ihtiyaç duymaması, testin çalışılması için ayrıca gelişmiş teknolojik cihaz gereksinimi olmaması bu yöntemin avantajları arasında sayılabilir (156-158).

Yöntemin kullanım kısıtlılıklarından biri BT-PR besiyerinin inkübasyonu sırasında renk değişiminin gözlenebilmesi zorluğudur; ancak günümüzde testin eksiksiz otomasyonunu sağlayabilen bilgisayarlı sistemler geliştirilmiştir (156).

Yöntemin bir diğer kısıtlılığı biyofilm yapısındaki sesil bakterilerin planktonik formlarına göre farklı metabolik aktivite düzeyine sahip olmasıdır. Genellikle

biyofilm analizleri metabolik hızların benzer olduğu varsayımıyla aynı mikroorganizmanın planktonik kültürlerine karşı kalibre edilir; ancak bakterilerin metabolik hızlarının planktonik ve sesil formları arasında büyük farklılık gösterebileceğini gösteren yayınlar da mevcuttur (6, 98, 100). *S. aureus* suşlarının aktivitesinin rezasurin ile ölçüldüğü bir çalışmada planktonik formların aynı konsantrasyonlardaki sesil formlara göre daha fazla sinyal oluşturduğu görülmüştür. Bu durum planktonik formlara göre çizilen kalibrasyon eğrisinin sesil formlar için hatalı sonuçlar verebileceğini göstermektedir (159).

BioTimer yöntemi biyofilm inhibisyon testlerinde ve nano partiküllerin mikrobiyolojik kalitesinin tespitinde kullanılabilme özelliğine sahip; henüz referans kabul edilen bir yöntem olmasa bile sıvı veya katı fazdaki biyolojik ve abiyotik yüzeylere tutunarak biyofilm formasyonu oluşturmuş bakterileri saymada yararlı bir araç olarak düşünülme ve bir ‘‘biyosensör’’ olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde bu yöntem biyofilme karşı antibiyotik bakterisit konsantrasyonlarını belirlemekle kalmayıp antibiyotik tedavilerine dirençli bakteri sayısını da belirleyen ilk yöntemdir. BioTimer yöntemi bu yönüyle biyofilmin ortadan kaldırılmasında antibiyotik tedavisinin etkinliğini değerlendirmek için yararlı bir yöntem olabilir (8).

Son yıllarda BioTimer yönteminin nano malzemelerle kaplı yüzeylere yapışan bakterilerin kantitatif değerlendirmesinde güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Tıp sektöründe kullanılacak nano malzemelerin gelecekte sayısının artmasıyla birlikte mikrobiyolojik risk değerlendirmesinde BioTimer yönteminin daha aktif kullanılacağı öngörülmektedir (158).

Şimdilik bu yöntemin asıl dezavantajı güvenilirliği, verimliliği ve duyarlılığını referans yöntemlerle karşılaştırma imkânını kısıtlayan geçerli bir referans yöntemin eksikliğidir (158). Literatürde bizim çalışmamızdaki gibi diğer konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle BioTimer yönteminin uyumunu karşılaştıran yayın bulunmamaktadır.

Biyofilm kavramının tam olarak anlaşılmasından önce bakterilerdeki *slime* yapısının varlığını gösteren bir diğer yöntem ise Kongo Red Agar’dır. Besiyerinin içindeki kongo kırmızısı benzidin ve naftionik asitten meydana gelen bir sodyum tuzudur. Polisakkarit, selüloz, amiloid ve sialik asit gibi organik polimerlere afinite gösterir. Kongo kırmızısı bakterilerin ekzopolisakkarit yapısındaki *slime* faktörü ile birleşerek koyu bir renk oluşturur ve böylece bakterilerdeki *slime* oluşumunu

gösteren hızlı, duyarlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak tanımlanmıştır (11, 85, 114).

Çalışmalarda biyofilm ve *slime* kavramları birçok yerde birbirinin yerine kullansa da biyofilm tam tanım olarak *slime* yapısındaki matriks içine gömülü çok katlı hücre tabakası anlamına geldiğinden çalışmamızda CRA plağındaki fenotipik değişiklik biyofilm olarak değil *slime* yapısı olarak tanımlanmıştır (160).

CRA 24. saat değerlendirmesinde çalışmaya alınan 200 suştan 72 tanesinin (%36) koyu kırmızı veya kahverengi - siyah renkli koloniler oluşturduğu, yani *slime* faktör pozitif olduğu; 48. saat değerlendirmesinde ise 92 suşun (%46) suşun *slime* oluşturduğu görülmüştür. Yapılan yayınlar *S. aureus*'un CRA'da koagülaz negatif stafilokoklara göre daha yavaş *slime* ürettiğini göstermiştir (13). CRA karbonhidrat kaynağı olarak sükröz içerdiğinden ve *S. aureus* *slime* üretiminde diğer KNS türlerinden farklı daha fazla glukoz bağımlı bir metabolik yolak kullandığından çalışmamızda CRA testinde 48. saat okumaları esas alınmıştır.

Literatürdeki yayınlara paralel olarak bizim çalışmamızda da CRA 24 ve 48. saat okumaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0,001$ ). Yapılan yayınlar 48. saatten daha fazla inkübasyonun *slime* oluşumu üzerine bir etkisi olmadığını da göstermiştir (95).

MRSA ve MSSA suşları *slime* üretimi yönünden karşılaştırıldığında CRA yöntemine göre her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hatta MSSA suşlarının sayısal olarak MRSA suşlarına oranla daha fazla pozitiflik gösterdiği tespit edilmiştir (31'e karşın 41). MRSA ve MSSA suşlarının biyofilm oluşumunun çeşitli yöntemlerle karşılaştırıldığı bir çalışmada MRSA suşlarının CRA plağında MSSA suşlarına göre daha belirsiz ve karar vermesi güç koloniler oluşturduğundan bahsedilmiştir. MSSA suşlarının *slime* üreten türlerinin genellikle belirgin biçimde siyah koloni oluşturduğu, içlerinden yalnız %1 oranında bakterinin karar vermede güçlük yaşanacak koloniler oluşturduğundan bahsedilmiştir. MRSA kolonilerinin ise siyah, mor, kahverengi, bordo, koyu ve açık kırmızı gibi çeşitli renklerde koloniler oluşturduğu ve bu grupta *slime* oluşumu bakımından %13,9 gibi yüksek bir oranda çelişki bulunmuştur (11).

Yapılan başka çalışmalar CRA plakları değerlendirilirken yalnızca renge değil, koloni yapısına da bakılması gerektiğinden bahsetmiştir. Yalnızca renkle tam

olarak yorumlamanın doğru olmayacağı; özellikle yüzeyi pürüzlü kolonilerin *slime* pozitif olarak değerlendirilmesi gerektiğinden bahsedilmiştir (17, 85, 161).

CRA yönteminin subjektif değerlendirilme problemine rağmen PZR'de *ica* pozitifliği gösteren 75 suştan 20'si (%26,7) CRA'da *slime* negatif olarak tespit edilirken, 55 (%73,3) suşun *slime* ürettiği görülmüştür. Buna göre PZR'de *ica* gen pozitifliği saptanan suşlar ile CRA'da *slime* yapısı oluşturduğu gözlenen suşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Yapılan çok sayıda çalışma *ica* operon varlığıyla CRA'daki *slime* oluşumunun paralellüğünden bahsetmiştir (13, 17, 88, 95). Literatürde *ica* operonu bulundurduğu halde CRA'da *slime* oluşturmayan bakterilerin varlığını gösteren çalışmalar da mevcuttur; ancak bu çalışmalardaki fenotipik değişikliğin sebebi olarak daha önce yukarıda bahsedilen, *ica* gen regülasyonunda rol oynayan çeşitli gen ve mutasyonların varlığı gösterilmiştir (10, 160).

Modifiye Christensen yöntemiyle CRA'da *slime* oluşumu arasındaki uyum karşılaştırıldığında Modifiye Christensen yöntemine göre biyofilm negatif olduğu tespit edilen 117 suştan 35'i (%29,9) *slime* pozitif olarak yorumlanmış, biyofilm oluşturduğu gözlenen 83 suştan 26'sı (%31,3) CRA'da *slime* negatif olarak değerlendirilmiştir. Modifiye Christensen yöntemi ile CRA 48. saat değerlendirmelerinde gözlenen *slime* faktör pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Bu sonuç modifiye Christensen yöntemiyle CRA yönteminin karşılaştırıldığı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

MRSA ve MSSA suşlarından oluşan toplam 570 bakteriyle yapılan bir biyofilm çalışmasında her iki yöntem arasındaki uyumluluğun %96 civarında olduğu gösterilmiştir (11). Ortopedik protez kaynaklı lezyonlardan izole edilmiş 80 stafilokok suşuyla yapılan bir başka çalışmada CRA yöntemiyle modifiye Christensen yöntemi arasında %80'lik bir uyum olduğu görülmüştür (161).

Yapılan çalışmalar CRA yönteminin *slime* oluşumunun tespitinde kullanışlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olduğundan bahsetmiştir (11, 161). Özellikle biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tanısında fenotipik düzeyde doğru tanımlama yapabilen bir test olduğu gösterilmiştir (17, 93).

Tüm bu sonuçlar göze alındığında her ne kadar *slime* faktörü biyofilm kavramını tam olarak açıklamasa da moleküler yöntemlerle tanının mümkün olmadığı ve diğer çok basamaklı ve özel hazırlık gerektiren konvansiyonel yöntemlerin

kullanılmadığı durumlarda CRA yöntemi bakterilerdeki *slime* oluşumunu tespit etme bakımından kullanılabilir bir yöntem olarak gözükmektedir.

Kullanılan tüm konvansiyonel yöntemlerde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da az sayıda, *ica* negatif olduğu halde fenotipik olarak biyofilm veya *slime* oluşturduğu gözlenen suşlara rastlanmıştır. BioTimer ve CRA yöntemindeki subjektif yorumlama böyle bir sonuca neden olmuş olabilir; ancak daha muhtemel teori yine *ica* gen regülasyonu ile açıklanabilir.

*ArIRS* biyofilm oluşumu üzerinde negatif regülatuar etkinliği olan bir gen sistemidir. *ArIRS* mutasyonunda bakteri adezyonu ve PIA-PNSG üretiminin arttığı ve biyofilm oluşumunun pozitif yönde düzenlendiği gösterilmiştir. *ArIRS* mutant suşların *ica* bağımsız biyofilm oluşturabildikleri ve *ica* delesyonundan etkilenmedikleri bildirilmiştir (87, 162).

*ica* negatif olduğu halde CRA plağında *slime* pozitif olduğu gözlenen suşların tekrarlayan pasajlar sebebiyle üzerinde çikintılar olan kırmızı koloniler oluşturabildiğinden bahsedilmiştir (13). Bu şekilde farklı fenotipik görüntülerin yalnız bir *ica* gen bölgesi veya tüm *ica* lokusunun delesyonuna bağlı olabildiği de söylenmiştir (95)

*IS256* olarak bilinen 1332 baz çiftlik sekans elemanının varlığı da *ica* negatif olduğu halde fenotipik olarak biyofilm ürettiği gözlenen bakteri varlığını açıklar. *IS256* bakterilerin biyofilm ve *slime* oluşumunu düzenleyen mobil bir elemandır. Moleküler olarak nasıl düzenlendiği tam olarak bilinmemekle birlikte biyofilm oluşumunu etkileme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (14, 136). *IS256*'nın kromozomal yeniden düzenlenme ile *S. epidermidis*'deki biyofilm oluşumunu değiştirdiği gösterilmiş, stafilokok türlerinin genotipik ve fenotipik adaptasyonu, çevre koşullarına dayanıklılığı ve gen ekspresyonunda rol oynadığından bahsedilmiştir (143).

## 6. SONUÇ

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar günümüzde en önemli antibiyoterapi başarısızlığı ve tedavi maliyet artışı nedenlerinin başında gelmektedir. Yapılan çalışmalar tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inin biyofilm kaynaklı olduğunu, bu oranın nozokomiyal enfeksiyonlarda çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (5). Cerrahi girişimlerin, immünsüprese hastaların ve kullanılan implant sayısının giderek arttığı göz önünde bulundurulursa özellikle hospitalize hastaların kültür örneklerinde kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak tespit edilen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelini belirlemek ve bu bakterilerin girişimsel prosedürlerden önce planktonik formlarını elimine edici girişimlerde bulunmak biyofilm kaynaklı enfeksiyon sayısını, dolayısıyla buna bağlı morbidite ve mortalite oranlarını düşürecek sonuçlara varılmıştır.

Çalışmamızda ayrıca MRSA gibi virulan suşların daha az virulan suşlara oranla anlamlı derecede yüksek oranda biyofilm oluşturma potansiyeli olduğu, antibiyotik direnciyle biyofilm oluşumu ilişkisinin bir kaskat gibi birbirleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir.

Bu etkenler göz önünde bulundurulduğunda biyofilm varlığının tespiti hastalık prognozunu öngörmekte son derece önemli görülmektedir. Bu nedenle biyofilm varlığının tespitinde kolay uygulanabilir, tekrar edilebilir ve güvenilir bir yöntemin rutin laboratuvar hizmetlerine adapte edilebilmesi gereklidir. Çalışmamızda biyofilm varlığının tespitinde kullanılan tüm konvansiyonel yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri biyofilm oluşumunu gösterme ve biyofilm kaynaklı enfeksiyon tanısı koymada klinik olarak kullanılabilir düzeyde bulunmuştur.

Modifiye Christensen ve MTT yöntemlerinin ayrıca biyofilm kantitasyonu hakkında da bilgi vermesi ek bir avantaj olmakla beraber nispeten zahmetli yöntemler olması, mikroplak kontaminasyon riski ve her çalışmada sınır değer hesaplanması gibi zorlukları mevcuttur.

Biyofilm varlığının tespitinde en özgül konvansiyonel yöntem olan BioTimer yöntemi biyofilm yapısı içerisindeki bakteri sayısını vermesiyle adeta bir biyosensör görevi yapar; ancak her bakteri türü için spesifik korelasyon eğrisinin çizilmesi, renk değişiminin gözlenmesindeki zorluklar ve kontaminasyon riski yöntemin kısıtlılığı olarak belirtilebilir.



Uygulanması en kolay ve pratik yöntem gibi gözüken CRA yönteminde ise özellikle *S. aureus* türlerinde en az iki gün inkübasyona ihtiyaç duyulması, MRSA gibi yüksek virulan suşların belirsiz sonuçlar verebilmesi ve nispeten subjektif yorumlanabilme özelliği gibi kısıtlılıkları mevcuttur.

*ica* gen bölgelerinin araştırılması virulan - nonvirulan suşların belirlenmesinde tek başına bile önemli bir belirteçtir. Klinik izolatların saprofitik stafilokok suşlarına göre çok daha yüksek oranda *ica* gen bölgesi içerdiği ve *ica* varlığının tek başına bile bir virulans göstergesi olduğundan bahsedilmiştir (95, 120). Gerek CRA'daki *slime* oluşumu, gerek mikroplaklardaki biyofilm formasyonu *in vitro* koşullara son derece duyarlıdır. Hem bu gerekçeyle, hem de *S. aureus*'lardaki *ica* bağımsız biyofilm oluşum mekanizmalarının varlığı nedeniyle biyofilm varlığını ortaya koyarken genotipik ve fenotipik yöntemlerin bir arada kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Klinik *S. aureus* izolatlarındaki *ica* gen bölgesinin tespiti tedavi seçenekleri ve korunma önlemleri için alınan klinik kararlara yön verebilir. Ayrıca *ica* lokusundaki her bir gen bölgesinin işlevini, klinik önemini ve bulunma sıklığını bilmek tıbbi ekipmanları kolonize eden ve çeşitli biyofilm kaynaklı enfeksiyonlara yol açan bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini destekleyecektir.

*ica* gibi adezyon genlerinin varlığı ve ifadenmesine yönelik çalışmaların tıbbi cihaz ve yabancı cisim ilişkili enfeksiyonların patogeneziindeki farklı tutunma mekanizmalarının da önemini açığa çıkaracağına inanıyoruz.

## 6. KAYNAKLAR

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 28(3): 603-61, 2015.
2. Sudağidan M, Cavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Investigation of the virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from biomaterial surfaces. Mikrobiyol Bul 42(1): 29-39, 2008.
3. Naber CK. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. Clin Infect Dis 15;48 Suppl 4: 231-7, 2009.
4. Ay S, Tekerekoğlu MS, Bayraktar M, Abut L, Duman B. Klinik örneklerden izole edilen koagülaz negatif stafilokok türlerinde “slime” oluşumu ve antibakteriyellere duyarlılığı. ANKEM Derg 16(1): 40-3, 2002.
5. Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 39: 82-8, 2008.
6. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 15: 167-93, 2002.
7. Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. Wound Repair Regen 17(3): 354-9, 2009.
8. Welch K, Cai Y, Strømme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. J Funct Biomater 3(2): 418-31, 2012.
9. Seo YS, Lee DY, Rayamahji N, Kang ML, Yoo HS. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. Res Vet Sci 85(3): 433-8, 2008.
10. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, Ali AM, Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Seng JSC, Nathan JJ, Pei Pei C. Prevalence of Adhesion and Regulation of Biofilm-Related Genes in Different Clones of *Staphylococcus aureus*. J Biomed Biotechnol 2012: 976972, 2012.
11. Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. FEMS Immunol Med Microbiol 50(3): 375-9, 2007.
12. Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Folia Microbiol (Praha) 58(1):47-52, 2013.
13. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 39: 2151-6, 2001.
14. Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with Staphylococcal device-related infections. BMC Infect Dis 10: 68, 2010.
15. Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus*

- aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* 189(3): 127-31, 2001.
16. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2(5): 445-59, 2011.
  17. Dice B, Stoodley P, Buchinsky F, Metha N, Ehrlich GD, Hu FZ. Biofilm formation by *ica*-positive and *ica*-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *Biofouling* 25(4): 367-75, 2009.
  18. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72(2): 157-65, 2008.
  19. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 25(1): 31-42, 2013.
  20. Bilgehan H. Bölüm 31: Gram Olumlu Koklar. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 4. Baskı. İzmir, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 495-523, 2004.
  21. Garrity G, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the road map to the manual*. New York, Bergey's Manual Trust, 2000.
  22. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Bölüm 12: Gram-Pozitif Koklar. Kısım I: Stafilkoklar ve İlişkili Gram-Pozitif Koklar. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı* (Başustaoğlu AC, Us AD, ed). 7. Baskı. Ankara, Hipokrat Yayınevi, 670-732, 2017.
  23. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically, (Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, ed): *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Ed, Washington D.C.: ASM Press, 384-404, 2003.
  24. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed). 6th Edition. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2321-51, 2005.
  25. Murray PR. Kısım II Bakteriler: Aerobik Gram-Pozitif Koklar. *Temel Tıbbi Mikrobiyoloji*. (Us AD, Başustaoğlu AC ed). 1. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 13-5, 2018.
  26. Sancak B. *Staphylococcus*. *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*. (Özkuyumcu C, ed). 1. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 43-50, 2009.
  27. Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator *agr* in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* 79(5): 1927-35, 2011.
  28. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J Clin Microbiol* 48(1): 192-201, 2010.
  29. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3): 965-74, 2012.

30. Novick RP. The *staphylococcus* as a molecular genetic system. Molecular biology of the staphylococci (Novick RP, ed). New York, VCH, 1-37, 1990.
31. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 13(3): 222-35, 2007.
32. Şardan YÇ. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane İnfek Derg 4: 205-7, 2000.
33. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections . N Engl J Med 339: 520-32, 1998.
34. Yaman G, Çıkman A, Berktaş M, Parlak M, Güdücüoğlu H, Karahocagil MK. Hastane kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarında mlsb, fusidik asit ve diğer antibiyotiklere direnç. ANKEM Derg 24(3): 130-5, 2010.
35. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. Manual of Clinical Microbiology. (Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, ed). 8th Edition. Washington DC, ASM, 1074-101, 2003.
36. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1670-3, 1997.
37. Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. J Clin Microbiol 38: 3879-81, 2000.
38. McManus J. Vancomycin resistant *staphylococcus* reported in Hong Kong. BMJ 318(7184): 626, 1999.
39. Ploy M, Grelaud C, Martin C, de Lumney L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 351(9110): 1212, 1998.
40. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 340(7): 493-501, 1999.
41. Gould IM. VRSA - doomsday superbug or damp squib? Lancet Infect Dis 10(12): 816-8, 2010.
42. Rudkin JK, Laabei M, Edwards AM, Joo HS, Otto M, Lennon KL, O'Gara JP, Waterfield NR, Massey RC. Oxacillin alters the toxin expression profile of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 58(2): 1100-7, 2014.
43. Sancak B. MRSA direnç mekanizmaları: dünyada ve Türkiye'de epidemiyolojisi. ANKEM Derg 26(2): 38-47, 2012.
44. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 46:(1): 8-20, 2006.
45. Santiago C, Lim KH, Loh HS, Ting KN. Inhibitory effect of *Duabanga grandiflora* on MRSA biofilm formation via prevention of cell-surface attachment and PBP2a production. Molecules 20(3): 4473-82, 2015.
46. Peacock SJ. *Staphylococcus*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. (Borriello SP, Murray PR, Funke G ed). 10th Edition. Hodder Arnold, London, United Kingdom, 771-832, 2005.
47. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10(4): 781-91, 1997.

48. Hortaç E, Evren E, Altunay F, Kuyucu U, Ergen O. *Staphylococcus aureus* izolatlarında metisilin direncinin disk difüzyon, kromojenik besiyeri, gradient difüzyon testi ve oksasilin agar tarama yöntemleriyle araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(1): 40-6, 2016.
49. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 55(3): 379-82, 2005.
50. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed., M100, 2018. CLSI, Wayne, PA.
51. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.
52. Swenson JM, Tenover FC; Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 43(8): 3818-23, 2005.
53. Özel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Çağatay M, Sencan I, Mert A. Comparison of oxacillin, cefoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disk diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci. Mikrobiyol Bul 45(2): 258-65, 2011.
54. Pourmand MR, Hassanzadeh S, Mashhadi R, Askari E. Comparison of four diagnostic methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iran J Microbiol 6(5): 341-4, 2014.
55. Ögünç D, Çolak D, Saygan MB, Öngüt G, Saygan S, Gültekin M. *Staphylococcus aureus* suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E test, sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. ANKEM Derg 15(1): 84-7, 2001.
56. Bethel CD, Boonlayangoor S (Çiftçi U, çev). Oksasilin (Metisilin) Dirençli *Staphylococcus aureus*'ların Belirlenmesinde Oksasilin Tuz - Agar Testi. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı (Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, ed). Üçüncü Baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık. Cilt 2, 5.3.1, 2014.
57. Demir T, Coplu N, Esen B. Comparative analysis of phenotypic and genotypic detection of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus*. Indian J Pathol Microbiol 59(3): 314-7, 2016.
58. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol 27(1): 27-9, 2009.
59. Alipour F, Ahmadi M, Javadi S. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Infect Public Health 7(3): 186-91, 2014.
60. Paule SM, Mehta M, Hacek DM, Gonzalzes TM, Robicsek A, Peterson LR. Chromogenic media vs Real-time PCR for nasal surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* impact on detection of MRSA-positive persons. Am J Clin Pathol 131(4): 532-9, 2009.
61. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley AL, Nicholson A, Gould FK. Development and evaluation of chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 42(10): 4519-23, 2004.
62. Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Aygün Z, Karakoç E, Kınıklı S, Demiröz AP. Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA

- agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul 44(2): 279-84, 2010.
63. Vural A, Afşar İ, Kurultay N, Demirci M. *Staphylococcus aureus*'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması. ANKEM Derg 25(3): 145-9, 2011.
  64. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing method and analysis of *mecA*-positive susceptible strain, J Clin Microbiol 39(11): 3946-51, 2001.
  65. Roisin S, Nonhoff C, Denis O, Struelens M. Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. J Clin Microbiol 46(8): 2525-8, 2008.
  66. Atay T, Gulay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. ANKEM Derg 18(4): 205-8, 2004.
  67. Skulnick M, Simor AE, Gregson D, Patel M, Small GW, Kreiswirth B, Hathoway D, Low DE: Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 30(8): 1985-8, 1992.
  68. Junkins AD, Lockhart SR, Heilmann KP, Dohrn CL, Von Stein DL, Winokur PL, Doern GV, Richter SS. BD Phoenix and Vitek 2 detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. J Clin Microbiol 47(9): 2879- 82, 2009.
  69. Açıkgöz ZC. Biyofilms. Mikrobiyol Bul 31: 299-310, 1997.
  70. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect 64(4): 313-25, 2006.
  71. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol 75: 499-511, 1993.
  72. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. Eye 9: 102-9, 1995.
  73. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 12(3): 185-90, 2004.
  74. Qu, Y. Biofilm formation and antimicrobial resistance of coagulase-negative Staphylococci isolated from neonatal intensive care units. RMIT University School of Applied Sciences, Doctor of Philosophy (PhD) Thesis, Melbourne, 2010.
  75. Roosjen A, Norde W, van der Mei HC, Busscher HJ. The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation. Progr Colloid Polym Sci 132: 138–44, 2006.
  76. Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. Methods Enzymol 310:523-34, 1999.
  77. Pereni CI, Zhao Q, Liu Y, Abel E. Surface free energy effect on bacterial retention. Colloids Surf B Biointerfaces 48(2): 143-7, 2006.
  78. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Front Cell Infect Microbiol 28(5): 1-9, 2015.

79. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 60(6): 1842–51, 1994
80. Assanta MA, Roy D, Montpetit D. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after different contact times. *J Food Prot* 61(10): 1321-9, 1998.
81. Da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Athayde AJAA, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 25(2): 469-75, 2012.
82. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-45, 1995.
83. Hortaç E, Kaleli G, Çökeliler D, Yavuzdemir Ş, Mutlu M, Demirbilek Ekici M, Göçmen JS. GSBL pozitif üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının plazma polimerizasyon tekniği ve nanomalzemeler ile modifiye edilmiş (mikroplak) yüzeylerde biyofilm oluşumunun incelenmesi: deneysel model. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 45(4):181-7, 2015.
84. Karchmer TB, Giannetta ET, Muto CA, Strain BA, Farr BM. A randomized crossover study of silver-coated urinary catheters in hospitalized patients. *Arch Intern Med* 160(21): 3294-8, 2000.
85. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 76(1): 88-92, 2009.
86. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol* 41(9): 4465-7, 2003.
87. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS. Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus sarA* mutants. *PLoS One* 3(10): e3361, 2008.
88. Cramton SE, Gerke Ch, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427–33, 1999.
89. Giornezis N, Kolonitsiou F, Makri A, Vogiatzi A, Christofidou M, Anastassiou ED, Spiliopoulou I. Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(4): 773-8, 2015.
90. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43(6): 1367-78, 2002.
91. Yüksekdağ ZN, Baltacı N. *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 43(3): 77-83, 2013.
92. Oufriid S, Ghazlane Z, Jamali L, El Otmani F, Talmi M, Elmdaghri N, Zerouali K, Timinouni M. Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter-related infections. *J Infect Dev Ctries* 9(4): 368-72, 2015.
93. Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health* 15(2): 87-90, 2007.

94. O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 270(2): 179-88, 2007.
95. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol 92(1-2): 179-85, 2003.
96. Allison DG. The biofilm matrix. Biofouling 19(2): 139-50, 2003.
97. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147(1): 3-9, 2001.
98. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 37(6):1771-6, 1999.
99. Traba C, Liang JF. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. Biofouling 27(7): 763-72, 2011.
100. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 9(1): 34-9, 2001.
101. Kharidia R, Liang JF. The activity of a small lytic peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* biofilms. J Microbiol 49(4): 663-8, 2011.
102. Choong SK, Wood S, Whitfield HN. A model to quantify encrustation on ureteric stents, urethral catheters and polymers intended for urological use. BJU Int 86(4): 414-21, 2000.
103. Halton KA, Cook DA, Whitby M, Paterson DL, Graves N. Cost effectiveness of antimicrobial catheters in the intensive care unit: addressing uncertainty in the decision. Crit Care 13(2): R35, 2009.
104. Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Mimos O. Prevention of central venous catheter-related infection in the intensive care unit. Crit Care 14(2): 212-7, 2010.
105. Ramritu P, Halton K, Collignon P, Cook D, Fraenkel D, Battistutta D, Whitby M, Graves N. A systematic review comparing the relative effectiveness of antimicrobial-coated catheters in intensive care units. Am J Infect Control 36(2): 104-17, 2008.
106. Göçmen JS, Hortaç İstar E, Çökeliler D, Mutlu M, Kaleli Can G, Alparslan S, Çetin C, Kartal N, Özçelik UC, Aycan Ç. Kan ve el kültüründen izole edilen koagülaz-negatif stafilokok izolatlarının biyofilm oluşumunun plazma polimerizasyon tekniği ile kaplanmış mikroplaklarda incelenmesi: deneysel model. Flora 22(4): 166-74, 2017.
107. Guenther F, Stroh P, Wagner C, Obst U, Hänsch GM. Phagocytosis of staphylococci biofilms by polymorphonuclear neutrophils: *S. aureus* and *S. epidermidis* differ with regard to their susceptibility towards the host defense. Int J Artif Organs 32(9): 565-73, 2009.
108. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64(4): 847-67, 2000.
109. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. Int J Medical Microbiol 296(2-3): 133-9, 2006.
110. Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int J Med Microbiol 296(2-3): 149-61, 2006.
111. Saraçlı MA. Quorum sensing: Mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? Gulhane Med J 48(4): 244-50, 2006.
112. Lyon GJ, Novick RP. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. Peptides 25(9): 1389-403, 2004.



113. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22(6): 996-1006, 1985.
114. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42(8): 872-4, 1989.
115. York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. (Güney M, çev). Katalaz Testi. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı (Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, ed). Üçüncü Baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık. Cilt 1, 3.17.10.1 - 3.17.10.2, 2014.
116. York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. (İrvem A, Yenice S, çev.) Koagülaz Testi. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı (Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, ed). Üçüncü Baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık. Cilt 1, 3.17.13.1 - 3.17.14.3, 2014.
117. Munro S. (Çöplü N, çev). Disk Difüzyon Testi. Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı (Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, ed). Üçüncü Baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık. Cilt 2, 5.1.1 - 5.1.15, 2014.
118. Stepanović S, Vuković D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40(2): 175-9, 2000.
119. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115(8): 891-9, 2007.
120. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 3(5): 342-51, 2009.
121. Saising J, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP, Nega M, Götz F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 56(11): 5804-10, 2012.
122. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 57(8): 1018-23, 2008.
123. Pantenella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* 75(3): 478-84, 2008.
124. Güven N, Kaynak Onurdağ F. İlaç, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 48(1): 94-105, 2014.
125. Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Nathwani D. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *Int J Antimicrob Agents* 22(4): 406-19, 2003.
126. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 57(1): 7-13, 2007.

127. Ho PL, Chuang SK, Choi YF, Lee RA, Lit ACH, Ng TK, Que TL, Shek KC, Tong HK, Tse CWS, Tung WK, Yung RWH. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61(3): 245-50, 2008.
128. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Talan DA; EMERGENCY ID Net Study Group. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 355(7): 666-74, 2006.
129. Gündem NS, Çıkman A. Yara kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 26(4): 165-70, 2012.
130. Çetin E, Kaya S, Tas T, Arıdoğan B, Demirci M. Cerrahi alan infeksiyonlarında mikroorganizma profili ve antibiyotik duyarlılık durumu. *ANKEM Derg* 20(2): 89-93, 2006.
131. Adaleti R, Nakipoğlu Y, Tasdemir C, Kaya F, Ceran N, Tasdemir S. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında makrolid-linkozamid-streptogramin D, ketolid ve linezolid direncinin araştırılması. *Flora* 13(4): 189-93, 2008.
132. Orucu M, Geyik MF. Yoğun bakım ünitesinde sık görülen enfeksiyonlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 1(1): 40-3, 2008.
133. Salgado D, Karchmer T, Farr B. Prevention of catheter associated urinary tract infections. *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. (Wenzel R, ed). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 297-311, 2003.
134. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 191(2): 101-6, 2002.
135. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 3(3): 225-31, 2006.
136. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, Park Y, Lim Y. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 32(1): 68-72, 2008.
137. Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 357(9249): 40-1, 2001.
138. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12): 3357-63, 2000.
139. Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL, Xia PY. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(6): 2707-11, 2010.
140. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O'Gara JP. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog* 8(4): e1002626, 2012.
141. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43(4): 1973-6, 2005.

142. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson D, O'Gara JP. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45(5): 1379–88, 2007.
143. Us E, Tekeli A, Dolapçı İ, Karahan ZC, Sancak B, Haşçelik G. Çeşitli klinik enfeksiyonlardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında insersiyon sekansı IS256'nın biofilm oluşumu üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 62(2): 53-7, 2009.
144. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 79(3): 1153-65, 2011.
145. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* 38(2): 877–80, 2000.
146. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 24(1): 25-9, 2006.
147. Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 69(6): 4079-85, 2001
148. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 71(7): 4206-11, 2003.
149. Kim JH, Kim CH, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, Cho SH. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J Microbiol Biotechnol* 18(1): 28-34, 2008.
150. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsis B, Novick RP. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154(8): 2265-74, 2008.
151. Boles BR, Horswill AR. *agr*-Mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 4(4): e1000052, 2008.
152. Růžicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R, Horvát R, Heroldová M, Woznicová V. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 49(5): 596-600, 2004.
153. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, Cierpień T, Łyżwa P, Kiełbasiński P, Jaromin A, Flis A, Chilmonczyk Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS One* 11(5): e0155772, 2016.
154. Cady NC, McKean KA, Behnke J, Kubec R, Mosier AP, Kasper SH, Burz DS, Musah RA. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One* 7(6): e38492, 2012.
155. Trafny EA, Lewandowski R, Zawistowska-Marciniak I, Stępińska M. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World J Microbiol Biotechnol* 29(9): 1635-43, 2013.
156. Berlutti F, Rosso F, Bosso P, Giansanti F, Ajello M, De Rosa A, Farina E, Antonini G, Valenti P. Quantitative evaluation of bacteria adherent to

- polyelectrolyte HEMA-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 67(1): 18-25, 2003.
157. Kaynak Onurdağ F, Ozgen S, Abbasoğlu U, Gürcan IS. Comparison of two different methods for the investigation of in vitro susceptibilities of planktonic and biofilm forming *Candida* species to antifungal agents. *Mikrobiyol Bul* 44(4): 619-31, 2010.
  158. De Giusti M, Berlutti F, Pantanella F, Marinelli L, Frioni A, Natalizi T, Tufi D, Valenti P. A New Biosensor to Enumerate Bacteria in Planktonic and Biofilm Lifestyle. *Biosensors-Emerging Materials and Applications*, (Serra AP, ed.), InTech, 2011.
  159. Sandberg ME, Schellmann D, Brunhofer G, Erker T, Busygin I, Leino R, Vuorela PM, Fallarero A. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* 78(1): 104-6, 2009.
  160. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 103(3-4): 241-7, 2004.
  161. Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, Montanaro L. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res A* 76(2): 425-30, 2006.
  162. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J Bacteriol* 187(15): 5318-29, 2005.