

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA BİYOFİLM  
ÜRETİMİ, BİYOFİLM POZİTİF VE NEGATİF SUŞLARIN  
GENOTİPİK VE FENOTİPİK KARAKTERLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. RASİM ŞAHİN

DENİZLİ 2007

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.İlknur KALELİ

Üye : Doç.Dr.Çağrı ERGİN

Üye : Yrd.Doç.Mustafa ŞENGÜL

Üye : Yrd.Doç.Dr.Ergun METE

Üye : Yrd.Doç.Dr.Suzan SAÇAR

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

29.05/2007

Prof. Dr. F.Neçdet ARDIÇ  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Dekan V.

## TEŐEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında geçirdiğim yaklaşık 4,5 yıllık asistanlığım süresince desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı ve tez danıŐmanını hocam sayın Prof. Dr. İlknur Kaleli'ye,

Asistanlığım boyunca her konuyu danıŐabildiđim, bilgilerini aldığım ve tüm sıkıntılarımı paylaŐabildiđim sayın hocalarım Doç. Dr. Çağrı Ergin, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Şengül, Yrd. Doç. Dr. Melek Demir, Yrd. Doç. Dr. Nural Cevahir, Yrd. Doç. Dr. Ergun Mete ve tez çalıŐmalarımnda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ergin ve Doç. Dr. Süleyman Demir'e,

Birlikte gülüp, birlikte hüzünlendiğim arkadaşlarım Dr. Umut Yıldırım, Dr. Melahat Gürbüz, Dr. Soner TikveŐli, Dr. Sevgi Hancı, Dr. Cansev Yılmaz, Dr. Habibe Övet, Dr. Ebru Çevik, Dr. Yusuf Polat, Dr. Sual Öztürk, Dr. Özgün KiriŐ SatılmıŐ, Dr. Yüksel Akkaya ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Uyum içerisinde görev yaptığım arkadaşlarım Nilgün Arıkan, Nesrin BuluŐ, Musa Arıkan, İbrahim Çırnaz, Kubilay Taylan, Yasemin Őanal, Hikmet Dağ, Zahide ÇoŐkun ve laboratuvarında görev yapan diğer arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda bulunan ve destek olan eŐim Seval'e ve aileme, tüm sıkıntılarımı unutturan çocuklarıma teŐekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

I-GİRİŞ	1
II-GENEL BİLGİLER	3
2.1. GÖRÜNÜM VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ	3
2.2. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ	4
2.3. GENOM YAPISI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ	5
2.4. HÜCRE DUVARI	6
2.5.KAPSÜL	6
2.6. STAFİLOKOKLARIN YÜZEY PROTEİN ADEZİNLERİ	6
2.7. TOKSİNLER	8
2.7.1. Sitolitik Toksinler	8
Alfa Toksin	8
Beta Toksin	8
Gama Toksin	8
Delta Toksin	8
Non Hemolitik Lökosidin (panton-valentine lökosidin)	8
2.7.2. Enterotoksinler	9
2.7.3. Epidermolitik Toksin ( Eksfoliyatif Toksin )	9
2.7.4. Toksik şok sendromu Toksini-1 ( TSST-1)	9
2.7.5. Pirojenik toksin	10
2.8. ENZİMLER	10
2.8.1. Beta-laktamaz	10
2.8.2. Koagulaz	10
2.8.3. Hyaluridaz	11
2.8.4. Deoksiribonükleaz	11
2.8.5. Stafilokinaz	11
2.8.6. Lipaz	11

2.8.7. Üreaz	11
2.8.8. Proteaz	11
2.9. BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ	12
2.10. BİYOFİLMİN YAPISI	14
2.11. BİYOFİLM OLUŞUM EVRELERİ	15
2.12. BİYOFİLM MİKROORGANİZMA İLİŞKİSİ	17
2.13. BİYOFİLM HASTALIK İLİŞKİSİ	19
2.14. QUORUM – SENSİNG MEKANİZMALARI	20
2.15. BİYOFİLM ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ	21
2.16. <i>S.aureus</i> ve BİYOFİLM	21
III-GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI	24
3.1.1.Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	24
3.1.2. Mikrotitrasyon plağı yöntemi (kantitatif yöntem)	25
3.2. BİYOFİLM OLUŞUMUNDAN SORUMLU TUTULAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI	25
3.3. POLİSAKKARİT İNTERSELLÜLER ADEZİNLERİN ARAŞTIRILMASI	28
3.4.ÇALIŞILAN ANTİBİYOTİKLERİN BİYOFİLM OLUŞTURMUŞ BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİLERİ	28
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	30
IV-BULGULAR	31
4.1. BİYOFİLM ÜRETİMİ	31
4.2. BİYOFİLM OLUŞUMUNDAN SORUMLU TUTULAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI	35
4.3. POLİSAKKARİT İNTERSELLÜLER ADEZİN (PIA/PNAG) ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI	41
4.4. ÇALIŞILAN ANTİBİYOTİKLERİN (VANKOMİSİN,	

LİNEZOLİD, DALFOPRİSTİN, QUİNUPRİSTİN VE DALFOPRİSTİN/QUİNUPRİSTİN) BİYOFİLM OLUŞTURMUŞ S.AUREUS ŞUŞLARINA ETKİLERİ	42
V-TARTIŞMA	45
VI-SONUÇLAR	65
VII-ÖZET	67
VIII-SUMMARY	69
IX-KAYNAKLAR	71

## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Tablo-1: Çalışmada kullanılan primerler.	27
Tablo-2: Örneğin izole edildiği yere göre Kongo kırmızılı besiyerinde biyofilm pozitif ve negatif örneklerin sayıları ve yüzdeleri	32
Tablo-3: Örneklerin izole edildiği yer dikkate alındığında, mikropleyt yöntemi kullanılarak kontrol suşların absorban ölçümlerine göre biyofilm negatif, orta derece ve güçlü pozitif örneklerin sayıları ve yüzdeleri.	33
Tablo-4: Biyofilm üreten suşların belirlenmesinde Kongo kırmızılı besiyeri ile mikropleyt yönteminin karşılaştırılması.	34
Tablo-5: Biyofilm üretimi (Kongo kırmızılı besiyerinde) ile ica genlerinin ilişkisi.	36
Tablo-6: Biyofilm üretimi (Mikropleyt yönteminde) ile ica genlerinin ilişkisi.	37
Tablo-7: Biyofilm üretimi ile ica genleri arasındaki ilişki.	37
Tablo-8: Biyofilm üretimi ile ica genleri arasındaki ilişki.	38
Tablo-9: Örneklerin izole edildiği bölgelere İcaA ve icaD genlerinin oranları.	41
Tablo-10: Çalışılan standart ve klinik izolatların MİK ve BMİK değerleri.	43
Tablo-11: Çalışılan standart ve klinik izolatların MİK ve MBEK değerleri.	44

## ŞEKİLLER VE RESİMLER ÇİZELGESİ

Şekil-1: Tanımlama şeması	4
Şekil 2: S.aureus'un yüzey virulans faktörleri	7
Şekil 3: Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli	17
Şekil 4: S.aureus'ta icaADBC genleri ve PIA/PNAG biyosentezi	22
Şekil 5: S.aureus bap geni	23
Şekil 6: Biyofilm oluşumunun Kongo Kırmızılı Agar yöntemi ile Değerlendirilmesi	31
Şekil 7: Biyofilm oluşumunun mikropleyt yöntemiyle değerlendirilmesi.	32
Şekil 8: icaA (1315 bp) ve icaD (381 bp) geni araştırması	35
Şekil 9: Bap (971 bp) geni araştırması	39
Şekil 10: Bap (971 bp) geni araştırması	39
Şekil 11: icaA , icaD ve bap geni araştırması	40
Şekil 12: PIA/PNAG varlığının kemilümünesans dot-blott yöntemle gösterilmesi.	41
Şekil 13: PIA/PNAG varlığının kemilümünesans dot-blott yöntemle gösterilmesi.	42



## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>EPS</b>	:Ekstrasellüler polisakkaritler
<b>DİK</b>	:Disemine İnvasküler Koagülopati
<b>MSCRAMM</b>	:Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
<b>KNS</b>	:Koagülaz Negatif Stafilokoklar
<b>CifA</b>	:Clumping factor A
<b>CifB</b>	:Clumping factor B
<b>FnbA</b>	:Fibronectin binding protein A
<b>FnbB</b>	:Fibronectin binding B
<b>Bbp</b>	:Bone sialoprotein-binding protein
<b>Fib</b>	:Fibrinogen binding protein
<b>Cna</b>	:Collagen binding protein
<b>EbpS</b>	:Elastin binding protein
<b>Eno</b>	:Laminin binding protein
<b>TSST-1</b>	:Toksik şok sendromu Toksini-1
<b>QS</b>	:Quorum - sensing
<b>PIA</b>	:Polysaccharide intercellular adhesin
<b>PNAG</b>	:Poly-N-acetyl-beta-1-6-glucosamine
<b>İca</b>	:Intercellular adhesion
<b>Bap</b>	:Biofilm associated protein
<b>PZR</b>	:Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>TSB</b>	:Triptik soy broth
<b>PBS</b>	:Phosphate buffer saline
<b>MİK</b>	:Minimum inhibitör konsantrasyon

<b>MBK</b>	:Minumum bakterisidal konsantrasyon
<b>BMİK</b>	:Biyofilm minimum inhibitör konsantrasyon
<b>MBEK</b>	:Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyon
<b>MRSA</b>	:Metisilin rezistans <i>S.aureus</i>
<b>MSSA</b>	:Metisilin sensitive <i>S.aureus</i>
<b>SarA</b>	:Staphylococcal accessory regulator
<b>Agr</b>	:Accessory gene regulator
<b>BHI</b>	:Brain heart infusion
<b>KKA</b>	:Kongo kırmızılı agar

## GİRİŞ

Stafilokoklar insan ve hayvanlar için fırsatçı patojendir. İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde kolonize olmaktadır. Stafilokoklar esas olarak insanların ve çoğu sıcak kanlı hayvanların derisinde, ter bezi kanallarında ve membranlarında doğal olarak bulunmaktadır. Stafilokoklar *Micrococcaceae* familyası içinde 0.5-1.5 mm çapında düzensiz kümeler, tetrad, ikişerli kok yada tek tek kok şeklinde görülen Gram (+) bakterilerdir (1-4).

*Staphylococcus aureus* akut veya kronik infeksiyonlara neden olmaktadır. *S.aureus* suşlarının patojenitesi; aderans özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstrasellüler faktörler gibi özelliklerine bağlıdır. Slime faktör üretmesi ve biyofilm oluşumu da patojenite faktörlerindedir. Stafilokokların bu özellikleri sayesinde tıbbi aletlere tutunabildikleri gösterilmiştir. *S.aureus* ve *S.epidermidis* vücut bölgelerine uygulanan tıbbi aletle ilişkili infeksiyonlardan en sık izole edilen etkenlerdir (5,6,7).

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri ekstrasellüler polisakaritler (EPS), proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır. Biyofilmin temel birimi mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler bir veya daha fazla türde bakteri hücresinden oluşabilir. Biyofilm, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları müköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, “mikroplar şehri” olarak tanımlanmıştır (8).

Biyofilmler kronik veya dirençli bakteri infeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (9). Biyofilm ve slime terimleri birbirlerinin yerine kullanılmıştır (10). Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyal maddeler, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı direnç geliştirirler. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanısıra katalaz, proteaz, lipaz salgılayarak antimikrobiyallere ve konak savunmasına karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar (9,11).

*S.aureus* bakterilerinin en önemli özelliklerinden birisi de kullanılmakta olan kemoterapatlere direnç geliştirmeleridir. Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaları opsonofagositoz ve antibiyotiklerden koruyarak, sepsis ve kronik infeksiyonlara neden olabilir (9,12).

Bu alışmada; Pamukkale Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesinde yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan *S.aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması ve çeşitli antibiyotiklerin biyofilm oluşumundaki *S.aureus* suşlarına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan *Micrococcaceae* familyası içinde yer alan Gram (+) koklardır. Bu familya üyeleri *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* ve *Planococcus* cinsinden oluşur. Bu cinslerin, DNA'daki G+C oranlarında (%30-75 mol) ve hücre duvarı yapılarında farklılıklar olmasına karşın; nükleik asit hibridizasyon deneyleri ve 16S rRNA sıralarının incelenmesi sonucunda aynı familya altında toplanmışlardır. Aerob veya fakültatif anaerob koklardır (1-4).

Stafilokokların çeşitli türleri insan vücudunun değişik yerlerinde kolonize olmaktadır. *S.aureus* normal insanların %10-40'ının, hastanelerde çalışanların ve hospitalize hastaların %70'inin burun kanatları iç yüzeyi mukozasında kolonize olmaktadır. Ayrıca aksilla, inguinal, perineal, yüz ve ayak parmakları derisinde bulunmaktadır. İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında en sık patojen olarak *S.aureus* yer almaktadır (3).

*S.aureus*; pigmentli, fakültatif anaerob ve çoğunlukla aerob üreyen, koagülaz ve hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehaloz'dan asit yapabilen, %10 NaCl'lü ortamda ve 18-45 °C'de üreyebilen, alfa toksin yapan, novobiosine duyarlı, lizozime direçli, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bakterilerdir. İnsan ve sıcak kanlı hayvanlarda gıda zehirlenmesi ve piyojenik enfeksiyonları yapabilen bir stafilokoktur (2,3).

### GÖRÜNÜM VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Stafilokoklar 0.5-1.5 mm çapında düzensiz kümeler bazen tetrad, ikişerli kok yada tek tek kok şeklinde görülen Gram (+) bakterilerdir. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünde çoğaldıklarından üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Stafilokoklar hücre morfolojileri nedeniyle mikrokoklarla karıştırılabilmektedir. Mikrokoklarda Gram (+) kok görünümünde ve katalaz olumludurlar (1-4).

## KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

*S.aureus* basit besiyerlerinde üreyebilirler de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve kolonilerinin etrafında tam hemoliz ( $\beta$ -hemoliz) meydana getirir. Hareketsiz, sporsuz, genellikle koagulaz (+) ve kapsülsüzdür. Çoğunluğu %7.5-10.0 NaCl'li ortamda ve 18-45 °C'ler arasında üreyebilirler. 37 °C'de ve pH 7.4'de iyi ürer. Jeloz besiyerinde ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yapar. Uygun ortamda koloni büyüklüğü 6-8 mm çapına ulaşabilir (1-3).

*S.aureus* koloni morfolojisi, enzimatik ve biyokimyasal özellikleri ile diğer stafilokok türlerinden ayırt edilebilir (Şekil 1). *S.aureus* altın sarısı renge pigment oluşturur. Pigmentleri karetenoid yapısında olup hücre zarında yer almaktadır. Aynı stafilokok kökenleri değişik koşullarda değişik renkte pigment oluşturabilir. Isıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Çoğu tür aerob ve fakültatif anaerobdur (*S.saccharolyticus* ve *S.aureus* sbsp. *anaerobius* hariç). *S.saccharolyticus* ve *S.aureus* sbsp. *anaerobius* aynı zamanda katalaz ve oksidaz negatiftir. Mikrokoklar zorunlu aerob ürerler, oksidaz (+), lizozime duyarlı, lizostafine dirençli, basitrasine duyarlıdır. Bu özellikleri ile klinik laboratuvarlarda stafilokoklardan kolayca ayrılabilir (1-4).

REAKSİYON	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>	<i>S.intermedius</i>
Katalaz	+	+	+	+
Koagulaz	+	-	-	+
Clumping faktör	+	-	-	d
Hemoliz	+	d	?	d
Mannitole etki (aerobik)	+	-	d	+
Mannitole etki (anarobik)	+	-	-	-
Termonükleaz	+	-	-	+
Hyaluronidaz	+	-	?	-
Protein A	+	-	?	d
Pigment oluşumu	+	-	-	-
DNaz	+	-	-	?

Şekil 1: Tanımlama şeması (kaynak 1-4'den düzenlenmiştir).

(+:pozitif, -:negatif, d:değişken, ?:açıklanmamış)

## GENOM YAPISI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Stafilokokal genom sirküler kromozom (yaklaşık 2800 bp), profaj, plazmidler ve transpozonlar içermektedir. Virülans ve antibiyotik direnç genleri kromozomlar üzerinde bulunabildiği gibi ekstrakromozomal yapılarda da bulunabilir. Bu genler stafilokokal suşlar, türler veya diğer Gram (+) bakteriler arasında ekstrakromozomal elementlerle transfer edilebilir (6).

*S.aureus* hastane ve toplum kaynaklı önemli infeksiyonlardan sorumludur. Stafilocokların birçok kökeni beta-laktamaz üretmekte ve  $\beta$ -laktam içeren antibiyotiklere direnç kazanmaktadır. Beta-laktamazların stafilocoklardaki yapımı bakteriyofajlar tarafından transdüksiyon yoluyla genetik olarak aktarılabilen ekstrakromozomal bir element (plazmid) tarafından kontrol edilir. Penisilin  $\beta$ -laktam halkası, bir serin proteaz olan  $\beta$ -laktamaz tarafından hidrolize edilerek inaktive edilir. Penisilin duyarlı izolatlar %5'den azdır (3,6).

Stafilocoklarda esas sorun giderek artan metisilin direncidir. Metisilin direnci çoğu kez kromozomal, bazen plazmit kaynaklı olabilmektedir. Metisilin direnci, bütün penisilinaz dirençli penisilinlere ve sefalosporinlere direnci gösterir. *S.aureus*, *mecA* geni aracılığı ile düşük afiniteli penisilin bağlayan protein 2a yaparak beta laktam ajanlara direnç gösterir. Metisilin dirençli suşların çoğu, sınırlı sayıda klondan kaynaklanırken, bazı kökenlerde multiklonal kaynaklı olabilir. Bu bakterilerin sebep olduğu infeksiyonlarda yaygın olarak vankomisin kullanılır. Bla ( $\beta$ -laktamaz) ve fem (metisilin rezistansında gerekli faktör) diğer direnç genleridir. Metisilin rezistansı sıklıkla heterojendir ve çevre koşullarındaki değişikliklere göre direnç fenotipi ifade edilir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, direnç fenotiplerinin saptanmasını arttırmak için düzenlenmiştir (1,2,6).

Glikopeptid ajanlar (vankomisin ve teikoplanin) MRSA dahil Gram (+) patojenlere karşı etkilidir. Glikopeptidler peptidoglikan prekürsörün pentapeptidinin C terminalinde D-ala-D-ala bölgesine bağlanarak transglikolizasyon ve transpeptidasyonu engellerler. Bu güne kadar Japonya'dan bir ve ABD'den üç vankomisin orta derece dirençli ve dirençli *S.aureus* klinik izolatu bildirilmiştir. Bu izolatlardan, vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* suşundan plazmidle aktarılan

vanA geni elde edilmiştir. Enterokoklarda glikopeptid direncine D-ala-D-ala yerine modifiye prekürsörler sentezlemesi neden olur ve glikopeptidlere 1000 kez daha düşük affinite gösterirler (6,13).

### HÜCRE DUVARI

Stafilokokal hücre duvarı ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan oluşturur. Peptidoglikan 1,4- $\beta$  bağlarıyla bağlı N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin gibi değişik polisakkarit ünitelerinden oluşur. Peptidoglikan zincir *S.aureus* için spesifik olan pentaglisin köprüleri içerir ve N-asetilmuramik aside bağlı pentapeptid zincirleriyle çapraz bağlanır. Peptidoglikan endotoksin gibi aktivite göstererek, makrofajlardan sitokin serbestleşmesini uyarabilir, komplemanı aktive edebilir, trombosit kümeleşmesi yapabilir. Stafilokokal suşların peptidoglikan yapısındaki farklılıklar Dissemine İntravasküler Koagülopati (DİK) oluşturma kapasitelerini değiştirir. Ribitol teikoik asitler, hücre duvarının esas bileşimidir ve peptidoglikana kovalent olarak bağlanmıştır. Lipoteikoik asit, sitoplazmik membranda yerleşmiş glikolipit uçlarına bağlanan gliserol fosfat polimerleridir (1,6).

### KAPSÜL

Çoğu stafilokok suşu mikrokapsül yapar. Mikrokapsüller polisakkarit yapısına göre 11 serotipi vardır. İnsan infeksiyonlarının %75'inde serotip 5 ve 8 tanımlanmıştır. Metisilin dirençli *S.aureus* suşlarının çoğu serotip 5 olarak bulunmuştur. Bu antifagositer polisakkarit tiplerinin dördünün (serotip 5 ve 8 dahil) kimyasal bileşimi açıklanmıştır (6).

### STAFİLOKOKLARIN YÜZEY PROTEİN ADEZİNLERİ

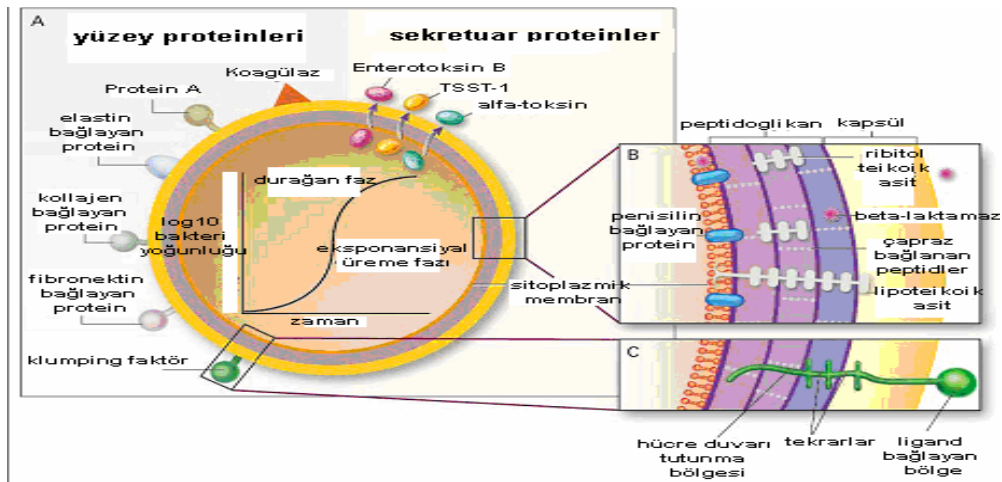
*S.aureus* hücre dışı patojendir. İnfeksiyon başlangıcında doku ekstrasellüler komponentlerine yapışırlar. Aderans “microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMM) isimli yüzey protein adezinleri ile ilişkilidir. MSCRAMM'ların çoğu hücre duvarındaki peptidoglikanlara kovalen olarak bağlanırlar. Bununla beraber hücre duvarı ile kovalen olmayan bağlanma görülen MSCRAMM'larda vardır. MSCRAMM'lar Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS) da da bulunur (7,14-16).



Stafilokokal yüzey proteinlerinin çoğunun genel özellikleri belirlenmiştir. Bu bilinen özelliklere N-terminalinden salınan sinyal dizileri, sitoplazmaya uzanan amino asitler, hidrofobik membranın genişlemiş bölgesi, hücre duvarına yerleşmiş bölgesi ve C (karboksil) terminalinin tamamı dahildir (6).

Bakteriyel yüzey proteinleri (MSCRAMM vb.), ekstrasellüler doku proteinlerine (fibronektin, fibrinojen, vitronektin, elastin vb.) bağlanır ve solid yüzeylere aderansın başlamasında anahtar rol oynar. Bu yüzey adezinleri değişik insan veya hayvan dokuları, serum proteinleri, ekstrasellüler matriks proteinleriyle etkileşir. Bunlardan protein A (Spa) immunglobulinlerin Fc parçasını bağlar. Bu mekanizma insan dokularına girişi sonrasında *S.aureus*'un opsonofagositozunu önler. "Clumping factor A" ve "Clumping factor B" (ClfA ve ClfB) fibrinojeni bağlar, kalp kapaklarındaki trombine yapışarak destek sağlar. "Fibronectin binding protein A" ve "Fibronectin binding protein B" (fnbA ve fnbB) yüzey proteinleri, fibrinojen ve fibronektini bağlayarak biopolimer yüzeylere yapışma ve hızla tıbbi aletlere kolonize olma yeteneği kazandırır (6,7,14,16).

Ayrıca "bone sialoprotein-binding protein" (Bbp), "fibrinogen binding protein" (fib), "collagen binding protein" (cna), "elastin binding protein" (ebpS) ve "laminin binding protein" (eno) bakteriyel yüzey proteinleri içerisindedir (16). *S.aureus*'un yüzey virülans özellikleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: *S.aureus*'un yüzey virülans faktörleri (kaynak 6'dan düzenlenmiştir).

## TOKSİNLER

### Sitolitik Toksinler

Sıvı besiyerinde üretilmiş stafilokokların kültür süzıntülerinde ekzotoksin niteliğinde maddelerin bulunduğu ve bunların eritrosit ve çeşitli hücrelerin üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü, nekrotik etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır (3).

### Alfa Toksin

Hemolitik, dermonekrotik ve doku kültürlerinde sitolitik etkiler yapan 33 kDa ağırlığında proteindir. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi varsa da monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları alfa toksine duyarlı olup, bunlar üzerinde tahribat yapar. Bu toksinin geninin transpozona bağılı olduğu kabul edilmektedir (1,3).

### Beta Toksin

Soğukta ve sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir. En iyi koyun daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir. Stafilotoksin veya sfingomyelinaz olarak da bilinir (1,3).

### Gama Toksin

Belirgin bir hemolitik etkisi vardır. Özellikle stafilokoklara bağılı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması bu toksinin bu tür hastalıkların oluşmasında etkili olduğu kanısını vermektedir (1,3).

### Delta Toksin

Termolabil yüzeyel etkin bir toksin olup deterjanlara benzer bir etki ile hücre membranını bozmaktadır. Geniş bir biyolojik etkinliğe sahip olup eritrosit, makrofaj, lenfosit, nötrofiller ve plateletler üzerine etkilidir (1,3).

### Non Hemolitik Lökosidin (panton-valentine lökosidin)

İnsan ve tavşan lökositleri ile makrofajları etkilemektedir. Bunlar üzerinde litik etkisi vardır. F ve S olmak üzere iki komponentten oluşur. Her iki komponentte

antijeniktir. Toksoide dönüştürülebilir. Lökositleri harap ettiğinden ve fagositozu engellediğinden virülansta rolü vardır. Hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olmaktadır (1,3).

#### Enterotoksinler

*S.aureus* tarafından oluşturulan, suda eriyebilen, termostabil ve polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksinlerinin A,B,C1,C2,D,E,F gibi immünolojik tipleri vardır. Bir stafilokok kökeni bunlardan birini veya bir kaçını oluşturabilir. A ve D besin zehirlenmelerinde, B ise hastane infeksiyonlarında karşılaşılan toksindir. Enterotoksinin etki mekanizması tam bilinmemektedir. Stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve diyare başlar. Akut belirtiler ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir. Patates, makarna sosu, salam, dondurulmuş tavuk, süt tozu ve yağ enterotoksin üremesine uygun ortamlardır. Enterotoksinlerin süper antijen gibi etkili oldukları, T lenfosit aktivitelerini artırdıkları bildirilmiştir (1,3).

#### Epidermolitik Toksin ( Eksfoliyatif Toksin )

Soyulmuş deri sendromuna neden olan toksin 1971'de bulunmuştur. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından A ve B tipi vardır. A tipinin kromozomal, B tipinin plazmide bağlı genler tarafından oluşturulduğu saptanmıştır. Özellikle bakteriyofaj grup 2 kökenleri tarafından oluşturulur. Stafilokok infeksiyonlarının dermatolojik belirtilerinden veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Bir serin proteaz gibi davranır ve hedefi yalnızca deride bulunan desmoglein-1 (Dsg-1) dir. Dsg-1 keratinosit hücrelerinin birbirine yapışmasının sürdürülmesinde rol oynar. Özellikle T lenfositleri üzerine mitojen etkilidir (1,3).

#### Toksik şok sendromu Toksini-1 ( TSST-1)

Az miktarda aminoasit dizilimi benzerliği göstermesine rağmen yapısal olarak enterotoksin B ve C'ye benzer. TSST-1 geni *S.aureus* izolatlarının %20'sinde bulunur. Menstruasyon gören kadınların kullandığı tamponların *S.aureus* kolonizasyonunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Faj 1 grubundan 29 ve 52 tipleri TSST-1 oluştururlar (1,3).

### Pirojenik toksin

Yapısal olarak (aminoasit dizilim homolojisinin değişik tabakalarının katıldığı) süperantijen özelliğindedir. Süperantijen gibi davranarak ‘‘major histocompatibility complex’’ (MHC) sınıf II proteinlere bağlanarak, aşırı T hücre yapımı ve sitokin salınımına neden olur (1,3).

### ENZİMLER

Stafilokoklar proteaz, lipaz ve hyaluronidaz gibi dokuyu tahrip eden değişik enzimler üretir. Bu bakteri ürünleri dokularda infeksiyonların yayılımına yardım eder (1,2,3,6).

### Beta-laktamaz

Penisilini inaktive eden bir enzimdir. Penisilin bağlayan proteinler sitoplazmik membranda yerleşmiştir ve hücre duvarının yapımında rol oynar (3,6).

### Koagulaz

Ekstrasellüler bir proenzimdir. Protrombin aktivatörüdür ve fibrinojeni fibrine dönüştürür. Koagulaz reaktin faktör ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S.aureus* üzerinde oluşan kalın fibrin tabakası mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak patojenliğe katkı yapar (1,2,3,6).

Koagulaz stafilokoklardan başka *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *B.subtilis* tarafından meydana getirilebilir. İki tip koagülaz vardır.

1. Bağlı ( clumping faktör ) faktör
2. Serbest faktör

Tavşan plazması kullanılarak lam ve tüp yöntemi ile koagulaz aktivitesi araştırılır (1,3,4).

Serbest koagülaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Antijenik olarak farklı 4 tipi vardır. Bu enzim fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile plazmanın pıhtılaşmasına neden olan ve normal olarak plazmada bulunan koagulazı etkileyen faktörü aktive etmektedir. Clumping faktör ise stafilokokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve serbest bırakılmaz. Fibrinojenin

fibrine dönüşümü ile hücre yüzeyinde fibrin prespitasyonu meydana gelir ve bunun sonucu olarak stafilokoklar aglütinasyon ve kümeleşmeye uğrar (1,2).

#### Hyaluronidaz

*S.aureus* şuşlarının %90'ından fazlası hyaluronidaz oluşturur. Bu enzim hyaluronik asidi hidrolize ederek infeksiyonun doku içerisine yayılmasını sağlar (1,3).

#### Deoksiribonükleaz

Çoğu koagulaz olumlu stafilokoklar deoksiribonükleaz (DNaz) oluşturur. Enzim niteliğindeki bu madde DNA'yı hidrolize eder (6,17).

#### Stafilokinaz

Fibrinolitik etki yapar. Plazminojen veya profibrinolizin isimli maddeyi aktive ederek plazmin (fibrinolizin) oluşturur (17).

#### Lipaz

Lipitleri hidrolize eder. Stafilokokların deri ve deri altı yerleşiminde yağ dokusu üzerindeki etkileri ile önemli rol oynar (3,17).

#### Üreaz

Üreaz, üre siklusunda ve aminoasit metabolizmasında rol oynayarak üre yıkımı sonucunda CO<sub>2</sub> ve NH<sub>3</sub> oluşturur. NH<sub>3</sub> dokular için toksiktir. Aşırı amonyum bakteriler içinde toksik olabilir. Bu kimyasaldan çeşitli enzimler ve kombine detoksifikasyon mekanizmalarıyla korunabilirler. Biyofilmdeki bakteri hücreleri metabolizma sonucu oluşan laktik asit ve formik asit üretimi nedeni ile düşen pH'dan kendilerini üreaz genlerinin up-regülasyonu ile korurlar. Üreaz aktivitesinin biyofilm oluşumunun sürdürülmesinde önemli olduğu bildirilmektedir (18).

#### Proteaz

*S.aureus* çeşitli ekstrasellüler proteazlar üretir (metallo-, serin ve sistein proteaz). Bu proteazlar konak defansının bozulmasında ve dokulara yayılmada rol oynar. Serin proteaz bunlara örnektir ve IgG tarafından bağlandığı gösterilmiştir.

Proteazlar konak proteinlerini yıkarak, yaygın doku harabiyetine neden olur. Aynı zamanda mikrobiyal üreme için gerekli besinlerin oluşumunu sağlar. Proteaz salınımı yüzeysel stafilokok infeksiyonlarının şiddetine de katkıda bulunur. Atopik dermatitli hastalardan izole edilen *S.aureus* suşlarında sağlıklı gönüllülerden elde edilen suşlara oranla daha yüksek proteaz ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (19, 20, 21).

### BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bu güne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir (22,23).

Elder ve arkadaşları (24), mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik ve Carpentier ve Cerf (25), bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olarak tanımlamışlardır.

Donlan (23), biyofilmi irreversibl olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamıştır.

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerinde zamanla

matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir (26).

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücresele olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (23).

Biyofilm, mikroplar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks olarak tanımlanmıştır (26).

Fosil kayıtlarından edinilen bilgiler prokaryotların 3 milyar yıldan daha uzun bir süreden beri biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmışlardır (27). Günümüzde derin yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (28). Biyofilmler endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere, birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (9). Aderans, antibiyotik direnci ve fagositoza karşı önemli rolünün olduğunun bilinmesi son yıllarda tıbbi önemini arttırırken (29); bakterinin birbiriyle konuşarak bir topluluk oluşturmaları ve gen modülasyonu aracılığıyla ortama adapte olmalarında (Quorum sensing) rol oynaması tıbbi önemini daha da arttırmıştır (30).

Biyofilm oluşumunun doğal kapak endokarditi, osteomyelit, dental taşıyıcılık, kronik bakteriyel prostatit, orta kulak enfeksiyonları, tıbbi implant enfeksiyonları ve özellikle kistik fibrozisli kronik akciğer hastalıklarında önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir (26). Oluşan biyofilmin antibiyotik tedavisine aynı genetik materyale sahip planktonik bakterilere oranla 100–1000 kat tolerans veya direnç geliştirmesi,

fagositoza karşı oluşan direnç ve tedavi sonrası tekrar oranının yüksek olması biyofilm oluşturan bakterilerin yaşayan organizmadan uzaklaştırılmasının ne kadar güç olduğunun en önemli göstergesidir (29).

Mikrobiyoloji tarihinin büyük bir kısmında, mikroorganizmalar planktonik hücreler olarak görülmüş ve zengin kültür ortamlarında gösterdikleri büyüme özelliklerine göre tanımlanmışlardır. İlk olarak van Leeuwenhoek tarafından bildirilmiş olan “mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabildikleri” şeklindeki mikrobiyolojik fenomenin yeniden keşfedilmesi sonucu gerçekleştirilen çalışmalar, yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların (biyofilmler) gen transkripsiyonu ve büyüme hızları açısından farklı bir fenotip gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır (23).

Dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakteriler incelediğinde %99.99'unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıkları gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmaların da ışığında, bu toplulukları tanımlamak amacıyla biyofilm terimi kullanılmıştır (26).

Endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyal toplulukların sadece yüzeye kuvvetle tutunmadıklarını, aynı zamanda klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli oldukları bildirilmiştir (23).

## BIYOFİLMİN YAPISI

Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere, esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan “su kanallarına” sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (31). Biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit tabiatındaki bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücrel ve hücrel olmayan yapılar arasında değil aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilmin yapısındaki ekstrasellüler polisakkarit matriksin yaklaşık %95'i su şeklindedir (26).

Bakteriler ekstrasellüler polimerik maddeler olarak bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks



içerisinde gömülü olarak bulunurlar. Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstrasellüler komponentini oluşturur. Mikrobiyal hücrelerden salgılanan ekzopolisakkaridler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir. Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve  $0,5-2,0 \times 10^6$  Da'luk bir moleküler yapıya sahiptirler. Biyofilm preparatlarında polisakkaridler bakteriyel hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde izlenir (23, 32-34).

İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilmektedir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (32, 35).

## BİYOFİLM OLUŞUM EVRELERİ

Genomik ve proteomik çalışmalar sonunda biyofilm gelişimi ile ilgili birçok gen bulunmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adezyon, “quorum sensing”, hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmid bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Biyofilm oluştuğça mikro çevredeki değişiklikler gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilmin oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşumuna etkili genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu arttırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir (27,36).

### *1. Tutunma*

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “quorum sensing” sistemi denilen başka

bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağrılıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar.

## *2. Yapışma*

Bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir.

## *3. Toplanma*

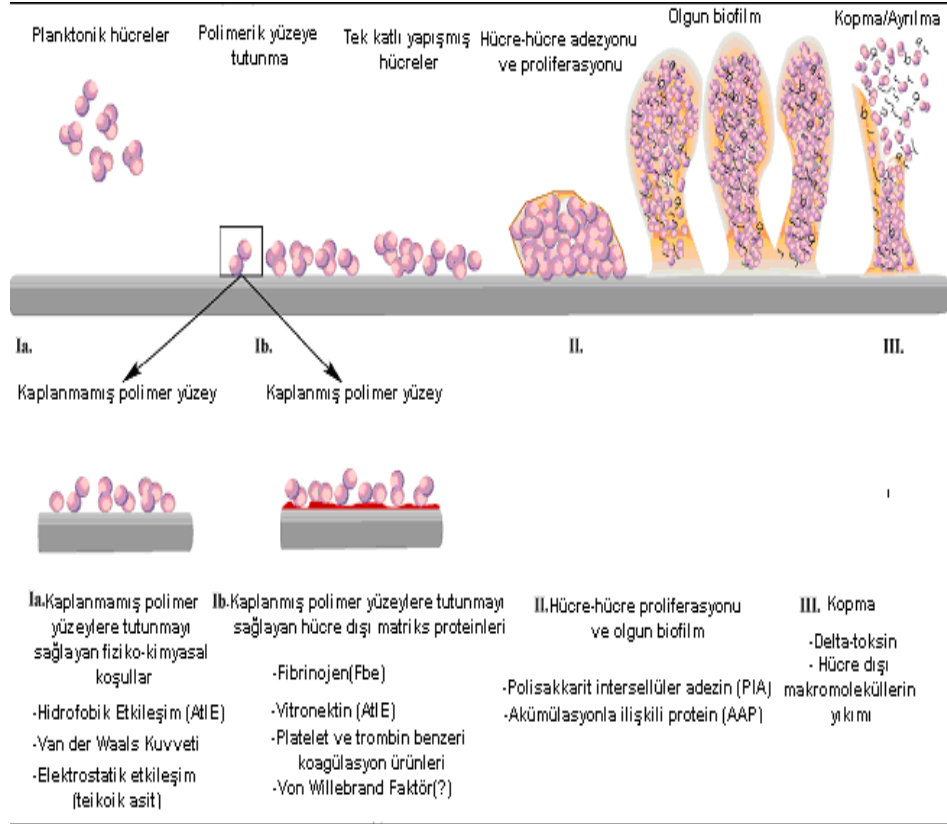
Bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler.

## *4. Olgun Biyofilm*

Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler.

## *5. Kopma veya Ayrılma Evresi*

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur. Stafilokoklarda biyofilm oluşum evreleri Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3: Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli (Kaynak 36'den düzenlenmiştir).

## BIYOFİLM MİKROORGANİZMA İLİŞKİSİ

Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin aderansında anahtar rol oynarlar (14).

Aderans sonrası bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Bakteriler gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja sahip olurlar (27).

### 1. Çevresel faktörlere direnç

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur.

Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Ortamın besin durumu dışında, sıcaklık, osmolarite, pH, demir ve oksijen gibi diğer çevresel faktörler de biyofilm oluşumu üzerinde rol oynarlar (27).

### *2.Besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılması*

Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlardan geçen yüksek geçirgenliğe sahip dolaşım sistemine benzeyen su kanalları bulunmaktadır. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini üstlenir (27).

### *3.Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma*

Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarid matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekzopolisakkaritler bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korurlar. Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Biyofilm, kronik seyirli enfeksiyonlara bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (26).

### *4.Metabolik işbirliği, yeni genetik özelliklerin kazanılması*

Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyarılar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Bu durum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri ortak yaşamlarının en önemli göstergesidir. Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle çoklu ilaç dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam konjügasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan sağlamaktadır (37). Çevreden almış olduğu sinyaller

sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir (38,39).

## BIYOFİLM HASTALIK İLİŞKİSİ

Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağ artık kanıtlanmıştır. Bu ilişkide değişik mekanizmaların rol oynadığı bildirilmiştir (26).

### *1- Hücrelerin ayrılması veya hücre agregatları*

Hücrelerin büyümesi ve aynı zamanda çevreden gelen streslerin artması bazen biyofilm içindeki bakteriyi kopartabilmektedir. Ayrıca biyofilmin düzenleyicisi olarak bilinen açıl homoserin lakton molekülü biyofilmin oluşumunu sağladığı gibi kopmaya neden olarak, dolaşım sisteminde enfeksiyona neden olabilir (40).

### *2- Endotoksin üretimi*

Biyofilm üreten Gram negatif bakteriler endotoksin üretimini artırarak hastada daha fazla immün yanıtı da neden olmaktadır. Oluşan inflamatuvar yanıtın büyüklüğü enfeksiyonun şiddetini de etkilemektedir (41-43).

### *3- Konağın immün yanıtına direnç*

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı makrofaj fagositik aktivitesinin veya yapılan opsonik antikorların yetersiz olduğu gösterilmiştir (44-47).

### *4- Bakterilere direnç aktarımı*

Bakteride bulunan direnç genlerinin, plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu ile türler arasında aktarılabildiği gösterilmiştir (48, 49).

## “QUORUM SENSİNG” MEKANİZMALARI

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bazı bakterilerde biyofilm oluşumunun, bakteriyel hücreden hücreye iletişim dizgeleri ile kontrol edildiği açıktır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerle (“acylated homoserine lactonase” vs.), biyofilm yapımının düzenlenebileceği gösterilmiştir. Bu veriler biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini arttırmıştır. Çoğunluğu algılama “quorum sensing” (QS) olarak adlandırabileceğimiz bu dizgeler, geniş bir organizma topluluğunda virülans etkenlerinin düzenlenmesinde de yer alırlar (40,50,51).

Özellikle Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve "autoinducer" peptidler (AIP) olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. AIP, gram negatif bakterilerin aksine hücre içinden dışarıya difüzyonla değil genellikle hücre zarında bulunan “ATP-binding cassette” (ABC transporter) sistemince aktif olarak salgılanır. Hücre dışı QS molekülleri, ya membrana bağlı sensör kinazlara bağlanır ve hücre içinde bir veya daha fazla sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyicilerin fosforilasyonu yoluyla hücrede transkripsiyonel değişikliklere neden olur, ya da bazı bakterilerde olduğu gibi oligopeptid permeazlar aracılığı ile doğrudan hücre içine girerek hücre içi reseptörler ile kendileri etkileşime geçer (52-54).

*S.aureus*'da QS moleküllerinin miktarının azlığı biyofilm oluşumunu tetiklemekte, miktarının artması ise bakterilerin biyofilmden ayrılarak invazyon yapmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, QS inhibitörü varlığında üretilen biyofilmlerin de antibiyotik ve dezenfektanlara daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Bir diğer ilginç nokta ise, *S.aureus*'un QS moleküllerinin *S.epidermidis* üzerinde etkisi yokken, *S.epidermidis*'in QS molekülü *S.aureus*'un epidermal invazyon yeteneğini kontrol etmektedir (52-54).

## BİYOFİLM ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ

Doğal ve endüstriyel çevrelerde büyüyen biyofilmlerin bakteriyofaj, amipler ve çeşitli kimyasal biyosidlere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Tıbbi alanda ise, hareketsiz bakteriyel hücreler konak savunma mekanizmalarına karşı koyabilmekte ve planktonik formda olan bakterilere oranla, antibiyotiklere çok daha fazla dirençli olabilmektedirler. Biyofilmlerin bu dirence multipl mekanizmalar aracılığıyla sahip oldukları düşünülmektedir (9,12).

1. Antimikrobiyal ajanın biyofilmin tüm tabakaları boyunca penetrasyon gösterememesidir. Biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddelerin antibiyotik difüzyonunu güçleştirdiği bilinmektedir. Bu durum yeterli antibiyotik konsantrasyonuna ulaşamaması anlamına gelmektedir.

2. Biyofilm içerisindeki hücrelerden en azından bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalmaktadırlar.

3. Yavaş büyüyen veya büyüme göstermeyen hücreler bir çok antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı değildirler ve bir çoğu hayatta kalabilmektedirler.

4. Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında rezistan genlerin aktarımı söz konusudur.

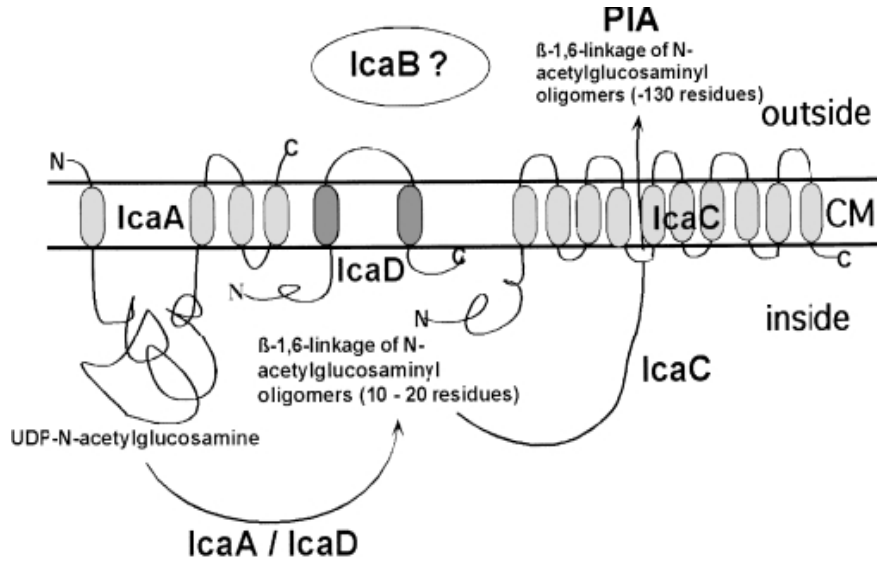
### *S.aureus* ve BİYOFİLM

Stafilokoklarda biyofilm oluşumu iki basamakta oluşur. Bakteriler ilk aşamada bir yüzeye yapışarak kolonize olurlar (erken aderans). İlk adımdan “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMM gibi) adı verilen değişik yüzey proteinleri sorumludur. Bakteriyel yüzey proteinleri, ekstrasellüler (fibronektin, fibrinojen, vitronektin, kollajen, elastin vb.) konak-doku ligandlarına bağlanabilir ve solid yüzeylere aderansın başlamasında anahtar rol oynarlar (7,14-16, 55).

Bunu takiben ikinci basamakta hücre-hücre adezyonu olmakta ve çok tabakalı biyofilm oluşumu şekillenmektedir (intersellüler adezyon). Stafilokoklarda biyofilm oluşumundan *icaADBC* operonu ve ürünü olan “polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) sorumlu tutulmaktadır. *icaADBC* operonu ilk kez *S.epidermidis*'te bulunmuştur. Bununla birlikte *S.aureus*'ta da bulunduğu ve benzer fonksiyonlar gösterdiği bildirilmiştir. *S.aureus* ve *S.epidermis*'in biyofilm oluşturmasında *icaA* ve

icaD genleri daha önemli bulunmuştur. İca ADBC operonu stafilokoklarda biyofilm oluşumunun intersellüler adezyon kısmında görev yapan PIA oluşumundaki “poly-N-acetyl-beta-1-6-glucosamine” (PNAG) oligomerlerini sentezlettirir (14).

IcaA ve icaD genlerinin görevi UDP-N-asetil glukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerleri sentezlettirmektedir (Şekil 4). IcaA tek başına düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gösterirken, icaB ile arasında yerleşmiş bulunan icaD geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gösterilmiştir. IcaA ve icaD geninin sentezlettiği oligomerlerin maksimum uzunluğu 20 rezidüdür. IcaC’inde deasetilasyon basamağında görev yaparak oligomerleri uzattığı gösterilmiştir. Bu oligomerler PIA spesifik anti-serumlarla reaksiyon verebilir. IcaB’nin deasetilasyon basamağında katalizör görevi yaptığı düşünülmektedir (55, 56).

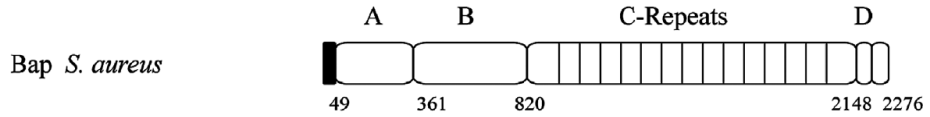


Şekil 4: *S.aureus*'ta icaADBC genleri ve PIA/PNAG biyosentezi (kaynak 56'den düzenlenmiştir).

Çeşitli bakteri türlerinin biyofilm oluşumunda yapısal bir grup yüzey proteinleri önemli bulunmuştur. Bu grubunda ilk üyesi olarak *S.aureus* mastitli sığırdan (*S.aureus* V329) izole edilen “biofilm associated protein” (bap) biyofilm oluşumu için gerekli yapılardan birisi olarak bildirilmiştir. Bap genine sahip *S.aureus* suşları daha güçlü biyofilm oluştururlar. *S.aureus*'da çeşitli MSCRAMM'larla diğer



önemli yüzey bileşenleri (PIA ve Bap) birarada bulunur ve biyofilm oluşumuna katkı sağlar. Bap bakteri yüzeyinde yerleşmiş, yüksek molekül ağırlıklı, ardı ardına tekrarlayan C- domainleri içeren, bakterilere yüksek biyofilm oluşturma kapasitesi sağlayan ve infeksiyon sürecinde önemli rol oynayan 2276 aminoasitlik bir proteindir (Şekil 5). Yapılan çalışmalarla abiyotik yüzeylere yapışma ve intersellüler adezyon basamaklarının her ikisinde de görev yaptığı gösterilmiştir (57).



Şekil 5- *S.aureus* bap geni (Kaynak 57'den düzenlenmiştir).

Bu adezinlerin tespiti saflaştırılmış matriks proteinleri kullanılarak yapılabilir. Fakat bazı adezinlerin iki veya daha fazla matriks molekülü bağlaması nedeniyle tespitinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılması tercih edilmektedir (58).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Haziran 2005-Nisan 2006 tarihleri arasında başvuran hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden (yara, kan, trakeal aspirat, balgam, kateter gibi) izole edilmiş olan 175 *S.aureus* suşu çalışmada kullanıldı. Kontrol kökenler olarak biyofilm oluşturmeyen *S.epidermidis* ATCC 12228, güçlü biyofilm oluşturan *S.epidermidis* ATCC 35984, güçlü biyofilm oluşturan ve bap geni bulunan *S.aureus* V329 kullanıldı (Dieter Vancraeynest, Gent Üniversitesi, Belçika). Antibiyotik çalışmaları için kontrol kökenler olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve *S.aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

Suşların tanımlanması geleneksel yöntemlerle yapıldı. Örnekler kanlı agara ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Koloni morfolojisi ve Gram boyama dikkate alınarak katalaz ve koagülaz testi pozitif olanlar *S.aureus* olarak tanımlandı (1-4). Tüm suşların antibiyotik duyarlılıkları CLSI standartlarına göre test edildi (59,60).

### BIYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

Biyofilm üretimi, Freeman ve ark. (61) tanımladığı Kongo kırmızılı agar ve Christensen ve ark. (62) tanımladığı mikrotitrasyon plağı yöntemiyle araştırıldı.

#### *Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi*

Kongo kırmızılı agar besiyeri litrede 10 g agar, 50 g sukroz, 37 g beyin-kalp infüzyon buyyonu ve 0.8 g Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlandı. Bu besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 37°C'de bir gece inkübe edildi ve takiben kültürler oda ısısında 48 saat bekletildi. Besiyerinde kırmızımsı-siyah, pürüzlü, kuru, şeffaf koloniler biyofilm (slime) pozitif, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu (öküz gözü görünümü) koloniler yapanlar biyofilm negatif olarak değerlendirildi. Kontrol olarak biyofilm oluşturmeyen *S.epidermidis* ATCC 12228 ve güçlü biyofilm oluşturan *S.epidermidis* ATCC 35984 kullanıldı.

### *Mikrotitrasyon plağı yöntemi (kantitatif yöntem)*

Kanlı agarda üretilmiş *S.aureus* suşlarının taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı ve %2 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB) içeren tüplere alınarak 37°C’de bir gece inkübe edildi. Kültürler 1:100 dilüe edilerek 150 µl’si 96 kuyucuklu polistren mikrotitrasyon plağı içerisinde 37°C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı besiyeri dökülüp, kuyucuklar distile suyla 3 kez nazıkçe yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara %2’lik kristal viyole solüsyonunun 150 µl’si dağıtılarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar tekrar 3 kez distile su ile yıkandı ve kurutma kağına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara 150 µl etanol asetik asit (95:5) ilave edilerek 10 dakika bekletildi ve böylece boya çözdürüldü. Her kuyucuktan 100 µl alınarak yeni bir mikrotitrasyon plağına aktarıldı. Dalga boyu 540 nm olan filtre ile optik ELİSA okuyucuda (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, France) okutuldu. Aynı suş üç farklı kuyucukta çalışılarak okutuldu. Sonuçlar, biyofilm oluşturmeyan *S.epidermidis* ATCC 12228 ve güçlü biyofilm oluşturan *S.epidermidis* ATCC 35984’den elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlandı.

### BİYOFİLM OLUŞUMUNDAN SORUMLU TUTULAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

PCR çalışmasında, biyofilm üretimi Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilen 152 *S.aureus* suşu dahil edildi. Bu suşlarda biyofilm oluşumunda görev yaptığı düşünölen *icaA*, *icaD* ve *bap* genleri araştırıldı. Kontrol olarak *icaA* ve *icaD* genlerini taşıyan *S.epidermidis* ATCC 35984, taşımayan *S.epidermidis* ATCC 12228 ve *bap* geni bulunduran *S.aureus* V329 kullanıldı.

Bakteri DNA’sının elde edilmesi; 37°C’de 24 saatte kanlı agarda üreyen izolatlar 2 ml distile su içerisinde 0.5 McFarland olacak şekilde süspanse edildi. Bakteri DNA’sının elde edilmesinde DNA saflaştırma kiti (Heliosis Kat. No: A101, Metis Ltd. Şti.) kullanıldı.

Bakteri DNA'sının elde edilmesi;

1. Bakteri süspansiyonununun 100 µl'si, 400 µl "DNA Lysis Binding Solüsyon", 20 µl Proteinaz K ile karıştırılarak vortekslendi.

2. Karışım 65°C'de 10 dakika, 4°C'de 2 dakika bekletildi.

3. Örnekler 2 dak. 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üzerlerine 500 µl DNA presipitasyon solüsyonu eklenerek vortekslendi. 13.000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi.

4. Üst kısım süpernatant çökeltiye dokunmadan pipetle tamamen alındı. Çökeltinin üzerine 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklenerek vortekslendi. 13.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi.

5. Üst kısım süpernatant çökeltiye dokunmadan pipetle tamamen alındı. Çökelti 10 dak. oda sıcaklığında bekletildi.

6. Çökeltiye 20 µl "DNA sample diluter" eklendi, vortekslenerek 2 dak. 3000 rpm'de santrifüj edildi.

7. DNA örneği kullanılıncaya kadar – 20°C'de bekletildi.

Bap, icaA ve icaD tespitinde basit PCR kullanıldı. IcaA sense 5'-CCT AACTAACGAAAGGTAG-3' ve antisense 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3', icaD sense 5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3' ve antisense 5'-GGCAATAT GATCAAGATAC-3', bap sense 5'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG-3' ve antisense 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3' primerleri kullanıldı.

IcaA ve icaD genlerinin amplifikasyonunda; 2.5 mM (5 µl) MgCl<sub>2</sub>, her bir nükleotidin 200 µM içeren mix dNTP (10µl) eklendi, her bir primerden 100 pmol, 1.25 U Tag polimeraz, 100 ng (5 µl) DNA örneği içeren 50 µl'lik PCR karışımı kullanıldı. Amplifikasyon işlemi; 92°C'de 45 saniye denatürasyon, 49°C'de 45 saniye bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dakika uzama (ekstension) içeren 30 siklus ve 72°C'de 7 dakika son uzama dönemi olarak uygulandı.

Bap geninin amplifikasyonunda; 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Tag polimeraz, her bir nükleotidin 200 µM içeren 10µl dNTP, her bir primerden 100 pmol ve 100 ng (5 µl) DNA örneği içeren 50 µl'lik PCR karışımı kullanıldı. Amplifikasyon işlemi;

94°C’de 30 saniye denatürasyon, sonrasında 30 siklustan oluşan 94°C’de 45 saniye denatürasyon 62°C’de 1 dakika bağlanma, 72°C’de 1 dakika uzama dönemi ve 72°C’de 7 dakika son uzama dönemi olarak uygulandı. DNA amplifikasyonu için ‘‘termal cycler’’ (Mycycler, BIO-RAD, USA) kullanıldı. Amplifikasyon ürünleri 150 volt akımda 45 dakika %2’lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonrası jeller UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı. 1315 bp büyüklüğünde icaA ve 385 bp büyüklüğünde icaD amplifikasyon ürünü elde edildi. DNA büyüklüğünün ölçümünde, ‘‘GenRuler 100 bp DNA’’ marker olarak kullanıldı (7,11).

Tablo-1: Çalışmada kullanılan primerler.

Hedef gen	Primer sekansı	Amplikon büyüklüğü
icaA	5’-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3’	1315 bp
	5’-AAGATATAGCGATAAGTGC-3’	
icaD	5’-AAACGTAAGAGAGGTGG-3’	385 bp
	5’-GGCAATAT GATCAAGATAC-3’,	
bap	5’-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG-3’	971 bp
	5’GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3’	

#### Agaroz Jel Hazırlanışı (%2)

Agaroz 1 gr

1x TBE 50 ml

Etidyum bromür 2.5 µl (agar 50°C’ ye soğuyunca eklendi)

#### 1xTBE solüsyonu hazırlanışı

5xTBE solüsyonu (20 ml)

Distile su (80 ml)

5xTBE solüsyonu 1/5 sulandırılarak dilüe edildi ve tampon solüsyon olarak kullanıldı.

## POLİSAKKARİT İNTERSELLÜLER ADEZİNLERİN ARAŞTIRILMASI

*S.aureus*'ta polisakkarit intersellüler adezin (PIA/PNAG) üretimi Cramton ve ark. (15) tanımladığı yöntemlerle belirlendi. PIA varlığının tespitinde bileşimindeki PNAG yapısı araştırıldı. Çalışmada ica genleri pozitif 42 ve negatif 8 klinik izolatla kontrol kökenler olarak *S.epidermidis* ATCC 35984 ve *S.epidermidis* ATCC 12228 kullanıldı. *S.aureus* suşları %0.25 glukoz içeren TSB'da bir gece inkübe edildi. Örnekler 1:100 dilüe edildi. 2 ml sulandırılmış örnek 3500 g'de 15 dak. santrifüjlendi. Elde edilen çökelti içerisine 50 µl 0.5 M EDTA (pH=8) eklendi. Örnekler 5 dak. 100°C'de inkübe edildi. Örnekler santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantın 40 µl'si, 10 µl proteinaz K ile 30 dak. 37°C'de inkübe edildi. 10 µl Tris-buffer salin (%0.01 brom fenol mavisi içeren) eklendi. Her örnekten 4 µl dot-blot tekniikle nitroselüloz membrana (Hybond ECL, Amersham Biosciences, UK) aktarıldı. Membranlar kurutularak, %3 sığır serum albumini ile kaplandı. Membranlar 1:5000 dilüe anti-*S.epidermidis* PNAG antikoru (Jerry Pier, Harvard Medical School, USA) ile 2 saat inkübe edildi. Membranlar 15 dk %0.1 Tween 20 içeren fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) kullanılarak yıkandı. Bağlı antikolar, biotin-anti-rabit IgG konjugatı (1:5000) ile 1 saat inkübe edildi. Membranlar tekrar 15 dk PBS-Tween kullanılarak yıkandı. Membranlar "horseradish peroksidaz-streptavidin" konjugatı (1:3000) ile 1 saat inkübe edildi. Membranlar PBS-Tween kullanılarak tekrar 15 dak. yıkandı. Membranlar ECL kitleri (Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences, UK) kullanılarak kemilüminesans yöntemiyle değerlendirildi. Elde edilen ışımaya (foton salınımı) CCD kamera (Gel Logic 2200, KODAK, USA) kullanılarak görüntüldü.

## ÇALIŞILAN ANTİBİYOTİKLERİN BİYOFİLM OLUŞTURMUŞ BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİLERİ

*S.epidermidis* 35984'ün oluşturduğu biyofilm miktarı esas alınarak bu değerde ve üzerinde biyofilm oluşturan 8 klinik suş ve 5 kontrol suşu bu amaçla test edildi. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kullanılarak vankomisin (Sigma Chemical Co.), linezolid (Pfizer İlaçları Ltd. Şti.) ve dalfopristin/quinupristin (VLG Chem., France) antibiyotiklerinin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri ile biyofilm oluşumundaki bakteriler üzerine etkileri karşılaştırıldı. Kontrol suşları olarak

*S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *S.epidemidis* ATCC 35984, *S.epidermidis* ATCC 12228 ve *S.aureus* V329 kullanıldı.

Çalışılan antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri CLSI önerilerine göre besiyeri olarak 25 mg/lt kalsiyum ve 12.5 mg/lt magnezyum ilaveli Müller Hinton buyyon (MHB) kullanılarak standart mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi (63). Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde; vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinupristin ve dalfopristin/quinupristin (70/30) antibiyotiklerinin 0.125-1024 µg/ml arasında ikişer kat artan konsantrasyonlarının 100 µl'lik miktarı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına dağıtıldı. Çalışılan suşlar taze kanlı agarda 37°C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi. Daha sonra her suş 0,5 McFarland yoğunluğunda ve  $1 \times 10^6$  CFU/ml mikroorganizma içerecek şekilde MHB içerisinde sulandırıldı. Bunların 100 µl alınarak içerisinde artan konsantrasyonlarda (0.125-1024 µg/ml) antibiyotikler bulunan 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına aktarıldı. Mikrotitrasyon plaklarının 37°C'de 18-20 saat inkübasyonu sonrasında bulanıklığın görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Biyofilm oluşturmuş bakteriler üzerine çeşitli antibiyotiklerin (vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinupristin ve dalfopristin/quinupristin) etkisi araştırıldı. Taze kanlı agarda 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra üretilen bakteriler TSB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında ayarlandı. Bunlar  $1 \times 10^6$  CFU/ml mikroorganizma içerecek şekilde TSB içerisinde sulandırıldı. Buradan 200'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağına aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, süpernatant aspire edildi ve mikrotitrasyon plağı iki defa distile su ile yıkandı. Çalışılan antibiyotikler distile suda çözdürüldükten sonra ikişer kat artan 0,125-64 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda ve 640-1280 µg/ml değerlerinde yüksek konsantrasyonlarda olacak şekilde TSB içerisinde sulandırılarak 200 µl'si kuyucuklara eklendi. Mikrotitrasyon plakları 37°C'de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda biyofilm minimum inhibitör konsantrasyon (BMİK) değerleri bulundu. Üremenin gözle görülmediği en düşük konsantrasyon BMİK olarak

değerlendirildi. İnkübasyon sonunda mikrotitrasyon plağı iki kez distile su ile yıkanarak antibiyotikler uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara 200'er µl taze TSB konularak 6 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra her kuyucuk içeriğinin 10 µl'si alınarak kanlı agara ekim yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra üreyen koloniler sayılarak yorumlandı ve minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyon (MBEK) değerleri bulundu. MBEK, biyofilmdeki bakterilerin %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu değerler her bir suş ve antibiyotik için, MİK değerleriyle karşılaştırılarak yorumlandı. Kontrol olarak ekim yapılmamış TSB içeren kuyucuk kullanıldı (64-67).

#### İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analiz için SPSS Ver 10,0 kullanıldı. Biyofilm üretiminin saptanmasında kullanılan yöntemler arasındaki uyum için McNemar testi, biyofilm üretimi ve ica genleri arasındaki ilişki için Spearman's korelasyon katsayısı testi kullanıldı. İstatistiksel hata payı %5 kabul edildi.

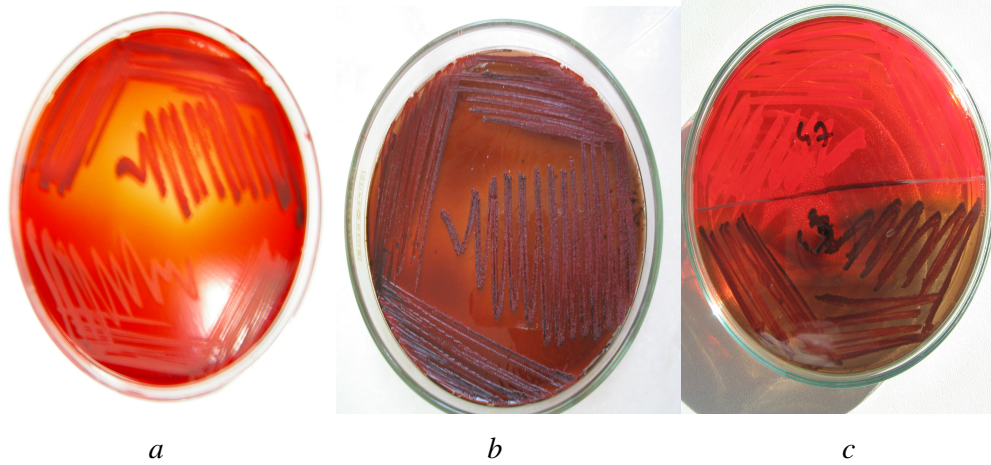


## BULGULAR

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 175 *S.aureus* suşu kullanıldı. Bu suşların 87'si yara (%49.7), 25'i kan kültürü (%14.3), 35'i trakeal aspirat (%20.0), 10'u balgam (%5.7), 8'i kateter (%4.6) ve diğer 10'u da (%5.7) çeşitli klinik örneklerden (göz, idrar, burun sürüntüsü gibi) izole edildi.

### *1-Biyofilm Üretimi:*

Çalışılan suşların biyofilm oluşturma durumları, Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemi ile araştırıldı. Kongo kırmızılı agar besiyerine ekilen kültürlerin 37°C'de bir gece ve sonrasında oda ısısında 48 saat inkübasyon sonrasında kırmızımsı-siyah, pürüzlü, kuru, şeffaf koloni oluşturanlar biyofilm pozitif, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu (öküz gözü görünümü) koloni yapanları biyofilm negatif olarak kabul edildi (Şekil-6).



Şekil 6: Biyofilm oluşumunun Kongo kırmızılı agar yöntemi ile değerlendirilmesi [a-biyofilm negatif, b- biyofilm pozitif, c-biyofilm negatif (üst) ve biyofilm pozitif (alt)]

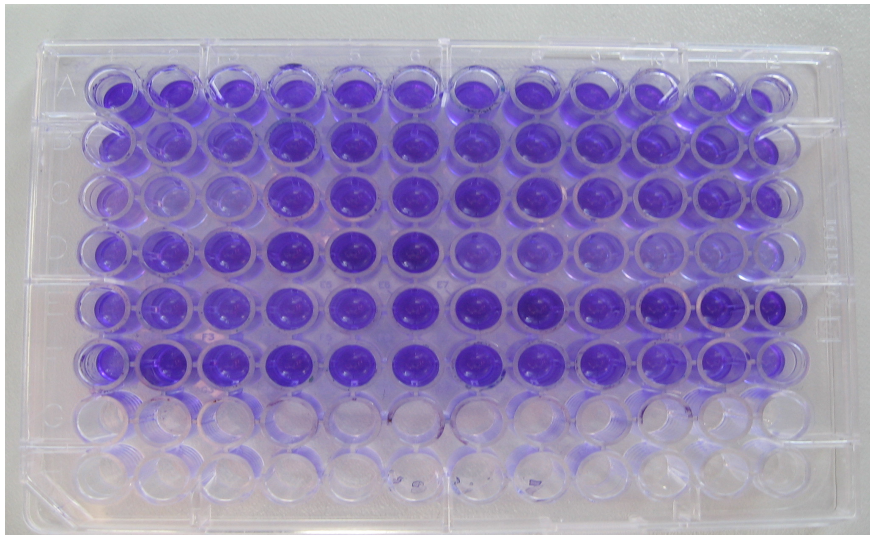
Yapılan değerlendirmeler sonrasında 175 örneğin 101'inde (%57.7) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 74'ünde (%42.3) biyofilm oluşumu pozitif bulundu.

Biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki gösterildi (Tablo-2).

Tablo-2: Örneğin izole edildiği yere göre Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm pozitif ve negatif örneklerin sayıları ve yüzdeleri

Örneğin İzole Edildiği Yer	Biyofilm			
	negatif		pozitif	
	n	(%)	n	(%)
Yara (n=87)	34	(39.1)	53	(60.9)
Kan (n=25)	17	(68.0)	8	(32.0)
Trakeal aspirat (n=35)	31	(88.6)	4	(11.4)
Balgam (n=10)	7	(70.0)	3	(30.0)
Kateter (n=8)	7	(87.5)	1	(12.5)
Diğer (n=10)	5	(50.0)	5	(50.0)
TOPLAM (n=175)	101	(57.7)	74	(42.3)

Mikrotitrasyon plağı yönteminde; 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirildi (Şekil-7).



Şekil 7: Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilmesi.

Kontrol suşlar dikkate alınarak; biyofilm oluşturmayan *S.epidermidis* 12228'e eşit ve altında absorbands verenler negatif, güçlü biyofilm oluşturduğu bilinen *S.epidermidis* 35984'e eşit ve üzerinde absorbands verenler güçlü ve her iki kontrol arasında absorbands verenler orta derece biyofilm üreten suşlar olarak değerlendirildi.

Kristal viyole kullanılarak yapılan absorbands ölçümlerine göre örneklerin 34'ünde (%19.4) biyofilm üretimi negatif, 112'sinde (%64.0) orta derece biyofilm üretimi ve 29'unda (%16.6) güçlü biyofilm üretimi belirlendi. Biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanılarak değerlendirildiğinde, çalışma kapsamına alınan en kalabalık grup olan yara örneklerinin biyofilm üretim oranları; %20.8'i güçlü biyofilm pozitif, %66.6'sı orta derecede biyofilm pozitif ve %12.6'sı biyofilm negatif olarak saptandı. Trakeal örneklerde mikrotitrasyon plağı yöntemine göre biyofilm üreten suş oranları; %17.1'i güçlü biyofilm pozitif, %54.3'ü orta derecede biyofilm pozitif ve %28.6'sı biyofilm negatif olarak saptandı. Kateter örneklerinin mikrotitrasyon plağı yönteminde %87.5 biyofilm pozitif (tamamı orta derecede) saptandı (Tablo-3).

Tablo-3: Örneklerin izole edildiği yer dikkate alındığında, mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanılarak kontrol suşların absorbands ölçümlerine göre biyofilm negatif, orta derece ve güçlü pozitif örneklerin sayıları ve yüzdeleri.

Örneğin İzole Edildiği Yer	Biyofilm					
	negatif		orta derece pozitif		güçlü pozitif	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Yara (n=87)	11	(12.6)	58	(66.6)	18	(20.8)
Kan (n=25)	6	(24.0)	17	(68.0)	2	(8.0)
Trakea (n=35)	10	(28.6)	19	(54.3)	6	(17.1)
Balgam (n=10)	3	(30.0)	6	(60.0)	1	(10.0)
Kateter (n=8)	1	(12.5)	7	(87.5)	0	(0.0)
Diğer (n=10)	3	(30.0)	5	(50.0)	2	(20.0)
TOPLAM (n=175)	34	(19.4)	112	(64.0)	29	(16.6)

Kongo kırmızılı agar besiyeri kullanılarak yapılan değerlendirmede 175 örneğin 101'inde (%57.7) biyofilm üretimi negatif bulunurken, mikrotitrasyon plağı kullanılarak ölçülen absorbanslarına göre örneklerin 34'ünde (%19.4) biyofilm üretimi negatif belirlendi. Kongo kırmızılı agar besiyerinde örneklerin 74'ü (%42.3) biyofilm pozitif bulunurken, kristal viyole kullanılarak yapılan mikrotitrasyon plağı yönteminde örneklerin 112'sinde (%64.0) orta derece biyofilm üretimi ve 29'unda (%16.6) güçlü biyofilm üretimi belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile absorbans ölçümü yapılarak, Kongo kırmızılı agar besiyerindeki 101 biyofilm negatif örneğin; yalnızca 29'u biyofilm negatif bulunurken, 59 izolatta orta derecede biyofilm ve 13 izolatta da güçlü biyofilm üretimi belirlendi. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile absorbans ölçümü yapılarak, Kongo kırmızılı agar besiyerindeki 74 biyofilm pozitif örneğin; 53'ünde orta derecede biyofilm, 16'sında güçlü biyofilm üretimi bulunurken, 5 izolatta biyofilm üretimi negatif ölçüldü. Mikrotitrasyon plağı yönteminde yapılan değerlendirme sonucu güçlü ve orta derece biyofilm üretimi gösteren suşlar biyofilm pozitif olarak gruplandırıldı (Tablo-4).

Tablo-4: Biyofilm üreten suşların belirlenmesinde Kongo kırmızılı agar besiyeri ile mikrotitrasyon plağı yönteminin karşılaştırılması.

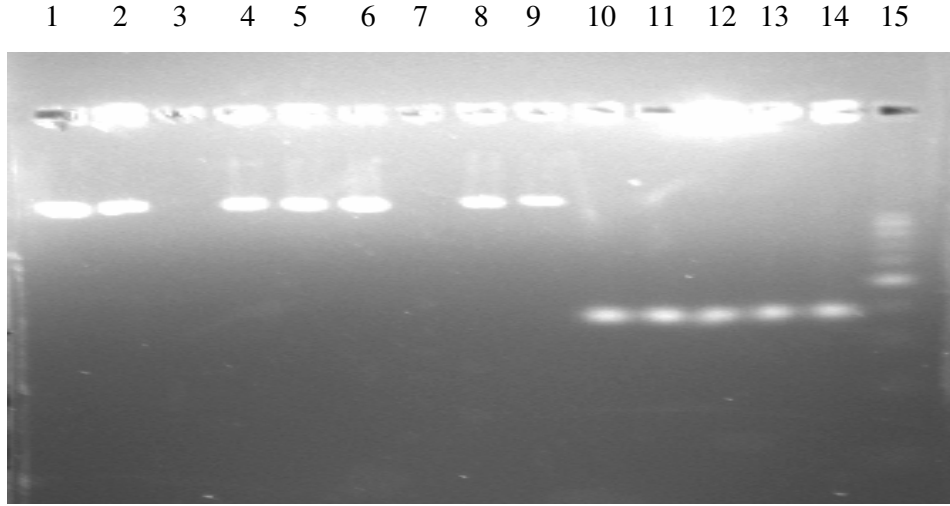
	Biyofilm	Mikrotitrasyon plağı yöntemi		
		pozitif	negatif	TOPLAM
Kongo kırmızılı agar	pozitif	69	5	74
	negatif	72	29	101
	TOPLAM	141	34	175

Biyofilm oluşumunun tespitinde kullanılan mikrotitrasyon plağı yöntemi ve kongo kırmızılı agar besiyeri arasında anlamlı fark saptandı ( $p < 0.001$ ).

## 2- Biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan genlerin araştırılması

PCR çalışmasında, biyofilm üretimi Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilen 152 *S.aureus* suşu dahil edildi. Bu suşlarda biyofilm oluşumunda görev yaptığı düşünülen *icaA*, *icaD* ve *bap* genleri araştırıldı. Pozitif kontrol olarak *icaA* ve *icaD* genlerini taşıyan *S.aureus* ATCC 35984, *bap* geni bulduran *S.aureus* V329 ve negatif kontrol olarak *icaA* ve *icaD* genlerini taşımayan *S.aureus* ATCC 12228 kullanıldı.

Çalışmaya alınan 152 izolatın 136'sında (%89.5), pozitif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* ATCC 35984 ve *S.aureus* V329 suşunda *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinde saptandı. Çalışmaya alınan 152 izolatın 16'sında (%10.5) ve negatif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* ATCC 12228 suşunda *icaA* ve *icaD* genleri saptanamadı (Şekil 8).



Şekil 8: *icaA* (1315 bp) ve *icaD* (381 bp) geni araştırması ( 1. ve 10. bant: *icaA* ve *icaD* pozitif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 35984) ; 3. bant: *icaA* ve *icaD* negatif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 12228); 2,4,5,6,8,9. bantlar: *icaA* pozitif hasta izolatları; 7. bant : *icaA* negatif hasta izolatı; 11,12,13,14. bant: *icaD* pozitif hasta izolatları; 15. bant: marker)

Kongo kırmızılı agar besiyerinde; biyofilm pozitif olarak değerlendirilen 66 izolatın 65'inde (%98.5) *icaA* ve *icaD* geni bulunurken, yalnızca 1 (%1.5) izolatta

bulunamadı. Biyofilm negatif olarak değerlendirilen 86 izolatın ise 71'inde (%82.6) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 15 (%17.4) izolatta her iki gende saptanamadı (Tablo-5).

Tablo-5: Biyofilm üretimi (Kongo kırmızılı agar besiyerinde) ile ica genlerinin ilişkisi.

		icaA ve icaD genleri		
		pozitif	negatif	TOPLAM
Biyofilm	pozitif	65	1	66
	negatif	71	15	86
TOPLAM		136	16	152

Kongo kırmızılı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında zayıf-orta derecede ilişki bulundu ( $r=0.257$ ,  $p=0.001$ ).

Mikrotitrasyon plağı yönteminde biyofilm güçlü pozitif olarak değerlendirilen 25 izolatın tamamında icaA ve icaD geni bulundu. Orta derecede biyofilm pozitif olan 95 izolatın 93'ünde (%97.9) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 2 örnekte her iki gende saptanamadı. Biyofilm negatif olarak değerlendirilen 32 izolatın ise 18'inde (%56.3) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 14'ünde (%43.8) izolatta her iki gende saptanamadı (Tablo-6).

Tablo-6: Biyofilm üretimi (Mikrotitrasyon plağı yönteminde) ile ica genlerinin ilişkisi.

		icaA ve icaD genleri		
		Pozitif	Negatif	TOPLAM
Biyofilm	Güçlü pozitif	25	0	25
	Orta derece pozitif	93	2	95
	Negatif	18	14	32
TOPLAM		132	16	152

Biyofilm üretimi pozitif toplam 120 izolattın 118'inde (%98.3) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, yalnızca 2 izolatta (%1.7) her iki gende saptanmadı. Mikrotitrasyon plağı yönteminde değerlendirilen biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.559$ ,  $p<0.001$ ).

İki yöntemden herhangi birisinde biyofilm üretimi gösterilen izolat biyofilm pozitif olarak, her iki yöntemde de biyofilm varlığı gösteremeyen izolatlar biyofilm negatif olarak gruplandırıldı (Tablo-7).

Tablo-7: Biyofilm üretimi ile ica genleri arasındaki ilişki.

		icaA ve icaD genleri		
		pozitif	negatif	TOPLAM
Biyofilm	pozitif	121	2	123
	negatif	15	14	29
TOPLAM		136	16	152

Buna göre biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.597$ ,  $p=0.001$ ).

Çalışılan izolatların her iki yöntemle de biyofilm oluşumu gösterilenler biyofilm pozitif ve her iki yöntemle de biyofilm oluşumu gösterilemeyenler biyofilm negatif olarak gruplandırıldı. Buna göre; 63 biyofilm pozitif izolatın 62'sinde (%98.4) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde pozitif saptanırken, 1'sinde (%1.6) her iki gen de negatif bulundu. 29 biyofilm negatif örneğin 15'inde (%51.7) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde pozitif saptanırken, 14'inde (%48.3) her iki gen de negatif bulundu (Tablo-8).

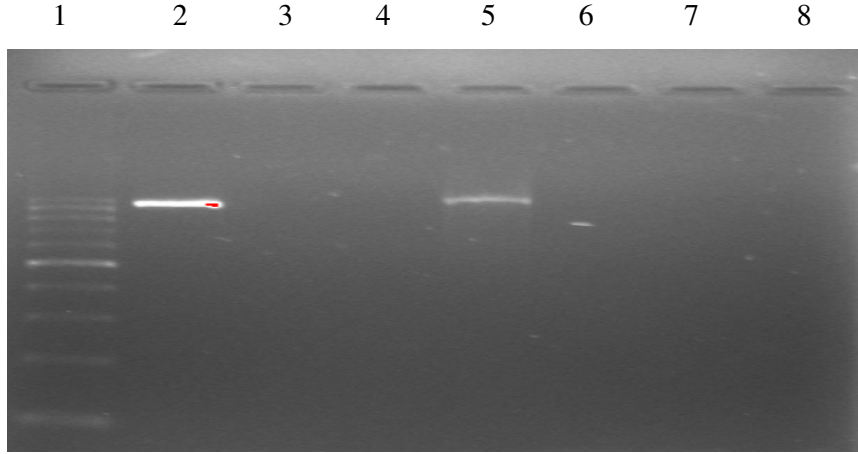
Tablo-8: Biyofilm üretimi ile ica genleri arasındaki ilişki.

	icaA ve icaD genleri			
	pozitif	negatif	TOPLAM	
Biyofilm	pozitif	62	1	63
	negatif	15	14	29
TOPLAM		77	15	92

Bu sonuçlarla biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.587$ ,  $p<0.001$ ).

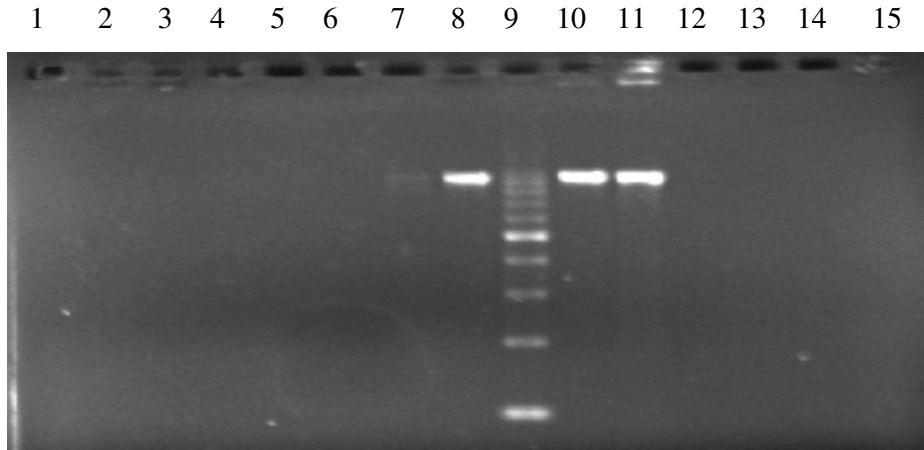
Çalışmaya alınan 152 izolatın yalnızca 1'inde (%0.7) ve pozitif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* V329 suşunda bap geni saptandı. Diğer 151 izolatta (%99.3), *S.aureus* ATCC 35984 ve *S.aureus* ATCC 12228 kontrol suşlarında bap geni saptanamadı (Şekil 9).





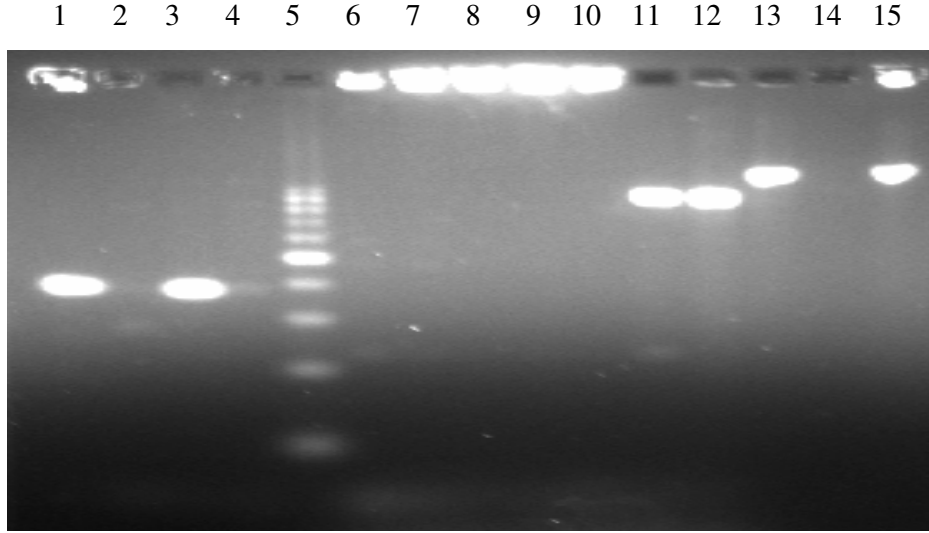
Şekil 9: Bap (971 bp) geni araştırması ( 1.bant: marker; 2.bant: pozitif kontrol *S.aureus* V329; 3,4,6,7,8.bantlar: bap negatif hasta izolatları, 5.bant: bap pozitif hasta izolatu).

Bap pozitif hasta izolatu tekrar pasajlanarak DNA'sı yeniden izole edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* V329 suşu, bap pozitif örneğin önceki ve yeni DNA izolatu, diğer hasta izolatları ile birlikte tekrar amplifiye edilerek jel elektroforezde yürütüldü. *S.aureus* V329 suşu ve bap pozitif hasta örneğinin her iki izolatu da pozitif bulunurken, diğer hasta örneklerinde bap geni saptanamadı (Şekil 10).



Şekil 10: Bap (971 bp) geni araştırması ( 9.bant: marker; 8.bant: pozitif kontrol (*S.aureus* V329); 1,2,3,4,5,6,7,12,13,14,15.bantlar: bap negatif hasta izolatları; 10.bant: bap pozitif hasta izolatu; 11.bant: bap pozitif hasta izolatının tekrar çalışması).

IcaA, icaD, bap geni pozitif (*S.epidermidis* ATCC 35984, *S.aureus* V329) ve negatif kontroller (*S.epidermidis* ATCC 12228), hasta izolatları ile birlikte jel elektroforezde yürütülerek görüntülendi (Şekil 11).



Şekil 11: icaA, icaD ve bap geni araştırması (1.bant: icaD pozitif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 35984) ; 2.bant: icaD negatif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 12228); 3.bant: icaD pozitif hasta izolatı; 4.bant: icaD negatif hasta izolatı; 5.bant: marker; 6,7,8,9,10.bant: bap negatif hasta izolatları; 11.bant: bap pozitif kontrol (*S.aureus* V329); 12.bant: bap pozitif hasta izolatı; 13.bant: icaA pozitif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 35984); 14.bant: icaA negatif kontrol (*S.epidermidis* ATCC 12228); 15.bant: icaA pozitif hasta izolatı)

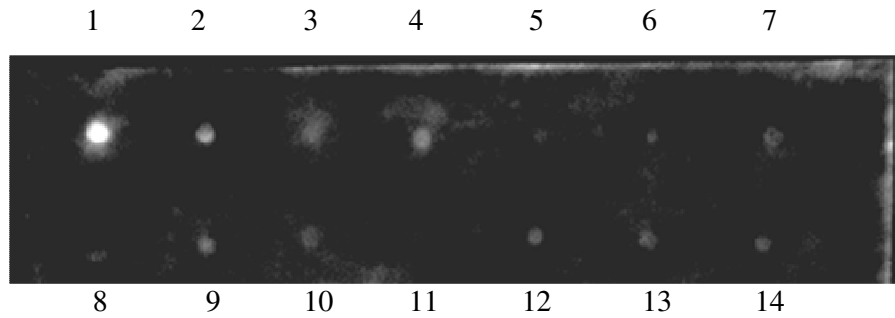
Örneklerin izole edildiği bölgelere göre icaA ve icaD genlerinin varlığı araştırıldı. En büyük grup olan 78 yara örneğinin 76'sında (%97.4) her iki gen bulunurken, yalnızca 2'sinde (%2.6) saptanmadı. Kan örneklerinin 17'sinde (%81) bulunurken, 4 (%19) tanesinde her iki gen de tespit edilmedi. Trakeal izolatların 26'sında (%89.7) her iki gen de saptanırken, 3 (%10.3) izolatta saptanmadı. Balgam örneklerinin 5'inde (%71.4) her iki gen de bulunurken, 2'sinde (%28.6) tespit edilmedi. Kateter örneklerinin 6'sında (%85.7) her iki gen de bulunurken, 1'inde (%14.3) saptanmadı. Diğer 10 örneğin 6'sında (%60) her iki gen saptanırken, 4'ünde (%40) saptanmadı (Tablo-9).

Tablo-9: Örneklerin izole edildiği bölgelere İcaA ve icaD genlerinin oranları.

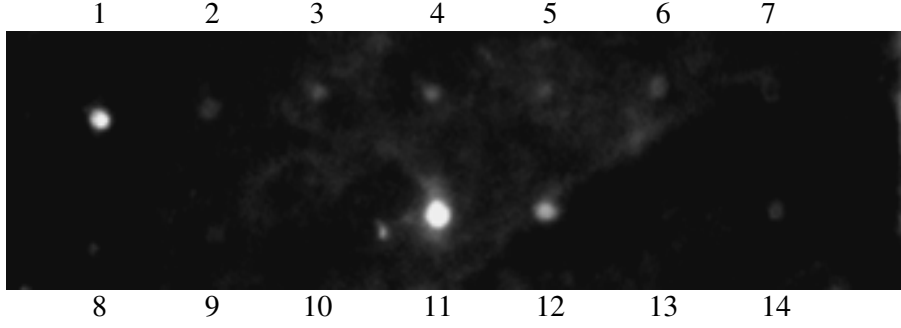
Örneğin İzole Edildiği Yer	icaA ve icaD genleri			
	negatif		pozitif	
	n	%	n	%
Yara (n=78)	2	(2.6)	76	(97.4)
Kan (n=21)	4	(19.0)	17	(81.0)
Trakeal aspirat (n=29)	3	(10.3)	26	(89.7)
Balgam (n=7)	2	(28.6)	5	(71.4)
Kateter (n=7)	1	(14.3)	6	(85.7)
Diğer (n=10)	4	(40.0)	6	(60.0)
TOPLAM (n=152)	16	(10.5)	136	(89.5)

### 3- Polisakkarit intersellüler adezin (PIA/PNAG) üretiminin araştırılması

PIA varlığı bileşimindeki PNAG yapısı kemilüminesans dot-blot yöntemle tespit edildi. Çalışmada kullanılan pozitif kontrol *S.epidermidis* ATCC 35984 ve ica genleri pozitif 42 izolatuın tamamında PNAG gösterildi. Negatif kontrol olarak kullanılan *S.epidermidis* ATCC 12228 ve ica genleri belirlenemeyen 8 klinik izolatta PNAG tespit edilmedi. Çalışılan dilüsyonlarda PNAG üretimi tespit edilen 42 klinik izolattan 12'sinde pozitif kontrole eşit, 30 izolatta ise daha zayıf ışığa görüldü (Şekil 12-13).



Şekil 12: PIA/PNAG varlığının kemilüminesans dot-blot yöntemle gösterilmesi. (1:pozitif kontrol; 8:negatif kontrol; 2,4,6,7,9,10,12,13,14 pozitif klinik izolatlar; 3,5,11 negatif klinik izolatlar).



Şekil 13: PIA/PNAG varlığının kemilümünesans dot-blot yöntemle gösterilmesi. (1,11,12 güçlü pozitif klinik izolatlar; 2,3,4,5,6,14 zayıf pozitif klinik izolatlar; 7,8,9,10,13 negatif klinik izolatlar)

*4-Çalışılan Antibiyotiklerin (vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinupristin ve dalfopristin/quinupristin) Biyofilm Oluşturmuş S.aureus Şuşlarına Etkileri:*

Bu amaçla 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kullanılarak güçlü biyofilm oluşturan 8 klinik suş (*S.epidermidis* ATCC 35984'ün oluşturduğu biyofilm miktarı esas alınarak eşit ve daha yüksek absorbansa sahip) ve 5 kontrol suşu (*S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *S.epidemidis* ATCC 35984, *S.epidermidis* ATCC 12228 ve *S.aureus* V329) çalışmada kullanıldı. Çalışılan antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri ve biyofilm oluşturmuş suşlar üzerine etkileri karşılaştırıldı. Elde edilen MİK değerleri ve BMİK değerleri verildi (Tablo-10). İzolatların %50'sini inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK<sub>50</sub>, %90'nını inhibe eden en düşük konsantrasyon ise MİK<sub>90</sub> olarak tanımlandı.

Tablo-10: Çalışılan standart ve klinik izolatların MİK\* ve BMİK\*\* değerleri.

	Vankomisin		Linezolid		Dalfopristin		Quinupristin		D/Q***	
	MİK	BMİK	MİK	BMİK	MİK	BMİK	MİK	BMİK	MİK	BMİK
1.	2	64	2	16	2	>1280	32	>1280	0.25	32
2.	2	64	2	16	4	>1280	1	>1280	0.25	8
3.	1	32	2	16	4	>1280	1	>1280	0.25	8
4.	1	64	8	64	16	>1280	8	>1280	1	32
5.	1	>1280	4	>1280	4	>1280	2	>1280	0.25	64
Suş-1	0.5	16	0.5	16	1	>1280	1	>1280	0.25	4
Suş-2	2	32	4	8	8	>1280	4	>1280	0.5	2
Suş-3	1	>1280	4	32	8	>1280	1	>1280	0.5	8
Suş-4	1	64	4	16	16	>1280	4	>1280	1	16
Suş-5	1	32	2	32	2	>1280	0.5	640	0.25	4
Suş-6	1	16	2	32	8	>1280	2	>1280	0.5	8
Suş-7	1	32	2	16	8	>1280	2	>1280	0.5	8
Suş-8	1	640	2	640	8	>1280	4	>1280	0.5	640

(1.*S.epidermidis* ATCC 35984, 2.*S.aureus* V329, 3.*S.epidermidis* ATCC 12228, 4.*S.aureus* ATCC 25923, 5.*S.aureus* ATCC 29213)

\*MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/ml)

\*\*BMİK: Biyofilm minimal inhibitör konsantrasyon (µg/ml)

\*\*\*D/Q: dalfopristin/quinupristin

Klinik izolatlar için vankomisin MİK<sub>50</sub> değeri 1 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml, linezolid MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 4 µg/ml, dalfopristin MİK<sub>50</sub> değeri 8 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 16 µg/ml, quinupristin MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 4 µg/ml, dalfopristin/quinupristin MİK<sub>50</sub> değeri 0.5 µg/ml ve MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak hesaplandı. Buna göre klinik izolatların, vankomisin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 16 µg/ml, linezolid için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 8 µg/ml, dalfopristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 160 katı olarak 640 µg/ml ve

dalfopristin/quinupristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 2 µg/ml bulundu. Elde edilen MİK değerleri ve aynı suşların MBEK değerleri verildi (Tablo-11).

Tablo-11:Çalışılan standart ve klinik izolatların MİK\* ve MBEK\*\* değerleri.

	Vankomisin		Linezolid		Dalfopristin		Quinupristin		D/Q***	
	MİK	MBEK	MİK	MBEK	MİK	MBEK	MİK	MBEK	MİK	MBEK
1.	2	640	2	64	2	>1280	32	>1280	0.25	64
2.	2	640	2	64	4	>1280	1	>1280	0.25	32
3.	1	640	2	64	4	>1280	1	>1280	0.25	32
4.	1	640	8	640	16	>1280	8	>1280	1	64
5.	1	>1280	4	>1280	4	>1280	2	>1280	0.25	640
Suş-1	0.5	64	0.5	64	1	>1280	1	>1280	0.25	16
Suş-2	2	64	4	64	8	>1280	4	>1280	0.5	8
Suş-3	1	>1280	4	640	8	>1280	1	>1280	0.5	32
Suş-4	1	640	4	64	16	>1280	4	>1280	1	64
Suş-5	1	64	2	640	2	>1280	0.5	>1280	0.25	16
Suş-6	1	64	2	640	8	>1280	2	>1280	0.5	32
Suş-7	1	64	2	64	8	>1280	2	>1280	0.5	32
Suş-8	1	>1280	2	>1280	8	>1280	4	>1280	0.5	1280

(1.*S.epidermidis* ATCC 35984, 2.*S.aureus* V329, 3.*S.epidermidis* ATCC 12228, 4.*S.aureus* ATCC 25923, 5.*S.aureus* ATCC 29213)

\*MİK: Minumum inhibitör konsantrasyon (µg/ml)

\*\*MBEK: Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyon (µg/ml)

\*\*\*D/Q: Dalfopristin/quinupristin

Buna göre klinik izolatların, vankomisin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 64 µg/ml, linezolid için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 16 katı olarak 64 µg/ml, dalfopristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 320 katının üzerinde >1280 µg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 8 µg/ml bulundu.

## TARTIŞMA

İnsanlar, *S.aureus*'un doğal rezervuarıdır. *S.aureus* sağlıklı yetişkinlerin %30-50'sinde kolonizedir ve %10-20 dirençli kolonizasyon göstermektedir. Metisilin duyarlı (MSSA) ve metisilin dirençli (MRSA) izolatlarının her ikisi de dirençli kolonizasyon gösterebilmektedir. Kolonize kişiler sonradan oluşacak infeksiyonlar için yüksek risk taşımaktadır. Stafilokokal kolonizasyon oranları tip 1 diyabetli hastalar, intravenöz ilaç kullananlar, hemodiyaliz hastaları, cerrahi hastaları ve immün yetmezlikli hastalarda daha yüksektir. Hastalarda niceliksel veya niteliksel lökosit bozukluğu olduğunda stafilokokal infeksiyonlar için risk daha yüksektir. Nosokomiyal infeksiyonların çoğu hastane personelinin elinden yayılmaktadır. Bunların kendileri taşıyıcı olabileceği gibi infekte hastalarla temasla da infekte edilmiş olabilirler. Salgınlar, uzun dönem taşıyıcılarla veya çevre kaynaklı yayılım sonucu ortaya çıkabilir. Fakat bu tür yayılıma daha az rastlanmaktadır (1,2,6).

*S.aureus* mikrobiyoloji laboratuvarlarından izole edilen en yaygın 5 etkenden birisidir. Uygun antibiyotik tedavisine rağmen *S.aureus* hastane kaynaklı infeksiyonların başta gelen nedenlerindedir. Özellikle metisiline dirençli suşlar tedavisi güç, morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açarlar. Stafilokoklar (*S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar) kan akımı infeksiyonlarının yaklaşık 1/3'ünden sorumludur. *S. aureus* sıklıkla yara infeksiyonu, osteomyelit, endokardit ve sepsise yol açarken, koagülaz negatif stafilokoklar yabancı cisim infeksiyonu ve nozokomiyal bakteriyemilerde ilk sıralarda yer almaktadır (6,68-70).

*S.aureus* doğal dokularda ve medikal alet, implant gibi yabancı materyallerde biyofilm oluşumuna neden olarak tedavisi güç infeksiyonlara yol açmaktadır. Biyofilm oluşumu en az üç basamakta gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında mikroorganizmanın normal doku ve yabancı materyal yüzeyine adezyonu, ikinci aşamada yüzeylerde hücre proliferasyonu ve ekzopolisakkarit madde sentezi, üçüncü ve son aşamada içerisinde beslenme ve atıkların uzaklaştırılmasında sağlayan kanalların bulunduğu üç boyutlu bir yapı oluşmaktadır. Bu yapı hakkında çok fazla bilgi olmamasına rağmen, konfokal mikroskopi ile üç boyutlu yapısı görüntülenebilmektedir (56,71).

Yabancı materyallere yapışmada rol oynayan mikrobiyal hücrelerden salgılanan ekzopolisakkaridler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar göstermektedir. Bakterinin yüzey polisakkarid yapısı slime olarak da adlandırılan biyofilmin (glikokaliks) ana yapısını oluşturmaktadır (23). Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve  $0,5 - 2,0 \times 10^6$  Da'luk moleküler bir yapıya sahiptirler. Biyofilm preparatlarında polisakkaridler bakteriyel hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde izlenmektedir (34).

Birçok türde, biyofilm anyonik yapıda olup esansiyal mineraller ve besinlerin etraftan yakalanarak yoğunlaştırılmasını sağlayan bir sistem oluşturmaktadır. Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup, bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin aderansını ve korunmasını sağlamaktadır. Primer adezyon olarak adlandırılan, bir çok fizikokimyasal değişkenin rol oynadığı bu bağlanma geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanmadır. Bakteri ve uygun inert yüzeyler arasında oluşmaktadır. Adezyonun oluşması için öncelikle bakteri, inert yüzeye yeteri kadar yaklaşabilmelidir ( $<1\text{nm}$ ). Bundan sonra adezyonun oluşumu her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak gelişmektedir. Burada elektrostatik, hidrofobik ilişki, van der Waals gücü, ısı ve hidrodinamik güç önemlidir. Bakterilerin hemen tümü ve inert yüzeyler negatif şarja sahip olup birbirleri için aslında itme gücü oluşturmaktadır. Primer aderanstaki en önemli faktörün bakteri ve yüzeyler arası hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir. Sekonder adezyon bakteri yüzeyindeki pili, fimbria veya fibriller gibi ligandların ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan özgül ve geri dönüşümsüz bağlanmadır. Biyofilmin maturasyonu, bakterinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmasından sonra başlamaktadır. Biyofilm geliştikçe bakterinin aderans ve motilite faktörlerinin salınımında da baskılanma olmaktadır (23,25).

Biyofilm ile ilişkili organizmaların insanda hangi mekanizmalarla hastalığa yol açtığı halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Öne sürülen mekanizmalar arasında medikal cihazlar (implantlar) üzerindeki biyofilmden kopan hücre veya hücre kümelerinin kanda veya üriner sistemde enfeksiyona neden olmaları, endotoksin üretimi, konak bağışıklık sistemine karşı yapısal direnç göstererek varlığını



sürdürme, biyofilm içerisinde direnç plazmidi değişimi yapmak aracılığıyla, antimikrobiyal madde direnci kazanarak varlığını sürdürme bulunmaktadır. Planktonik bakteriyel hücreler biyofilmlerden salınmaktadır ve biyofilmden kopma işleminin doğal olarak programlanmış bir olay olduğu görüşünü destekleyen kanıtlar vardır. Bu nedenle, biyofilmler akut enfeksiyon için bir 'nidus' görevi görerek, salınan planktonik hücrelerin konak savunma mekanizmalarının başarısız kaldığı durumlarda akut enfeksiyon gelişimine neden olabilmektedirler (9,26).

Biyofilmler tercihen inert yüzeylerde veya ölü bir doku üzerinde yerleşmektedir. Genellikle medikal aygıtlar ve kemik sekestrasyonları gibi ölü doku fragmanları üzerinde oluşmaktadır. Endokardit olayında olduğu gibi canlı dokularda da yerleşebilmektedir (9). *S.aureus*, intravasküler kateter ve prostetik kalp kapakçıklarının bakteriyel inokülasyonuna bağlı olarak en yaygın nosokomiyal patojenlerdendir. Eklem protezleri, ‘‘pacemakerlar’’, kalp kapakçıkları, vasküler stentler, üriner kateterler, santral venöz kateterler ve oftalmik implantlar üzerinde biyofilm oluşumu izlendiğine dair bir çok yayın bulunmaktadır (6,26).

Biyofilm gelişim sürecinin moleküler düzenlenmesi ve antibiyotik direnç mekanizmaları farklı araştırmacılar tarafından birçok kez araştırılırken, farklı örneklerden izole edilen suşların biyofilm üretme oranları hakkında literatürde kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Ammendolia ve ark. (10) mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada 63 insan kaynaklı klinik *S.aureus* suşunun 56’sını (%88.9) biyofilm pozitif, 7’sini (%11.1) biyofilm negatif bulmuşlardır. Aynı çalışmada kullandıkları *S.aureus* suşlarında KNS suşlarından daha yüksek oranda (%88.9-66.1) biyofilm üretimi tespit etmişlerdir. Çalışmalarında 5 kateter örneğinin 2’sinde (%40.0), 33 ortopedik implant örneğinin 32’sinde (%97.0), 2 peritoneal diyaliz örneğinin ikisinde de, 9 idrar örneğinin 7’sinde (%77.8), 12 boğaz ve burun sürüntüsünün tamamında, 2 yara örneğinin 1’inde biyofilm üretimi saptamışlardır. Özellikle ortopedik implant infeksiyonlarında biyofilm oluşumunun önemi bu araştırmacıların bulgularında da gösterilmiştir.

Votava ve ark. (72) Kongo kırmızılı agar besiyerinde kan kültüründen izole edilen 32 *S.aureus* suşunun 18’ini (%56.2) biyofilm pozitif değerlendirmiştir.

Catalanotti ve ark. (73) bilateral konjonktivitli soft kontakt lens kullanan kişilerin sürüntü örneklerinden izole edilen *S.aureus* suşlarının %61.1'inde biyofilm üretimini göstermişlerdir. Arciola ve ark. (74) protez infeksiyonlarından izole edilen 15 *S.aureus* suşunun 11'ini (%73.0) ve 15 *S.epidermidis* izolatının 9'unu (%60.0) biyofilm pozitif bulmuşlardır. Kontrol grubu olarak deri ve mukozadan izole edilen 10 stafilokok suşunun hiçbirinde biyofilm üretimi tespit edememişlerdir. Yazdani ve ark. (75) yara infeksiyonlarından izole ettiği 50 *S.aureus* suşunun Kongo kırmızılı agar besiyerinde 27'sini (%54.0) biyofilm pozitif, 23'ünü (%46.0) biyofilm negatif bulmuşlardır. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle kantitatif değerlendirmede 50 *S.aureus* suşunun 26'sını (%52.0) biyofilm pozitif, 24'ü (%48.0) biyofilm negatif bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 175 *S.aureus* suşu kullanıldı. Bu suşların 87'si yara (%49.7), 25'i kan kültürü (%14.3), 35'i trakeal aspirat (%20.0), 10'u balgam (%5.7), 8'i kateter (%4.6) ve kalan 10 tanesi de (%5.7) çeşitli klinik örneklerden (göz, idrar, burun sürüntüsü gibi) izole edildi. Çalışmamızda biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, çalışma kapsamına alınan en kalabalık grup olan yara örneklerinin Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm üretim oranı %60.9'la en yüksek bulunurken, trakeal örneklerin ise %11.4'le en düşük saptandı (Tablo-2). Yara örneklerinin mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanıldığında biyofilm üretim oranları; %20.8 güçlü biyofilm pozitif, %66.6 orta derecede biyofilm pozitif ve %12.6'sı biyofilm negatif saptandı. Trakeal örneklerde biyofilm üreten suş oranı, mikrotitrasyon plağı yönteminde yüksek (%17.1'inde güçlü biyofilm pozitif, %54.3'ünde orta derecede biyofilm pozitif ve %28.6'sı biyofilm negatif) bulundu (Tablo-3). Kongo kırmızılı agar besiyerine göre mikrotitrasyon plağı yönteminde trakeal aspirat örneklerinde toplam biyofilm oluşturan suş oranında büyük artış (%71.4) saptandı. Kongo kırmızılı agar besiyerinde kateter izolatlarının yalnızca %12.5 biyofilm pozitif bulunurken, mikrotitrasyon plağı yönteminde örneklerin %87.5'u biyofilm pozitif (hepsi orta derecede) saptandı. Kateter örneklerinde de Kongo kırmızılı agar besiyeriyle mikrotitrasyon plağı yöntemi arasında biyofilm oluşturan suş oranında belirgin fark görüldü. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Duyarlılığı daha yüksek olarak kabul

edilen mikrotitrasyon plağı yöntemi dikkate alındığında özellikle kateter ve yara yerinden izole edilen örneklerde biyofilm oluşturma oranının yüksek bulunmasının, stafilokoklara bağlı infeksiyon oluşumunda yabancı cisimlere yapışarak tedavisi güç infeksiyonlara neden olan biyofilmin önemini gösteren bulgular olarak değerlendirilmiştir.

Kongo kırmızısı, benzidin ve naftionik asit kombinasyonundan oluşan boyar maddedir. Kongo kırmızılı agar besiyerinin biyofilm üretiminin belirlenmesindeki mekanizması tam açıklanamamış olmakla birlikte Kongo kırmızısının polisakkaritlere, sialik asit ve amiloide afinite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle polisakkarit yapısında olan biyofilm ve Kongo kırmızısı kombinasyonuyla koyu kristalize renk elde edilmektedir. Yapılan bir çalışmada Kongo kırmızılı agar besiyerinde 72 saatlik takip sonucunda 23 *S.aureus* suşunun 14'ünde (%60.8) biyofilm oluşumunu tespit etmişlerdir. Örneklerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda siyah koloni oluşturan iki *S.aureus* suşunun 48 saatlik takibinde merkezi siyah etrafının kırmızıya döndüğü görülmüştür. Bunların ica genleri gösterilmiş ve faz varyantları olarak bildirilmiştir (11). Szymankiewicz ve ark. (76) Kongo kırmızılı agar besiyerinde değişik klinik örneklerden izole ettikleri 62 *S.aureus* suşunun 31'inde (%50.0) biyofilm üretimini pozitif bulmuşlardır.

Vasudevan ve ark. (77) Kongo kırmızılı agar besiyeri kullanarak araştırdığı 35 *S.aureus* suşunun 32'sinde biyofilm pozitif gösterirken, mikrotitrasyon plağı yöntemiyle yalnızca 24'ünde biyofilm pozitif bildirmişlerdir. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm negatif bulunan üç izolattan ikisini negatif, diğer suşu ise biyofilm pozitif değerlendirmişlerdir.

Bir çalışmada 128 ica pozitif suşun doku kültürü mikrotitrasyon plağı, tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar kullanarak araştırıldığında; tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plağı yöntemini uyumlu bulurken, Kongo kırmızılı agar besiyerini uyumlu bulmamışlardır (78). Arciola ve ark. (74,79) Kongo kırmızılı agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonucu siyah olan kolonilerde, 48 saatlik inkübasyon sonucu merkezinde pempe veya kırmızı renk değişimi görülebildiğini ve bu durumun faz değişiminden kaynaklandığını bildirilmişlerdir. Faz değişimi görülen

suşlarla yapılan çalışmalarda; insersiyonel mutasyonla (IS256 bölgesi) icaC geninin inaktive olması buna sebep olarak gösterilmektedir.

Baselga ve ark. (80) mastitli sığırlardan izole edilen 92 *S.aureus* suşunun 11'inde (%12) ve koyundan izole edilen 52 *S.aureus* suşunun 10'unda (%19) biyofilm üretimini göstermişlerdir. 20 biyofilm üretmeyen suşun (10 sığır ve 10 koyundan elde edilen izolat) %2 glukoz içeren TSB içerisinde bir ay süreyle taze besiyeri kullanılarak günlük pasajları sonucunda Kongo kırmızılı agar ve tüp yöntemiyle 3 sığır izolatı ve 4 koyun izolatının biyofilm üreten suşlara dönüştüğünü göstermişlerdir. Bunun tersi olarak biyofilm pozitif suşlarında glukoz içermeyen TSB içerisindeki pasajlarıyla 4 sığır izolatı ve 4 koyun izolatından biyofilm üretmeyen suşlar elde etmişlerdir. Oliveira ve ark. (81) mastit infeksiyonlu sığırlardan izole edilen 16 *S.aureus* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesini Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 16 izolatın 6'sı (%37.5) biyofilm pozitif bulunurken, mikrotitrasyon plağı yöntemiyle 3'ü (%18.75) pozitif bulmuşlardır. Yalnızca 2 izolat her iki yöntemle de pozitif değerlendirmişlerdir.

Mathur ve ark. (82) doku kültürü mikrotitrasyon plağı, tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S.aureus* suşunu biyofilm oluşumu yönünden karşılaştırmışlardır. Mikrotitrasyon plağı yönteminde suşların 22'sini (%14.4) güçlü, 60'ını (%39.4) orta ve 70'ini de (%46.0) biyofilm zayıf veya negatif olarak bulmuşlardır. Tüp yönteminde suşların 18'ini (%11.8) güçlü, 45'ini (%29.6) orta ve 89'unu (%58.6) zayıf veya biyofilm oluşturmayan olarak göstermişler. Kongo kırmızılı agar besiyerinde 152 klinik *S.aureus* suşunu yalnızca 8'ini (%5.2) biyofilm pozitif olarak göstermişler. Bunların 6'sı orta, 2'si güçlü biyofilm oluşturan suşlar olarak bildirilmiştir. Mikrotitrasyon plağı ve Kongo kırmızılı agar besiyeri arasında zayıf bir uyum olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada mikrotitrasyon plağı yönteminde yalnız TSB kullanıldığında 152 klinik *S.aureus* suşunun yalnız 7'si biyofilm oluştururken, %1 glukoz ilave edildiğinde 18 saatlik inkubasyonla 80 ve 24 saatlik inkübasyonla 82 izolatta biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Benzer sonuçlar şeker ilaveli BHI buyyonu kullanıldığında da elde edilmiştir. Bu sonuçlarla

stafilokoklarda biyofilm üretiminin tespiti için Kongo kırmızılı agar besiyerini yetersiz değerlendirmişlerdir.

Çoğunlukla *S.epidermidis* izolatlarında görüldüğü gibi in vitro biyofilm oluşumu ortam şartlarına oldukça duyarlıdır. Örneğin besiyerine glukoz veya glukozamin eklenmesi kuvvetli biyofilm oluşturan suşlarda bile gerekebilmektedir (15,83).

Yaptığımız çalışmada biyofilm üretiminin tespitinde Kongo kırmızılı agar besiyeri ve mikrotitrasyon plağı yöntemi karşılaştırılmıştır. Kongo kırmızılı agar besiyerinde yapılan koloni morfolojisine dayanan fenotipik değerlendirmeler sonrasında 175 örneğin 101'inde (%57.7) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 74'ünde (%42.3) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine dayanan kantitatif değerlendirme sonucunda örneklerin 34'ünde (%19.4) biyofilm üretimi negatif, 112'sinde (%64.0) orta derece biyofilm üretimi ve 29'unda (%16.6) güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir. Mikrotitrasyon plağı yönteminde, Kongo kırmızılı agar besiyerindeki 101 biyofilm negatif örneğin; yalnızca 29'u biyofilm negatif bulunurken, 59 izolatta orta derecede biyofilm ve 13 izolatta da güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir. Mikrotitrasyon plağı yönteminde, Kongo kırmızılı agar besiyerindeki 74 biyofilm pozitif örneğin; 53'ünde orta derecede biyofilm, 16'sında güçlü biyofilm üretimi bulunurken, 5 izolatta biyofilm üretimi negatif ölçülmüştür. Mikrotitrasyon plağı yönteminde, Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm pozitif belirlenen 5 izolatta biyofilm üretiminin gösterilememesi daha önceki çalışmalarda görüldüğü üzere koloni morfolojisi değerlendirmesindeki farklılık ve faz değişiminden (icaC inaktivasyonu) kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ve Kongo kırmızılı agar besiyeri biyofilm üretimini tespit etme yönünden karşılaştırıldığında uyumsuz bulundu ( $p<0.001$ ). Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, mikrotitrasyon plağı yöntemini Kongo kırmızılı agar besiyerine göre daha duyarlı saptanmıştır. Ayrıca faz değişimi, bireysel, görsel koloni morfolojisi değerlendirmeye bağlı farklı sonuçlara yol açmaması ve kantitatif değerlendirmeye olanak sağlamasında mikrotitrasyon plağı yönteminin diğer bir üstünlüğü olarak kabul

edilmiştir. Buna karşın biyofilm üretim oranının kullanılan besiyeri içerisindeki glukoz miktarı ve diğer çevresel koşullarla değişmesi dezavantajı olarak değerlendirilmiştir (10,80,83).

Crampton ve ark. (15) ica genlerinin *S.aureus* ve *S.epidermidis*'de polisakkarit madde  $\beta$ -1-6 glikozaminoglukan zincirinin sentezinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Biyofilm oluşumu hücrelerin solid bir subtrata adezyonu ve takiben çok tabakalı hücre oluşturmasıyla iki adımda gerçekleşir. İlk aşamadan (hücre adezyonu) UDP-N-asetilglukozamin'den sentez edilebilen lineer  $\beta$ -1-6 glikozaminoglukan (PIA/PNAG) sorumludur. PIA/PNAG biyofilm oluşumunda hücre-hücre adezyon basamağında gereklidir. Anaerobik koşullar altında her iki bakteri türünde de ica spesifik mRNA'nın varlığına bağlı olarak polisakkarit sentezinin arttığı gösterilmiştir. *S.aureus* suşlarında ica genlerinin delesyonuna bağlı olarak N-asetilglukozaminiltransferaz aktivitesinin, PIA üretiminin ve dolayısıyla biyofilm oluşturma yeteneğinin kaybolduğunu bildirmişlerdir. Crampton ve ark. (83) yaptıkları çalışmada bir *S.carnosus* suşu hariç diğer tüm stafilokok türlerinde icaADBC genlerini göstermişlerdir. Ica genlerinin veya çevresel şartların varlığına rağmen, birkaç suşta ica lokusunda nokta mutasyonuna bağlı olarak, polisakkarit intersellüler adezin sentezinin negatif regülasyonu dolayısıyla biyofilm oluşturamadığını göstermişlerdir.

Biyofilm oluşumunda ica genleri büyük öneme sahip olduğu gibi başka düzenleyici genler ve çevresel faktörler de etkili olmaktadır. arlRS biyofilm oluşumunu baskılayıcı (negatif regülasyon) gen sistemi olarak bildirilmekte ve arlRS mutant suşlarda başlangıç tutunma aşamasında ve PNAG üretiminde artışa neden olmaktadır. Bu mutant suşlarda biyofilm oluşumu ica gen delesyonundan etkilenmediği bildirilmiştir (84). Yapılan bir çalışmada kullanılan besiyerinde (Hussain-Hastings-White modifiye besiyeri) biyofilm matriksi oluşumu için PNAG üretimini zorunlu görülmemiştir. arlRS mutant suşlarda, stafilokokal düzenleyici gen "staphylococcal accessory regulator" (SarA) mutantlarının biyofilm oluşumunu azalttığı, agr mutanlarının ise artırdığı gösterilmiştir. Hussain-Hastings-White modifiye besiyerinde biyofilm oluşumunda arlRS ve "accessory gene regulator" (agr) negatif düzenleyici rolü olduğu bildirilmiştir. Buna göre stafilokokal biyofilm

oluşumunda tek bir gen bölgesinin değil bir çok negatif ve pozitif düzenleyici genlerin sorumlu olduğunu bildirilmiştir (84). Beenken ve ark. (85) SarA mutantlarda biyofilm oluşturma kapasitesinde belirgin azalma olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmada 8 biyofilm oluşturan suşun 6'sında sarA geninde mutasyonla biyofilm oluşumunda azalma görülürken, birisinde normalde de zayıf biyofilm olumundan dolayı diğerinde ise agr mutasyonundan dolayı biyofilm oluşturmalarında kapasitelerinde azalma gösterilememiştir. Burada da agr mutant suşların biyofilm oluşturma kapasitesini artırdığı bildirilmiştir. Kropec ve ark. (86) SarA proteinlerinin ica genlerinin transkripsiyonunda aktivatör rolü olduğunu göstermişlerdir.

Arciola ve ark. (11) Kongo kırmızılı agar besiyerinde 23 *S.aureus* suşunun 14'ünde biyofilm pozitif olarak değerlendirirken, biyofilm pozitif suşlarda icaA ve icaD genlerinin her ikisini de saptamışlar, biyofilm negatif örneklerin hiçbirisinde genleri tespit edememişlerdir. Rohde ve ark. (87) fenotipik olarak Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm pozitifliği ile icaA ve icaD genlerinin arasında tam uyum olmadığını savunmaktadırlar. Bununla birlikte Vancraeynest ve ark. (7) Kongo kırmızılı agarda biyofilm pozitif bulduğu *S.aureus* suşlarının yalnızca %45.0 icaA ve icaD genlerini saptamışlardır. Bunun nedeninin Kongo kırmızılı agar besiyerindeki koloni morfolojisinin yorumlanmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Vasudevan ve ark. (77) biyofilm pozitif ve negatif toplam 35 izolatu tamamında icaA ve icaD genlerinin bulunduğunu göstermişlerdir. IcaAD pozitif iki izolatta biyofilm üretiminin görülmemesi insersiyonel inaktivasyona veya ica lokusundaki delesyonlara bağlı olabileceği bildirilmiştir. Yazdani ve ark. (75) yara infeksiyonlarından izole ettikleri biyofilm negatif ve biyofilm pozitif 50 *S.aureus* suşunun tamamında icaAD genlerini belirlemişlerdir.

Chaieb ve ark. (88) diyaliz kateterlerinden izole edilen 32 *S.epidermidis* suşunun 16'sında Kongo kırmızılı agarda biyofilm pozitif bildirmişlerdir. Çalışılan 32 suşun 23 tanesinde icaA ve icaD genlerini pozitif bildirmişlerdir. Bunların 15'i biyofilm pozitif, 8 tanesini de biyofilm negatif göstermişlerdir. IcaA ve icaD genleri

negatif 1 izolatın ise biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir. *S.epidermidis*'de biyofilm oluşturma yeteneği ile ica genleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir.

Günümüzde stafilokoklarda biyofilm oluşumundaki mekanizmalardan en iyi anlaşılan icaADBC'nin kodladığı enzimlerin, polisakkarit adezinleri sentezlettiği olarak kabul edilmesine rağmen, Fitzpatrick ve ark. (89) ica genlerinden bağımsız biyofilm oluşumu üzerine çalışmışlardır. BHI buyyon, %1 glukoz ilaveli BHI buyyon ve %4 NaCl ilaveli BHI buyyon kullanılarak 4 MRSA suşunun biyofilm üretme oranları ve ica aktivitesindeki değişimi karşılaştırmışlardır. Çevresel uyarımla icaADBC genlerinin aktivitesindeki değişim ve biyofilm üretimindeki artış her zaman uyumlu bulunmamıştır. Buna karşılık glukoz bağımlı olarak biyofilm üretimindeki artış uyumlu bulunmuştur. Böylece çevresel faktörlerinde, icaADBC'den bağımsız olarak biyofilmin gelişim sürecindeki önemi ortaya çıkarılmıştır. Diğer bir grup araştırmacıda çalışmalarında karbonhidrat kaynağı olarak TSB içerisine glukoz ilavesiyle biyofilm üretiminde dramatik bir artış olduğunu da bildirmişlerdir (10).

Yazdani ve ark. (75) yara infeksiyonlarından izole ettiği biyofilm pozitif (%52.0) ve negatif (%48.0) 50 *S.aureus* suşunun tamamında icaAD genlerini belirlemişlerdir. Catalanotti ve ark. (73) bilateral konjonktivitli soft kontakt lens kullanan kişilerin sürüntü örneklerinden izole edilen *S.aureus* suşlarının %61.1'inde icaA ve icaD genlerini göstermişlerdir. Arciola ve ark. (74) Kongo kırmızılı agar besiyerinde protez infeksiyonlarından izole edilen 30 stafilokok suşundan biyofilm pozitif suşların hepsinde icaA ve icaD genleri tespit etmişlerdir.

Cucarella ve ark. (90) yaptıkları çalışmada sığır mastitinden izole edilen 195 *S.aureus* suşunun 184'ünde (%94.36) icaADBC pozitif bulurken, 50'sinde (%25.6) bap pozitif bulmuşlardır. Bap pozitif izolatların hepsinde ica genleri pozitif tespit edilmiştir. IcaADBC ve bap pozitif olanlar güçlü biyofilm oluştururken, yalnız icaADBC pozitif olanların daha zayıf biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda *S.aureus*'un biyofilm oluşumunda görevli genlerin araştırılmasında kullanılan 152 klinik izolatın 136'sında (%89.5) icaA ve icaD



genlerinin her ikisinde saptandı. Çalışmaya alınan 152 izolatın 16'sında (%10.5) icaA ve icaD genleri saptanmadı. Biyofilm üretiminin tespitinde kullandığımız iki yöntem arasında uyumsuzluk bulduğumuzdan ( $p<0.001$ ) dolayı ica genleri ile biyofilm üretimi arasındaki ilişki her iki yönetime göre ayrı ayrı değerlendirildi.

Kongo kırmızılı agar besiyerinde biyofilm pozitif olarak değerlendirilen 66 izolatın 65'inde (%98.5) icaA ve icaD geni bulunurken, yalnızca 1 (%1.5) izolatta bulunmadı. Biyofilm negatif olarak değerlendirilen 86 izolatın ise 71'inde (%82.6) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 15 (%17.4) izolatta her iki gende saptanmadı (Tablo-5). Kongo kırmızılı besiyerinde değerlendirilen biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında zayıf-orta derecede ilişki bulundu ( $r=0.257$ ,  $p=0.001$ ).

Mikrotitrasyon plağı yönteminde biyofilm güçlü pozitif olarak değerlendirilen 25 izolatın tamamında icaA ve icaD geni bulundu. Orta derecede biyofilm pozitif olan 95 izolatın 93'ünde (%97.9) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 2 örnekte her iki gen de saptanmadı. Biyofilm negatif olarak değerlendirilen 32 izolatın ise 18'inde (%56.3) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, 14'ünde (%43.8) izolatta her iki gen de saptanmadı (Tablo-6). Biyofilm üretimi pozitif toplam 120 izolatın 118'inde (%98.3) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde bulunurken, yalnızca 2 izolatta (%1.7) her iki gen de saptanmadı. Mikrotitrasyon plağı yönteminde değerlendirilen biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.559$ ,  $p<0.001$ ).

İki yöntemden herhangi birisinde biyofilm üretimi gösterilen izolat biyofilm pozitif olarak, her iki yöntemde de biyofilm varlığı gösteremeyen izolatlar biyofilm negatif olarak gruplandırıldı. Buna göre; 123 biyofilm pozitif izolatın 121'inde (%98.4) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde saptanırken, 2 izolatta her iki gen de saptanmadı. 29 biyofilm negatif izolatın ise 15'inde (%51.7) her ikisinde saptanırken, 14'ünde (%48.3) her iki gende saptanmadı (Tablo-7). Bu sonuçlarla biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.597$ ,  $p=0.001$ ).

Çalışılan izolatların her iki yöntemle de biyofilm oluşumu gösterilenler biyofilm pozitif ve her iki yöntemle de biyofilm oluşumu gösterilemeyenler biyofilm negatif olarak gruplandırıldı. Buna göre; 63 biyofilm pozitif izolatın 62'sinde (%98.4) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde pozitif saptanırken, 1'sinde (%1.6) her iki gen de negatif bulundu. 29 biyofilm negatif örneğin 15'inde (%51.7) icaA ve icaD genlerinin her ikisinde pozitif saptanırken, 14'inde (%48.3) her iki gen de negatif bulundu (Tablo-8). Bu sonuçlarla biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.587$ ,  $p<0.001$ ). Elde ettiğimiz bulgularla biyofilm oluşumunda ica genlerinin önemi gösterilmiştir. Bununla birlikte tek başına biyofilm oluşumundan sorumlu olmadığı, diğer genetik faktörlerin ve çevresel şartlarında biyofilm oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (10,84-86,89). Aynı zamanda ica genlerinin pozitifliğinde her zaman biyofilm oluşumuyla sonuçlanmadığı gösterildi. Bu sonuçlar stafilokokal biyofilm oluşumunda ica genleri ile birlikte diğer negatif ve pozitif düzenleyici genlerinde sorumlu olduğu görüşünü desteklemektedir.

Son zamanlarda sığır mastitinden izole edilen *S.aureus*'larda yapılan çalışmalarda bap geni tarafından kodlanan 2276 aminoasitlik büyük bir yüzey proteini elde edilmiştir. Bu proteinin biyofilm oluşumunun hem inert yüzeylere primer yapışma basamağında hemde PIA/PNAG gibi hücre-hücre adezyonunda görevli olduğu bildirilmiştir. Bap yapısal olarak grup B streptokokların alfa C proteini ile benzer bulunmuştur. Bap geninin bir patojenite faktörü olduğu ve dirençli enfeksiyona yol açtığı bildirilmiştir (90). Cucurella ve ark. (91) hayvan kaynaklı mastit enfeksiyonundan izole edilen 350 *S.aureus* suşunun %5'inde bap genini pozitif bulurken, insandan izole edilen 75 suşun hiçbirisinde bap genini elde edememişlerdir. Kontrol suşu *S.aureus* V329 dahil bap pozitif izolatların hepsinde zayıf PIA/PNSG üretimi tespit etmişlerdir. Bap geni inaktive edildiğinde *S.aureus*'un biyofilm matriksinin başlıca polisakariti olan PIA/PNSG seviyesinde azalma olduğunu, ica genleri inaktive edilmiş mutantlarda dot blot yöntemiyle PIA/PNSG üretiminin olmadığı göstermişlerdir.

Vautor ve ark. (92) değişik kaynaklardan ve insandan izole ettikleri 150 *S.aureus* şusunda güçlü biyofilm üretenler de dahil hiçbirisinde bap genini

gösterememişlerdir. Bununla birlikte icaADBC genlerinin inaktivasyonunun, bap pozitif suşlarda in vitro biyofilm oluşumunu etkilemediğini bildiren yayınlar da vardır (90). Bap geni yok edilmesi durumunda biyofilm matriksinin ana polisakkarit maddesi olan PIA/PNAG birikiminde azalma olacağını bildirmişlerdir (57).

Çalışmamızda kullanılan 152 izolatın yalnızca 1'inde (%0.7) bap geni saptandı. Bap geni pozitif *S.aureus* suşu yoğun bakım servisinde yatmış hastadan gönderilen trakeal aspirasyon örneğinden izole edilmişti. Hastane otomasyon bilgi sisteminden alınan bilgilere göre 62 yaşında erkek hasta pulmoner emboli ve sepsis tanılarıyla hastanemize yatırılmış ve 10 gün sonra kardiyak arrest sonucu ölmüştür. Laboratuvar kayıtlarına göre hastanın diğer örneklerinden *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus spp.*, *Acinetobacter lwoffii* ve alfa hemolitik streptokok izole edilmiştir. Literatür taramasında daha önce bildirilen bap geni pozitif insan izolatına rastlanmadı.

Kropec ve ark. (86) PNAG üretiminin *S.aureus* patojenitesindeki önemini araştırmışlardır. Hayvan modeli çalışmasında ica gen delesyonu yapılmış mutant suşların kandaki seviyelerinde, böbrek absesi oluşturma yeteneklerinde ve ölüm oranlarında belirgin azalma gösterilmiştir. Ica gen delesyonlu *S.aureus* mutantlarının insan periferik kan lökositlerinin ve tavşan komplemanının antikor bağımsız opsonik öldürmesine daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. PNAG üretiminin, fare modeli sistemik *S.aureus* infeksiyonlarında doku immün cevabına direnç ve patojenitedeki kritik rolü gösterilmiştir. PNAG ve kapsüler polisakkaritlerin (tip 5 ve 8) fagositler ve kompleman tarafından oluşturulan doğal immüneye karşı bakterileri koruduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla *S.aureus* ve *S.epidermidis* suşlarından elde edilen PNAG'ın aşı potansiyeli değerlendirilmektedir (93,94). *Escherichia coli* ve *Actinobacillus* genusunun bazı üyelerinde PNAG ürettiği gösterilmiştir (95,96).

Çalışmamızda icaA ve icaD genleri pozitif 42 izolatın tamamında PNAG üretimi gösterildi. İca genleri belirlenemeyen 8 klinik izolatta ise PNAG tespit edilemedi. Çalışılan dilüsyonlarda PNAG üretimi tespit edilen 42 klinik izolattan

12'sinde pozitif kontrole eşit ışımaya, 30 izolatta ise daha zayıf ışımaya elde edildi (Şekil 12 ve 13).

Bilimsel gelişmelerin sonucu olarak, bir çok akut enfeksiyon antibiyotiklerle etkin bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Bununla beraber bu durumun iki istisnası vardır. Bunlardan ilki; antibiyotiğe duyarlılığı olmayan bakteri varlığıdır. İkinci ayrıcalıklı durum ise biyofilm içerisinde yaşayan bakteri varlığıdır. Biyofilm bakterilerinin, planktonik yaşayan aynı türdeki bakteriler oranla antibiyotik tedavisine 100-1000 kat daha rezistan olabildiği bildirilmiştir İmplant edilmiş yabancı cisimlere veya hasarlı dokulara yapışan bakteriler persistan enfeksiyonlara neden olabilir. Bunun en önemli nedeni, bu bakterilerin polisakkarit ve proteinlerden oluşan ve biyofilm adı verilen bir matriks içerisinde yerleşmeleridir (9,37,97).

Biyofilmler yavaş büyüme özelliğine sahiptirler ve enfeksiyonları sıklıkla belirgin klinik semptom vermeden gelişir. Hareketsiz bakteriyel hücreler antijen salgılayarak antikor üretimini uyarmaktadır. Bununla birlikte antikorların biyofilm içerisindeki bakterileri öldürebilme yeteneği yoktur. Biyofilmler bu yolla etraflarındaki dokularda immün kompleks hasarına yol açabilirler. Mükemmel hücrel ve humöral immün yanıtları olan bireylerde bile, konak savunma mekanizmaları biyofilm enfeksiyonlarını sonlandıramamaktadır. Antibiyotik tedavisi biyofilmden ayrılmış olan planktonik hücrelerin neden olduğu semptomları ortadan kaldırır fakat biyofilmi yok edememektedir. Bu nedenle biyofilm enfeksiyonları, dönem dönem kullanılan antibiyoterapiye rağmen semptomlar göstermeye devam edebilmektedir. Bu durum biyofilm popülasyonunun cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılmasına kadar devam edebilir (9).

Çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inden biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır. Biyofilmlerin özellikle nozokomiyal enfeksiyonlardaki önemlerinin artması ile birlikte biyofilm direnci konusunda daha sık olarak gündeme gelmektedir. Biyofilm oluşumunun iki klinik önemi vardır. Birincisi antibiyotiklere direnç kazanılmasıdır. Bakterinin biyofilm oluşturarak yüzeye yapışmış formu (sesile) ile süspansiyon formu (planktonik) arasında antibiyotik duyarlılık farkının olduğu

gösterilmiştir. Bakteriler antibiyotiklere MBK konsantrasyonlarının 1000 katına kadar direnç gösterebilmektedirler. Biyofilm oluşumunun antibiyotiklerin etkisini önleyici fonksiyonu olduğu bildirilmektedir. Biyofilm fenotipinin ikinci önemli özelliği ise konak immun hücrelerinden korunabilmesidir. Biyofilm bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korumaktadır. Kemotaksisi, nötrofillerin etkisini önlemekte ve lenfosit aktivitesini azaltmaktadır (9,98). Biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisi gittikçe daha da sorun olmaktadır. Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli davranışı planktonik formu ile arasındaki en önemli farkı oluşturmaktadır (99,100).

Biyofilmin antibiyotik direnç oluşturmada en az 3 mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Ekzopolisakkarid matriksin antimikrobiyal maddeyi absorbe ettiği veya diffüzyonunu kısıtladığı düşünülmüş olsa da, artık bir çok antibiyotiğin biyofilm tabakasını kolayca penetre ettiği bilinmektedir. Moleküler filtre mekanizmasının özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesinde en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir. Antibiyotiklerle tedavi edilmiş olan biyofilmlerin kenar kısımlarında bakterisidal etki izlenirken, daha derin kısımlarda yaşayan bakteriler hayatta kalmakta yeniden enfeksiyon gelişiminde bir nidus teşkil etmektedirler. Biyofilmin dış tabakaları hasarı absorbe ederken, iç tabakalarda stres yanıtının başlaması için zaman kazanılmış olur (9,27,101).

Biyofilm içerisinde yaşayan bakterilerin, planktonik bakterilerle karşılaştırıldıkları zaman farklı gen ekspresyon paternleri olduğu izlenir. Gen ekspresyonundaki bu farklılık planktonik benzerlerinden fenotipik olarak farklı özelliklere sahip bakterilerin ortaya çıkmasına neden olur. Biyofilmlerin birden fazla hücre türünden oluşması sonucu, içerisinde yaşayan bakterilerin hayatta kalma şansları artmaktadır (27,55).

Besin yetersizliğine bağlı değişen mikroçevreye daha çabuk adapte olabilen türler, saldırı sonunda hayatta kalarak yeniden çoğalma işlemine hızla başlayabilirler. Bunun en olası açıklaması, biyofilm bakterisinin geçirdiği fenotipik değişikliklerin kendisi için koruyucu bazı özellikleri kazandırmış olmasıdır. Biyofilm oluşumu için

gerekli pH, pCO<sub>2</sub>, divalan katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, primidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir. Biyofilm oluşumunu kolaylaştıran bu mikroçevre değişkenleri özellikle aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolidlerin antibakteriyel etkisini negatif yönde etkileyerek antibiyotik direncini oluşturmaktadır (27,55,102).

Biyofilm oluşumunun erken aşamalarında; henüz hücre birikimi ve polisakkarit madde üretimi gerçekleşmeden planktonik ve bağlı hücrelerin (adere) fizyolojileri arasındaki farklar çalışmalarda gösterilmiştir. Ekspansiyon safhasındaki *S.aureus*'lar da respiratuvar aktivite artmaktadır. Adere bakterilerin planktonik bakterilere göre metabolizmasındaki azalma membran potansiyellerinde belirgin bir düşüşle gösterilmiştir. Özellikle β-laktam ve glikopeptid direncinde adere bakterilerin üremelerindeki azalma ve filtre mekanizması etkili olmaktadır (69).

Bakterilerin büyüme oranlarındaki değişiklikler antibiyotik cevaplarını da değiştirmektedir. Başka bir deyişle, bir çok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflediği için, özellikle biyofilmin derin tabakalarında bulunan ve azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere etkili olamamaktadır. Biyofilimli bakterilerin büyüme hızları planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olduğu tesbit edilmiştir. *S.aureus*'ların biyofilm oluşturma süresi ile antibiyotik direncinde artış olduğu gösterilmiştir. Beslenmesi zayıflatılarak büyüme oranları düşürülen *S.aureus*'lara hiçbir antibiyotiğin yeteri kadar etkili olamadığı gösterilmiştir. Bu bulgular biyofilmin bakteri beslenme ve büyümesini etkileyerek antibiyotik direnç gelişimini sağladığını göstermektedir (9,27,103,104).

Direnç mekanizmalarının saptanması, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önemlidir. Yeni geliştirilecek antibiyotiklerin durağan (stationary) fazdaki ve biyofilm içindeki mikroorganizmalara etkili olması istenen bir durumdur. Bu amaçla bakterilerin birbiriyle haberleşmelerini sağlayan ve çoğalma dinamiklerini belirleyen “quorum sensing” sistemlerinin inhibisyonu son yıllarda üzerinde çalışmalar yapılan popüler konulardan birisi olmuştur. Henüz klinikte kullanılabilir bir madde geliştirilememiş olmasına rağmen, bu tür inhibitör moleküllerin uzun vadede biyofilm infeksiyonlarının tedavisi açısından umut vermektedir (52,69).

Biyofilm direncinden sorumlu genler ve gen ürünleri açığa çıkartıldıkça bunlara karşı geliştirilecek moleküller tedavide başarılı olabilir. Stafilocokal infeksiyonların tedavisinde geleneksel antibiyotiklerle birlikte biyofilm yapısı gibi spesifik stafilocokal virülans faktörlerini hedef alan yeni protokoller uygulanabilir. Ekstrasellüler polisakkarit oluşumunun engellenmesi geleneksel antibiyotiklerin antibakteriyel etkisini artıracığı bildirilmektedir. Stafilocoklarda çok katlı biyofilm oluşumunda önemli rolü olan ica geni beta laktam direncine katkıda bulunur ve bu gen enfekte eden suşlarda kontaminasyona yol açarlara göre daha sık saptanmaktadır. Koagülaz negatif stafilocoklarda antibiyotiklerin farklı bazı yollardan biyofilm oluşumunu ve aderans mekanizmasını etkilediği gösterilmiştir (36).

Ayrıca biyofilmin çok tabakalı yapısını tahrip edecek kemoterapotik ajanların geliştirilmeside diğer bir stratejidir. Geleneksel antibiyotiklerden kinopristin/dalfopristin, linezolid, vankomisin metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus* kökenlerine etkilidir. Stafilocokal infeksiyonlarda kullanılmaktadırlar. *Streptomyces pristinaspiralis*'ten köken alan streptograminler makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) ailesi içinde yer alan bir antibiyotik grubudur. Quinupristin/dalfopristin; iki farklı streptogramin bileşiğinin sinerjik etki gösteren semisentetik bir kombinasyonudur. Tek başına oldukça sınırlı bir antibakteriyel etkisi olan bu bileşikler birlikte sinerjistik etki oluşturmaları nedeniyle iyi bir antibakteriyel etkinlik gösterirler. Quinupristin/dalfopristin biyofilm üzerinede etkili bulunmuş ve biyofilm içindeki sesil bakteriyi yavaş yavaş öldürdüğü bildirilmiştir. Quinupristin/dalfopristin subinhibitör konsantrasyonu polisakkarit intersellüler adezini üreten ica ADBC operonunun ekspresyonunu arttırır (105,106,107).

Linezolid, oksazolidinon grubu antimikrobiyaldir. Linezolid tüm önemli gram pozitif bakterilere karşı mükemmel in vitro aktiviteye sahiptir. Linezolid'in biyofilm içindeki konsantrasyonu düşük bile olsa bakteri yükünü %91 azalttığı gösterilmiştir (106,107,108).

Klinikte en sık kullanılan glikopeptit antibiyotik vankomisindir. Vankomisin, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan polimerlerinin D-

alanin-D-alanin prekürsörlerine bağlanarak önlemektedir. Transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Ayrıca RNA sentezini bozabilir ve sitoplazmik membran permeabilitelerini değiştirerek protoplastlara zarar verebilir. Hedef organizmalara hızlıca ve sıkıca bağlanarak çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Gram negatif bakterilerin lipid membranından penetre olamadıkları için bu mikroorganizmalar üzerinde etkili değildir (109).

Vankomisin ve teikoplaninin subinhibitör konsantrasyonda ica genlerinin ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir. *S.epidermidis* vankomisine oldukça duyarlı olmasına rağmen biyofilm içindeki bakteri için aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Vankomisinin molekül büyüklüğü bu azalmış duyarlılıktan sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda biyofilmin kendisinin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir (106,107).

Wilcox ve ark. intravasküler kateterlerin içerisine vankomisin ve linezolid infüzyonu yaparak, oluşmuş biyofilm içerisindeki antibiyotik konsantrasyonunu değerlendirmişlerdir. Vankomisinin biyofilm içerisindeki konsantrasyonunun linezolide oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bunun nedenini de glikokaliks yapısının glikopeptidleri bağlaması olarak açıklamışlardır (110).

MRSA izolatlarında vankomisin, siprofloksasin ve teikoplaninin kullanıldığı çalışmada bakterilerin planktonik formlarına etkili MİK değerleri, mikrotitrasyon plağında 20 saat 37°C inkübasyondan sonra oluşan bakterilerin bağlı formlarına etkili minimal inhibitör konsantrasyon ( $MİK^{ADH}$ ) ve minimal bakterisidal konsantrasyon ( $MBK^{ADH}$ ) değerleri karşılaştırıldığında belirgin artış gösterilmiştir (65).

El-azizi ve ark. (67) sağlam ve dağılmış biyofilm oluşumundaki 3 klinik stafilokok izolatının linezolid, vankomisin, dalfopristine/quinupristin'e duyarlılıklarını MİK değerleriyle karşılaştırmışlardır. Biyofilm bakterilerini planktoniklere ve dağılmış biyofilm oluşumundakilere oranla antibiyotiklere karşı çok daha dirençli bildirmişlerdir. Dalfopristin/quinupristin'i özellikle dağılmış biyofilm



üzerine en etkili antibiyotik olarak bildirmişlerdir. Dalfopristin/quinupristin'in biyofilm oluşumundaki bakterileri öldürme etkisi doza bağımlı görülmemiştir. Buna karşın vankomisin doza bağımlı olarak yüksek konsantrasyonlarda (500-1000 µg/ml), biyofilm oluşumundaki bakterilere, daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Artroplasti vakalarından izole edilen 6 stafilokok suşunda yapılan diğer bir çalışmada vankomisin denenmiş ve biyofilmdeki bakteriler ile planktoniklerin MBK değerleri karşılaştırıldığında belirgin fark bulmuşlardır. Planktoniklerin MBK değerleri 0.5-1 µg/ml iken, biyofilmdeki bakterilerin MBK değerleri (MBEK) bir izolatta 512 µg/ml, diğerlerinde ise 1024 µg/ml'nin üzerinde bildirilmiştir (111).

Williams ve ark. (112) *S.aureus* izolatlarının planktonik ve biyofilm oluşumları üzerine vankomisin ve değişik antibiyotiklerin etkilerini karşılaştırmışlardır. Biyofilm oluşumunun planktoniklere oranla MBK, MBKx2 ve MBKx10 konsantrasyonlarında vankomisine ve diğer antibiyotiklere (benzilpenisilin, tetrasiklin) daha dirençli (2-10 kat) olduğunu göstermişlerdir.

Mathur ve ark. (113) yaptıkları çalışmada linezolid, vankomisin, dalfopristin/quinupristin ve ranbezolid kullanarak, iki kontrol suşu (*S.epidermidis* ATCC 35983 ve *S.epidermidis* ATCC 12228) ve iki klinik izolatta (MRSA ve metisilin dirençli KNS) MİK ve MBEK değerlerini karşılaştırmışlardır. Dalfopristine/quinupristin ve ranbezolid kullanıldığında daha az olmak üzere MBEK değerleri tüm örneklerde MİK değerlerine göre belirgin artmış (2-16 kat) göstermişlerdir. Dalfopristine/quinupristin ve ranbezolid'i biyofilm oluşumundaki bakterilere en etkili antibiyotikler olarak bildirilmişlerdir. Diaz-Mitoma ve ark. (114) ventrikülo-peritoneal şanlı hastalardaki infeksiyonlarda biyofilm üretimi ile antibiyotik başarısızlığı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır.

Çalışmamızda kullanılan 8 klinik izolatın MİK<sub>90</sub> değerleri ve BMİK değerleri karşılaştırıldı (Tablo-10). Buna göre klinik izolatların, vankomisin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 16 µg/ml, linezolid için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 8 µg/ml, dalfopristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük

BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 160 katı olarak 640 µg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 2 µg/ml bulundu.

Çalışmamızda kullanılan 8 klinik izolatın MİK<sub>90</sub> değerleri ve MBEK değerleri karşılaştırıldı. Buna göre klinik izolatların, vankomisin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 64 µg/ml, linezolid için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 16 katı olarak 64 µg/ml, dalfopristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 320 katının üzerinde >1280 µg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 8 µg/ml bulundu. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak biyofilm bakterileri planktoniklere oranla antibiyotiklere 8-1280 katından daha fazla konsantrasyonda dirençli bulunmuştur (Tablo-11). Elde ettiğimiz sonuçlar biyofilm oluşturmuş bakterilerin inhibisyonunun ve eradikasyonunun güç olduğunu ve antibiyotiklerin MİK değerlerinin çok daha üzerinde dozlara ihtiyaç olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamız sonucunda *S.aureus*'larda biyofilm oluşumunda ica genleri ve ürünlerinin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte biyofilm oluşumunda diğer genetik faktörlerin ve çevre koşullarında etkili olabileceği ve bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüştür. Aynı zamanda biyofilm oluşumunun antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli rol oynadığı ve tedavi protokolleri düzenlenirken dikkate alınması gerektiği görülmektedir. İnfeksiyon gelişiminde önemli bir faktör olarak görülen biyofilm oluşumunun önlenmesi için moleküler, genotipik ve fenotipik düzeyde daha açıklanması ve araştırılması gereken çok sayıda noktalar bulunmaktadır.

## SONUÇLAR

1-Kongo kırmızılı agar besiyerinde yapılan değerlendirmeler sonrasında 175 örneğin 74'ünde (%42.3) biyofilm oluşumu pozitif bulunurken, 101'inde (%57.7) biyofilm oluşumu negatif bulundu.

2-Kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine göre örneklerin 29'unda (%16.6) güçlü biyofilm üretimi, 112'sinde (%64.0) orta derece biyofilm üretimi ve 34'ünde (%19.4) biyofilm üretimi negatif belirlendi.

3-Biyofilm oluşumunun tespitinde kullanılan mikrotitrasyon plağı yöntemi ve kongo kırmızılı agar besiyeri arasında uyumsuzluk belirlendi ( $p<0.001$ ).

4-Biyofilm oluşumu ile örneklerin alındığı bölgeler arasındaki ilişki kullanılan her iki yöntem birlikte değerlendirildiğinde en yüksek biyofilm oranları yara örneklerinde gösterildi (%60.9-87.4).

5-Çalışmada kullanılan 152 klinik izolatın 136'sında (%89.5) *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinde saptanırken, 16'sında (%10.5) saptanmadı.

6-Kongo kırmızılı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında zayıf-orta derecede ilişki bulundu ( $r= 0.257$ ,  $p=0.001$ ).

7-Mikrotitrasyon plağı yönteminde değerlendirilen biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.559$ ,  $p<0.001$ ).

8-Biyofilm tespitinde kullanılan yöntemlerin herhangi birisinde biyofilm üretimi gösterilen izolatlar biyofilm pozitif olarak, her iki yöntemde de biyofilm varlığı gösteremeyen izolatlar biyofilm negatif olarak gruplandırıldığında; biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.597$ ,  $p=0.001$ ).

9-Biyofilm tespitinde kullanılan her iki yöntemle de biyofilm oluşumu gösterilen *S.aureus* klinik izolatları biyofilm pozitif ve her iki yöntemle de biyofilm oluşumu

gösterilemeyenler biyofilm negatif olarak gruplandırıldığında; biyofilm üretimi ile icaA ve icaD genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.587$ ,  $p<0.001$ ).

10-Biyofilmle ilişkili genlerin araştırılmasında kullanılan 152 klinik *S.aureus* izolatının yalnızca 1'inde (%0.7) bap geni saptandı.

11-PIA/PNAG çalışmasında kullanılan icaA ve icaD genleri pozitif 42 izolatın tamamında PNAG üretimi gösterildi. Çalışmada kullanılan ica genleri negatif 8 klinik izolatta ise PNAG tespit edilmedi.

12-Klinik izolatların vankomisin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 16 µg/ml, linezolid için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 8 µg/ml, dalfopristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 160 katı olarak 640 µg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en düşük BMİK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 2 katı olarak 2 µg/ml bulundu.

13-Klinik izolatların vankomisin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 32 katı olarak 64 µg/ml, linezolid için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 16 katı olarak 64 µg/ml, dalfopristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 80 katının üzerinde >1280 µg/ml, quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 320 katının üzerinde >1280 µg/ml ve dalfopristin/quinupristin için en düşük MBEK değeri MİK<sub>90</sub> değerinin 8 katı olarak 8 µg/ml bulundu.

## ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarının biyofilm oluşturma oranları, biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan genleri ve genlerin ürünleri, biyofilm oluşturmuş suşlar üzerine antibiyotiklerin etkileri araştırıldı.

Çalışma kapsamına çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 175 *S.aureus* suşu dahil edildi. Çalışmada biyofilm üretiminin tespitinde Kongo kırmızılı agar (KKA) besiyeri ve mikrotitrasyon plağı yöntemi karşılaştırılmıştır. KKA besiyerinde yapılan koloni morfolojisine dayanan fenotipik değerlendirmeler sonrasında 175 örneğin 101'inde (%57.7) biyofilm oluşumu negatif bulunurken, 74'ünde (%42.3) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle kristal viyole kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine dayanan kantitatif değerlendirme sonucunda örneklerin 34'ünde (%19.4) biyofilm üretimi negatif, 112'sinde (%64.0) orta derece biyofilm üretimi ve 29'unda (%16.6) güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir. Mikrotitrasyon plağı yöntemi ve KKA biyofilm üretimini tespit etme yönünden karşılaştırıldığında uyumsuz bulundu ( $p<0.001$ ). Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin varlığının araştırılmasında kullanılan 152 klinik izolatanın 136'sında (%89.5), pozitif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* ATCC 35984 suşunda *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinde saptandı. Çalışmaya alınan 152 klinik izolatanın 16'sında (%10.5) ve negatif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* ATCC 12228 suşunda *icaA* ve *icaD* genleri saptanmadı. KKA besiyerinde değerlendirilen biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında zayıf-orta derecede ilişki bulundu ( $r= 0.257$ ,  $p=0.001$ ). Mikrotitrasyon plağı yönteminde değerlendirilen biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında iyi derecede ilişki bulundu ( $r=0.559$ ,  $p<0.001$ ). Çalışılan 152 klinik *S.aureus* izolatanın yalnızca 1'inde (%0.7) ve pozitif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* V329 suşunda *bap* geni saptandı. *IcaADBC* genleri tarafından sentezletirilen PIA/PNAG çalışmasında 50 klinik *S.aureus* suşu kullanıldı. Çalışılan *icaA* ve *icaD* genleri pozitif 42 izolatanın tamamında kemilüminesans dot-blot yöntemle PNAG üretimi gösterilirken, *ica* genleri negatif 8 klinik izolatta ise PNAG tespit edilmedi. Antibiyotiklerin (vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinupristin ve dalfopristin/quinupristin) biyofilm oluşturmuş *S.aureus* suşlarına etkileri 96

kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kullanılarak araştırıldı. Çalışılan 8 klinik izolatuñ biyofilm minimum inhibitör konsantrasyon ve minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyon değerleri, MİK<sub>90</sub> değerlerinin 2-1280 ve 8-1280 katından daha yüksek bulundu. Sonuç olarak *S.aureus*'lar da biyofilm oluşununun, genetik ve çevresel faktörler tarafından kontrol edildiği ve antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli rol oynadığı kanısına varılmıştır.

## SUMMARY

In this study, we analysed the biofilm formation capability, genes and gene products which are responsible from biofilm formation and the effects of antibiotics on biofilm-forming strains of *S.aureus* isolated from various clinical specimens.

A total of 175 *S.aureus* strains isolated from various clinical samples were studied. Congo Red agar (CRA) and microplate assay were compared to detect biofilm production. 101 (57.7%) of 175 samples were negative for biofilm formation while 74 (42.3%) samples were positive according to phenotypic assessment of colony morphology on CRA. In microplate method, quantitative assessment is done according to the absorbance measurement by using crystal violet and as a result 34 (19.4%) sample were negative, 112 (64%) were moderate and 29 (16.6%) were strong positive for biofilm-forming. There was a discordance between microplate method and CRA in detecting biofilm formation ( $p < 0.001$ ). In the study to determine the presence of genes responsible from biofilm formation, 152 clinical isolates were studied. *icaA* and *icaD* genes were both detected in 136 (89.5%) of 152 isolates and *S.aureus* ATCC 35984 used as positive control. In 16 (10.5%) of these isolates and negative control strain *S.aureus* ATCC 12228 *icaA* and *icaD* genes were not detected. There was a poor-moderate relation between *icaA* and *icaD* genes with the biofilm formation examined on CRA ( $r: 0.257$ ,  $p: 0.001$ ). There was an evident relation between *icaA* and *icaD* genes with biofilm formation examined by microplate method ( $r: 0.559$ ,  $p < 0.001$ ). Only 1 (0.7%) of the 152 clinical *S.aureus* isolates and *S.aureus* V329 strain used as positive control found to be positive for *bap* gene. 50 clinical *S.aureus* strains were used in PIA/PNAG study which is synthesised by *ica* ADBC. PNAG production was detected by chemiluminance dot-blot method in all 42 isolates studied which were both *icaA* and *icaD* positive, but in 8 isolates negative for *ica* genes PNAG couldn't have been detected. The effects of antibiotics (vancomycin, linezolid, dalfopristin, quinupristin ve dalfopristin/quinupristin) on biofilm-forming *S.aureus* isolates were analysed by using 96 well microplate. The eight clinical isolates were studied which biofilm minimum inhibitory concentration and minimal biofilm eradication concentration values measured 2- to 1280 and 8- to 1280-fold higher than  $MIC_{90}$  values. As a result,

biofilm formation in *S.aureus* is controlled by genetic and environmental factors, and play an important role in antibiotic resistance.



## KAYNAKLAR

1. Cengiz AT. *Staphylococcus*. In: Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö, eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 339-347.
2. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> Ed, Washington DC, ASM Press, 1999: 264-277.
3. Bilgehan H. *Staphylococcus*. In: Bilgehan H, eds. Klinik Mikrobiyoloji 10. Baskı, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2000: 240-266.
4. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram-Positive cocci Part I: *Staphylococci* and Related Organisms. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. eds. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>th</sup> Ed, Philadelphia, JB Lippincott Company, 1997: 405-446.
5. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. J Hosp Infect 2001; 49: 87-93.
6. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections . N Engl J Med 1998; 339: 520-532.
7. 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 2004; 103: 241–247.
8. Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. Minireview. J Bacteriol 2000; 182: 2675-2679.
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 5427–5433.

10. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3235–3238.
11. 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* 2001; 39: 2151–2156.
12. Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 43–55.
13. Anstead GM, Owens AD: Recent advances in the treatment of infections due to resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 549-555.
14. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 585–617.
15. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67: 5427–5433.
16. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998; 12: 484–488.
17. Howard BJ, Kloos WE. Staphylococci. In: Howard BJ, Klaas J, Rubin SJ, Weissfeld A, Tilton RC, eds. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Washington, DC.1987: 231-241.
18. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2663-2676.

19. Dubin G. Extracellular proteases of *Staphylococcus spp.* Biol Chem 2002; 383: 1075-1086.
20. Archer GL. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin Infect Dis 1998; 26: 1179-1181.
21. Miedzobrodzki J, Kaszycki P, Bialecka A, Kasprowicz A. Proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the colonized skin of patients with acute-phase atopic dermatitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 269-276.
22. Rijnarts HM, Norde W, Bouwer EJ, Lyklema J, Zehnder AB. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 3255-3265.
23. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002; 8: 881-890.
24. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. Eye 1995; 9: 102-109.
25. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol 1993; 75: 499-511.
26. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-193.
27. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185-190.
28. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 711-745.

29. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
30. Zhang LH. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* 2003; 8: 238-244.
31. Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 599-560.
32. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3-9.
33. Stickler D. Biofilms. *Curr Op in Microbiol* 1999; 2: 270-275.
34. Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1851-1856.
35. Hussain M, Wilcox MH. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *Microbiol Rev* 1993; 10: 191-207.
36. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* 2002; 4: 481-489.
37. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
38. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
39. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are

transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186: 2449-2456.

40. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280: 295-298.

41. Holland SP, Mathias RG, Morck DW, Chiu J, Slade SG. Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from steriliser reservoir biofilms *Ophthalmology* 2000; 107: 1227-1233.

42. Rioufol C, Devys C, Meunier G, Perraud M, Goulet D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *J Hosp Infect* 1999; 43: 203-209.

43. Vincent FC, Tibi AR, Darbord JC. A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. *ASAIO Trans* 1989; 35: 310-313.

44. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol* 1995; 155: 2029-2038.

45. Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 33-40.

46. Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol* 1992; 36: 406-413.

47. Yasuda H, Ajiki Y, Aoyama J, Yokota T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J Med Microbiol* 1994; 41: 359-367.
48. Hausner M, Wuertz S. High Rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3710-3713.
49. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397, in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 177: 63-66.
50. Labbate M, Qeck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 2004; 186: 692-698.
51. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 2002; 4: 18-28.
52. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyj OD, Young JM. Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 417-423.
53. Novick RP, Muir WM. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 40-45.
54. Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi* 2006; 48: 244-250.

55. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett 2004; 236: 163-173.
56. Götz F. *S.aueus* and Biofilms. Mol Microbiol 2002; 43: 1367-1378.
57. Lasa I, Penades JR. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. Res Microbiol 2006; 157: 99–107.
58. 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 infection. J Clin Microbiol 2003; 41: 4465–4467.
59. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> International Supplement. CLSI Document M100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2005.
60. Janet H, Broth Microdilution MIC Test. In: Isenberg HD eds. Clinical Microbiology Handbook. Washington DC: ASM, 1998: 216-223.
61. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42: 872–874.
62. 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 1985; 22: 996–1006.
63. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard Sixth edition NCCLS document M7-A6 Wayne, Pennsylvania, USA, NCCLS 2003.

64. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 326-332.
65. Trafny EA. Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10: 223-228.
66. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.
67. El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 2.
68. Fluit AC, Schmitz FJ, European SENTRY Participant Group, Verhoef J. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 20: 188–191.
69. Patel R. Biofilms and Antimicrobial Resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Lippincott Williams & Wilkins 2005; 437: 41–47.
70. Domenico P, Baldassari L, Schoch PE, Kaehler K, Sasatsu M, Cunha BA. Activities of bismuth thiols against Staphylococci and Staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1417-1421.
71. Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JKM. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev Med Microbiol* 2006; 17: 45–54.



72. Votava M, Woznicova V. Production of slime by staphylococcal isolates from blood cultures. *Cent Eur J Public Health* 2000; 8: 18-20.
73. Catalanotti P, Lanza M, Del Prete A, Lucido M, Catania MR, Galle F, Boggia D, Perfetto B, Rossano F. Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiol* 2005; 28: 345-354.
74. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 130-137.
75. Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M, Foroohesh H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 25-28.
76. Szymankiewicz M, Janicka G, Wroblewska J. Ability of slime production *Staphylococcus aureus* strains obtained from clinical materials. *Pol Merkuriusz Lek* 2004; 17: 338-340.
77. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation *Vet Microbiol* 2003; 92: 179-185.
78. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191: 101-106.
79. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Montanaro L. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials* 2004; 25: 4825-4829.

80. Baselga R, Albizu I, Cruz MDL, Cacho ED, Barberan M, Amorena B. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. *Infection and Immunity* 1993; 61: 4857-4862.
81. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 2006; 118: 133-140.
82. 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* 2006; 24: 25-29.
83. Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
84. 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* 2005; 187: 5318-5329.
85. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun* 2003; 71: 4206-4211.
86. Kropec A, Maira-Litran T, Jefferson KK, Grout M, Cramton SE, Gotz F, Goldmann DA, Pier GB. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect Immun* 2005; 73: 6868-6876.
87. Rohde H, Knobloch JKM, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus* icaABCD genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4595-4596.

88. Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect* 2005; 61: 225-230.
89. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaA*DBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1973-1976.
90. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183: 2888-2896.
91. Cucarella C, Tormo MA, Carles U, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2177–2185.
92. Vautor E, Carsenti-Dellamonica H, Thiery R. Low prevalence of BAP gene (coding for biofilm-associated protein) in French isolates of *Staphylococcus aureus* recovered from human and animals species. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Nice, France, April 1-4, 2006*; 825 (abstract).
93. Maira-Litran T, Kropec A, Goldmann D, Pier GB. Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine* 2004; 22: 872–879.
94. McKenney D, Pouliot K, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB. Vaccine potential of poly-1-6-beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Biotechnol* 2000; 83: 37–44.

95. Wang X, Preston III JF, Romeo T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. J Bacteriol 2004; 186: 2724–2734.
96. Kaplan JB, Velliyagounder K, Raguath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK, and Ramasubbu N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. J Bacteriol 2004; 186: 8213–8220.
97. Georgopapadakou NH. Antibiotic resistance in biofilms. In: Pace JL, Rupp M, and Finch RG. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Taylor & Francis Group NW, 2006: 401-405.
98. Mah TFC and O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001; 9: 34-39.
99. 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 1999; 37: 1771-1776.
100. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. Adv Dent Res 1997;11: 160-167.
101. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse Effect of Staphylococci Slime on In Vitro Activity of Glycopeptides Jpn J Infect Dis 2005; 58: 353-357.
102. Dunne WM Jr, Buckmire FL. Effects of divalent cations on the synthesis of alginic acid-like exopolysaccharide from mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios 1985; 43: 193-216.

103. Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1824-1828.
104. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Can J Microbiol* 1992; 38:618-625.
105. Korten V. Kinopristin ve Dalfopristin. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2003; 359-363.
106. Cunha BA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 11: 33-42.
107. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 44: 3357-3363.
108. Balık İ, Birengel S. Oksazolidinonlar: Linezolid-Eperozolid. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2003: 365-373.
109. Arman D. Vankomisin ve Diğer Glikopeptid Antibiyotikler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 2002: 252-257.
110. Wilcox MH, Kite P, Mills K, Sugden S. In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 171-175.

111. Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *J Orthop Sci* 2006; 11: 46–50.
112. Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F, Critchley I. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997; 143: 2407–2413.
113. Mathur T, Bhateja P, Pandya M, Fatma T, Rattan A. In vitro activity of RBx 7644 (ranbezolid) on biofilm producing bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 369-73.
114. Diaz-Mitoma F, Harding GK, Hoban DJ, Roberts RS, Low DE. Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 1987; 156: 555–560.