



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNUN
GENOTİPİK VE FENOTİPİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Dr. Zeliha SEYFİ ŞANDA
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN – 2023



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNUN
GENOTİPİK VE FENOTİPİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Zeliha SEYFİ ŞANDA
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL**

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO. PYO.TIP.1904.23.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN – 2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde ve bu tezi hazırlamamda emeği geçen, bilgi ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a;

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, öğretim üyeleri değerli hocalarım Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya ve Doç. Dr. Kemal BİLGİN'e

Asistanlığım boyunca çalışmaktan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Dr. Büşra USTA'ya, Arş. Gör. Kübra HACIEMİNOĞLU ÜLKER'e,

Hayatım boyunca beni destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan annem Bahar SEYFİ, babam Ünal SEYFİ, kardeşlerim Burçin Dilara SEYFİ, Ziya Kaan SEYFİ ve en zor zamanlarda varlığından güç aldığım, hep yanımda olan ve destek olan canım eşim Safa ŞANDA'ya en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Zeliha SEYFİ ŞANDA

Aralık/2023

BEYAN

“Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm oluşumunun genotipik ve fenotipik yöntemlerle araştırılması” adlı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zeliha SEYFİ ŞANDA

ÖZET

Amaç: *Staphylococcus aureus* klinik örneklerden sıklıkla izole edilen fırsatçı bir insan patojenidir. Antimikrobiyallere direnç ve biyofilm üretimi de patojenite faktörlerindendir. Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretimi, genotipik ve fenotipik karakterlerinin araştırılması ve glikopeptid antibiyotiklerin biyofilm üreten suşlara etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Nisan 2020-Aralık 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'ne gönderilen örneklerden elde edilen 130 metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatı dahil edilmiştir. Vankomisin ve teikoplanin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle; biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plağı yöntemiyle belirlenmiştir. Güçlü biyofilm üreten izolatlar için vankomisin ve teikoplaninin biyofilm inhibitör konsantrasyonları (BİK) araştırılmıştır. Virulans ile ilişkili olan *mecA*, *pvl*, *icaA*, *icaD* ve *bap* genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri, vankomisin için 0,5-2 µg/ml, teikoplanin için 0,25-2 µg/ml arasında bulunmuştur. İzolatların %37,69'unda biyofilm üretimi negatif iken %23,07'sinde güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir. Güçlü biyofilm üreten izolatların vankomisin ve teikoplanin için BİK₉₀ değerleri, MİK₉₀ değerlerinin 512 katı olarak bulunmuştur. Ayrıca izolatların %96,15'inde *mecA*, %1,53'ünde *pvl*, %73,84'ünde *icaA*, %76,92'sinde *icaD* geni saptanırken, *bap* geni saptanmamıştır. Biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* gen pozitifliği arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tartışma ve Sonuç: Sonuç olarak *S. aureus*'larda biyofilm oluşumunun, genetik ve çevresel faktörler tarafından kontrol edildiği ve antibiyotiklere direnç gelişiminde önemli rol oynadığı, biyofilm oluşturan bakterinin antibiyotik tedavisine aynı bakterinin planktonik formuna göre daha fazla direnç gösterdiği kanısına varılmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Virulans faktörleri, Biyofilm, Polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

Objective: *Staphylococcus aureus* is an opportunistic human pathogen isolated from clinical specimens. Antimicrobial resistance and biofilm production are significant factors of pathogenicity. This study aimed to investigate the biofilm production, genotypic and phenotypic characteristics of *S. aureus* and to determine the effect of glycopeptide antibiotics on biofilm-producing strains.

Materials and Methods: The study included 130 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from clinical specimens sent to Ondokuz Mayıs University Medical Microbiology Department between April 2020 and December 2022. MIC values for vancomycin and teicoplanin was determined by broth microdilution method, biofilm formation by the microtitration plate method. Biofilm inhibitory concentration (BIC) was investigated for strong biofilm-producers. *mecA*, *pvl*, *icaA*, *icaD* and *bap* genes were examined using polymerase chain reaction (PCR).

Results: Vancomycin and teicoplanin MIC values ranged from 0,5-2 µg/ml and 0,25-2 µg/ml, respectively. Biofilm production was negative in 37.69% and strong in 23.07% of the isolates. The BIC₉₀ values for vancomycin and teicoplanin in strong biofilm-producing isolates were 512 times higher than the MIC₉₀ values. While the *mecA* gene was detected in 96,15% of the isolates, *pvl* in 1,53%, *icaA* in 73,84%, and *icaD* in 76,92%, the *bap* gene wasn't detected. The relationship between biofilm and *icaA* and *icaD* gene was found to be significant ($p<0,05$).

Conclusion: It was determined that biofilm formation is influenced by genetic and environmental factors, plays an important role in the development of antibiotic resistance. Biofilm-forming bacteria were found to be more resistant to antibiotics.

KEYWORDS: Virulence factors, Biofilm, Polymerase chain reaction

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
BEYAN.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Taksonomi.....	3
2.2. Morfolojisi ve Kültür Özellikleri	3
2.3. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler	4
2.4. Hücre Yapısı ve Virulans Faktörleri	5
2.4.1. Hücre duvar yapısı.....	5
2.4.2. Teikoik asit	7
2.4.3. Kapsüler polisakkaritler ve slime tabakası	7
2.4.4. Yüzey adezyon proteinleri.....	7
2.4.5. Stafilokokal toksinler.....	9
2.4.5.1. Sitotoksinler	9
2.4.5.2. Eksfoliyatif toksinler	10
2.4.5.3. Enterotoksin	11
2.4.5.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1).....	11
2.4.6. Enzimler	11
2.5. Epidemiyoloji.....	13
2.6. <i>S. aureus</i> ' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar	14
2.6.1. Deri enfeksiyonları	14
2.6.2. <i>S. aureus</i> ' un toksinleriyle yaptığı hastalıklar	15
2.6.3. Endokardit	16
2.6.4. Alt solunum yolu enfeksiyonları	16
2.6.5. Kemik-eklem enfeksiyonları	16
2.7. Stafilokok Enfeksiyonlarında Tedavi	17
2.7.1. Hücre duvar sentezini etkileyen antibiyotikler.....	17
2.7.1.1. Beta-laktam antibiyotikler	17
2.7.1.2. Glikopeptid antibiyotikler	19

2.7.2. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler	19
2.7.2.1. Aminoglikozidler	19
2.7.2.2. Oksazolidinonlar	20
2.7.2.3. Streptograminler	20
2.7.3. Nükleik asit sentez inhibitörleri	20
2.7.3.1. Sülfonamidler ve trimetoprim	20
2.7.3.2. Kinolonlar	20
2.7.3.3. Rifampin	21
2.7.4. Hücre zarına etkili antibiyotikler	21
2.7.4.1. Daptomisin	21
2.7.5. Diğer ajanlar	21
2.7.5.1. Tetrasiklin	21
2.7.5.2. Mupirosin	22
2.8. Stafilokoklarda Metisilin Direnci	22
2.9. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları	22
2.10. Biyofilm	23
2.10.1. Biyofilmin tanımı ve tarihçesi	23
2.10.2. Biyofilmin yapısı	24
2.10.3. Biyofilmin oluşum evreleri	25
2.10.4. Biyofilm mikroorganizma ilişkisi	27
2.10.5. Biyofilm hastalık ilişkisi	28
2.10.6. Quorum sensing (çoğunluğu algılama) mekanizmaları	29
2.10.7. Biyofilm ve antimikrobiyal direnç	30
2.10.8. <i>S. aureus</i> ve biyofilm	31
2.10.9. Biyofilm saptama yöntemleri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Bakterilerin Tanımlanması	36
3.2. Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesi	36
3.3. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.4. Vankomisin ve Teikoplanin Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi	38
3.5. Vankomisin ve Teikoplaninin Oluşmuş Biyofilm Tabakasına Etkisinin Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu (BİK) ile Belirlenmesi	38
3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme	39
3.7. Virulans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi	40
3.7.1. DNA izolasyonu	40

3.7.2. DNA amplifikasyonu.....	40
3.7.3. Elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile görüntülenmesi.....	43
3.8. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Özellikleri	45
4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri	45
4.3. Disk Difüzyon Testi Sonuçları.....	46
4.4. Biyofilm Üretimi.....	47
4.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları.....	48
4.6. Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon (BİK) Sonuçları	58
4.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme	60
4.8. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları	61
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR.....	76
7. KAYNAKLAR.....	77
8. EKLER.....	87
Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	87
Ek 2. Turnitin Orjinallik Raporu	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikromol
kDa	: Kilodalton
mM	: Milimol
nmol	: Nanomol
pmol	: Pikomol
AIP	: Otoindükleyici peptidler
ATCC	: American type culture collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BAP	: Biofilm associated protein
BİK	: Biyofilm inhibitör konsantrasyon
CRA	: Congo red agar
CRF	: Coagulase reacting factor
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EİA	: Enzim immunassay
ELİSA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	: Eozin metilen blue
EPS	: Ekzopolisakkarit
ET-A	: Eksfoliyatif toksin-A
ET-B	: Eksfoliyatif toksin-B
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HK-MRSA	: Hastane kaynaklı metisilin resistans <i>Staphylococcus aureus</i>
KAMHB	: Katyon ayarlı mueller hinton besiyeri
KKA	: Koyun kanlı agar
KOD	: Kontrol optik dansitesi
MBEK	: Minimum biyofilm eradike eden konsantrasyon
MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyon
MBOD	: Mikroorganizma biyofilmi optik dansitesi
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon

MSSA	: Methycilline sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	: Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	: Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
NAMA	: N-asetil muramik asit
NAG	: N-asetil glukozaminden
OD	: Optik dansite
PABA	: Paraaminobenzoik asit
PBP	: Penisilin bağlayıcı protein
PBS	: Phosphate-buffered saline
PIA	: Polysaccharide intercellular adhesin
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PNAG	: Poly-N-acetyl-beta-1-6-glucosamine
PVL	: Panton-Valentine lökositini
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TBE	: Trisma-Borik asit-EDTA
TK-MRSA	: Toplum kaynaklı metisilin resistans <i>Staphylococcus aureus</i>
TSB	: Tryptic soy besiyeri
TSST	: Toksik şok sendromu toksini
VISA	: Vancomycin intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Klinik önemi bulunan stafilokokların temel özellikleri	5
Tablo 2. Biyofilm formasyon aktivitelerinin belirlenmesi	37
Tablo 3. <i>mecA</i> , <i>pvl</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> genlerine ait spesifik primer dizileri.....	40
Tablo 4. <i>mecA</i> PZR karışımı	41
Tablo 5. <i>pvl</i> PZR karışımı	41
Tablo 6. <i>mecA</i> ve <i>pvl</i> PZR amplifikasyon programı	42
Tablo 7. <i>icaA</i> PZR karışımı	42
Tablo 8. <i>icaD</i> PZR karışımı.....	43
Tablo 9. <i>bap</i> PZR karışımı	43
Tablo 10. <i>icaA</i> , <i>icaD</i> ve <i>bap</i> PZR amplifikasyon programı	43
Tablo 11. <i>S. aureus</i> izolatlarının örnek türü ve kliniklere göre dağılımı	45
Tablo 12. <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	46
Tablo 13. Biyofilm oluşturma özelliklerine göre antibiyotik direnç oranları	48
Tablo 14. <i>S. aureus</i> izolatlarının Vitek 2 Compact otomatize sistemiyle sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçlarının karşılaştırılması ve biyofilm skorları.....	50
Tablo 15. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların vankomisin MİK ve BİK değerleri. 59	
Tablo 16. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların teikoplanin MİK ve BİK değerleri . 59	
Tablo 17. Örnek türlerine göre virulans genlerinin dağılımı.....	64
Tablo 18. Antibiyotik direnç oranlarına göre <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> virulans genlerinin dağılımı	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Peptidoglikanın yapısı	6
Şekil 2. <i>S. aureus</i> 'un hücre duvarı ve virulans faktörleri (33).....	8
Şekil 3. Beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı (63)	18
Şekil 4. Biyofilm Oluşum Aşamaları (94)	27
Şekil 5. Planktonik bakteride biyofilm gelişme aşamaları (95).....	27
Şekil 6. Biyofilm direnç mekanizmalarına ilişkin ileri sürülen farklı tezler (86).....	31
Şekil 7. PIA biyosentezinin modeli (105).....	32
Şekil 8. Disk difüzyon testi ile sefoksitin duyarlılığının belirlenmesi.....	46
Şekil 9. Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon yöntemiyle değerlendirilmesi	47
Şekil 10. <i>S. aureus</i> izolatlarının vankomisin MİK dağılımları	49
Şekil 11. <i>S. aureus</i> izolatlarının teikoplanin MİK dağılımları.....	49
Şekil 12. Mikroplakta MİK tespiti	49
Şekil 13. Mikroplakta BİK tespiti.....	58
Şekil 14. 120 numaralı biyofilm üreticisi olmayan <i>S. aureus</i> izolatı ve 118 numaralı biyofilm üreticisi olan <i>S. aureus</i> izolatının SEM görüntüsü.....	61
Şekil 15. <i>mecA</i> geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü.....	62
Şekil 16. <i>pvl</i> geni yönünden pozitif izolatın PZR jel görüntüsü.....	62
Şekil 17. <i>icaA</i> geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	63
Şekil 18. <i>icaD</i> geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü.....	63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, klinik örneklerden sıklıkla izole edilen, toplum kökenli ve hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olan gram pozitif bir insan patojenidir. Virulans faktörlerinin etkisi ve doğrudan invazif özelliği nedeniyle yüzeyel lezyonlardan ölümcül sistemik enfeksiyonlara kadar değişen kliniklere sebep olabilir (1, 2). *S. aureus* izolatlarının patojenitesinden, bakteri tarafından üretilen toksinler, enzimler, adherens faktörleri ve biyofilm oluşumu gibi virulans faktörleri sorumludur (3). Özellikle patojenite faktörlerinin fagositoza karşı direnç gelişmesini sağlayan biyofilm ile birlikteliğinde bakterinin virulansı oldukça yükselmektedir (4).

Biyofilmler, canlı veya cansız bir yüzeye tutunan ve bakteriyel enfeksiyonların sürekliliğinde önemli rol oynayan mikroorganizma topluluklarıdır. Bakterileri çevreleyen biyofilm matrisi, fagositoza ve vücudun diğer savunma sistem bileşenlerine direnç göstermelerinin yanı sıra planktonik bakterilere kıyasla onları zorlu koşullara dayanıklı, antibakteriyel tedavilere ve dezenfektanlara karşı dirençli hale getirir. Antimikrobiyal direncin artması nedeniyle bunlara etkili tedavi vermek de zor hale gelmiştir (5, 6).

Biyofilm içindeki bakterinin mikrobiyal ajanlara duyarlılığın azalması antimikrobiyal ajanların difüzyonunun fiziksel olarak bozulması, bakteriyel büyüme oranlarının azalması ve antimikrobiyal ajanın aktivitesini bozabilecek mikroçevrenin lokal değişiklikleri gibi pek çok faktörden kaynaklanmaktadır (7). Ayrıca biyofilmin, antibiyotiklere karşı oluşan direnç genlerinin bakteriler arasında aktarımı kolaylaştırması biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli hale gelmesinde önemli rol almaktadır (8).

Yapılan çalışmalarda, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında biyofilm pozitifliği, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca *Staphylococcus* izolatlarının çoklu ilaç direnci ile *ica* locus varlığı ve biyofilm gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (9, 10). *icaA* ve *icaD* genlerinin *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır. *icaA* geni, biyofilm tabakasının ana maddesi olan poly-N-acetyl-beta-1-6-glucosamine (PNAG) oligomerlerinin sentezinde görevli N-asetilglukozamil

transferaz enzimini kodlar. *icaD* geni ise N-asetilglukozamil transferazın maksimum ekspresyonunda rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, tek başına *icaA* geni ekspresyonu olduğunda düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi görülürken, *icaD* geni ile birlikteliğinde yüksek enzim aktivitesi görülmüştür (11-13). *bap* geni ise *S. aureus* izolatlarında daha güçlü biyofilm oluşumuna destek verir. Cansız yüzeylere yapışma ve intersellüler adezyon basamaklarının ikisinde de görev alır (14).

S. aureus'un antibiyotik direnci biyofilm oluşumu gibi bir faktörle birleştiğinde enfeksiyonun tedavisi güçleşmekte, kronik ve persistant enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Antibiyotik tedavisinin yetersiz kalması, biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkisinin araştırılması ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (4).

Bu çalışmada MRSA izolatlarında biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumunda etkili olan genlerin varlığının araştırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olan glikopeptitlerden (15) vankomisin ve teikoplanin; MRSA izolatlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve biyofilm üreticisi olan MRSA izolatlarına karşı biyofilm inhibitör konsantrasyon (BİK) değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Stafilokoklar ilk kez Robert Koch tarafından 1878 yılında ışık mikroskobu altında görülmüş ve tanımlanmış, Louis Pasteur tarafından 1880’de sıvı besiyerinde üretilmiştir. İskoçyalı bakteriyolog Alexander Ogston 1881 yılında stafilokokları, üremeleri esnasında tam ayrışmadığı ve kümelenmeler yaptığı için üzüm salkımına benzetmiş, *Staphylococcus* olarak isimlendirmiştir. Fare ve kobaylar için stafilokokların patojen bir mikroorganizma olduğunu göstermiştir. Rosenbach 1884’te stafilokokları kolonilerin renklerine göre ayırmış ve beyaz renk koloni oluşturanları *Staphylococcus albus*, sarı renk koloni oluşturanları ise *Staphylococcus aureus* olarak tanımlamıştır (16). Stafilokoklar, *Macroccoccus* cinsiyle birlikte *Staphylococcaceae* ailesi, *Bacillales* takımı, *Firmicutes* şubesi içinde sınıflandırılmıştır (17).

S. aureus, stafilokoklar içinde en önemli insan patojenidir ve koagülaz üreterek plazmayı pıhtılaştırması ile diğer stafilokoklardan ayrılmaktadır (18). Yetişkinlerin anterior burun deliklerinde %20-40 oranında kolonize olmaktadır. Deri kıvrım yerleri, nazofarinks, rektum, perine, aksilla ve vajina da bu bakteriyle kolonize olan diğer bölgelerdir. Sıklıkla normal flora elemanı olmasına rağmen uygun koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (17, 19).

2.2. Morfolojisi ve Kültür Özellikleri

S. aureus, hareketsiz, sporsuz, katalaz ve koagülaz pozitif, 0,5-1,5 µm çap uzunluğunda gram pozitif koklardır. Bakteriler çoğalırken birden fazla düzlemde bölündüklerinden ve bölünmeden sonra birbirlerinden tam olarak ayrılmadıklarından mikroskopide üzüm salkımı şeklinde görülürler. Adlarını da Yunan alfabesinde üzüm salkımı anlamı taşıyan ‘stafil’ kelimesinden almaktadırlar (19).

Stafilokoklar genellikle fakültatif anaeroptur. Kuruluğa, yoğun tuz konsantrasyonuna ve dış çevre şartlarına dayanıklıdır. Çoğunlukla %7,5-10 NaCl bulunan besiyerlerinde 18-45 °C’de kolay ürerler. Optimal üreme ısıları 30-37 °C, optimal pH 7-7,5’dir. Rutin besiyerlerinin çoğunda üreyebilirler, bununla birlikte koyun kanlı

agarda (KKA) 18-24 saatte üreyen düzgün sınırlı, yuvarlak, 1-4 mm çapında hafif konveks, S tipinde tipik koloniler oluştururlar. *S. aureus* kökenlerinin çoğunda altın sarısı pigment oluşumu vardır ve beta hemoliz yaparlar (16). Hücre zarında yer alan karotenoid pigmentleri bu altın sarısı rengin oluşumunda görev almaktadır. Kapsüllü suşlar mukoid koloni yapabilirler (17, 19).

2.3. Mikrobiyolojik ve Metabolik Özellikler

S. aureus koloni morfolojisi, koagülaz gibi enzimatik özellikleri ve biyokimyasal özellikleri ile insanda bulunan diğer stafilokok türlerinden ayırt edilebilir (Tablo 1). Streptokoklardan ayırt edilmesinde ürettiği katalaz enzimi kullanılır. Karbonhidratları yavaş fermente edip laktik asit üretirler ancak gaz oluşturmazlar (20). Hücre morfolojileri ve katalaz olumlu olmaları sebebiyle mikrokoklarla karışabilseler de 100 µg furazolidona ve 200 µg/dl lizostafine duyarlı olmaları, anaerob ortamda üreyebilmeleri ve 0,4 µg/dl eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturabilmeleri, basitrasine dirençli olmaları ve oksidaz negatif olmalarıyla mikrokoklardan ayrılırlar (21). *S. aureus*'un *Staphylococcus schleiferi* gibi deoksiribonükleaz (DNaz) enzimi bulunur (19).

Yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebilen *S. aureus*'u klinik örneklerden izole etmek için mannitol salt agar kullanılabilir. Bu agarın içeriğinde %10 NaCl, fenol kırmızısı, mannitol vardır ve *S. aureus* için selektif besiyerdir. Mannitolü fermente ederek sarı halkayla çevrili koloniler oluşturur. *S. aureus*'un selektif besiyerlerinde üremesi için en az 48-72 saat süre gerekebilir (18, 22).

S. aureus'un identifikasyonu için referans test koagülaz testidir. Ancak mannitol fermentasyonu, novobiyosin duyarlılığı ve DNaz testleri de tür düzeyinde identifikasyon için kullanılabilir. Koagülaz testi, tüp yöntemiyle serbest koagülazın, lam yöntemiyle ise bağlı koagülazın tespiti için kullanılır (17). Tüp koagülaz ve lam koagülaz testleri için EDTA içeren tavşan plazması kullanılmalıdır. Bunların dışında *S. aureus*'un üremesini inhibe eden alfazurin A'nın kullanıldığı disk difüzyon yöntemi, anti-protein A antikor kaplı lateks partiküllerinin kullanıldığı lateks aglütinasyon yöntemi, *S. aureus*'un ürettiği asetilglukozaminidaz enziminin antikorlarından faydalanılan enzim immünassay (EİA) ve termostabil

endonükleazları kodlayan *nuc* genine özgül problemlerin kullanıldığı deoksiribonükleik asit (DNA) prob ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi kullanılan yöntemler vardır (21).

Tablo 1. Klinik önemi bulunan stafilocokların temel özellikleri (16)

Özellik	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Anaerobik üreme ve glukoz fermentasyonu	+	+	-
Mannitole etki (aerobik)	+	d	d
Mannitole etki (anaerobik)	+	-	-
Koagülaz	+	-	-
Hemoliz	+	-	-
Protein A	+	-	-
DNAse (Endonükleaz)	+	-	-
Alpha toxin	+	-	-
Novobiosin direnci	- (duyarlı)	- (duyarlı)	+ (direncili)
Pigment oluşumu	+	-	-

(+:pozitif, -:negatif, d:değişken)

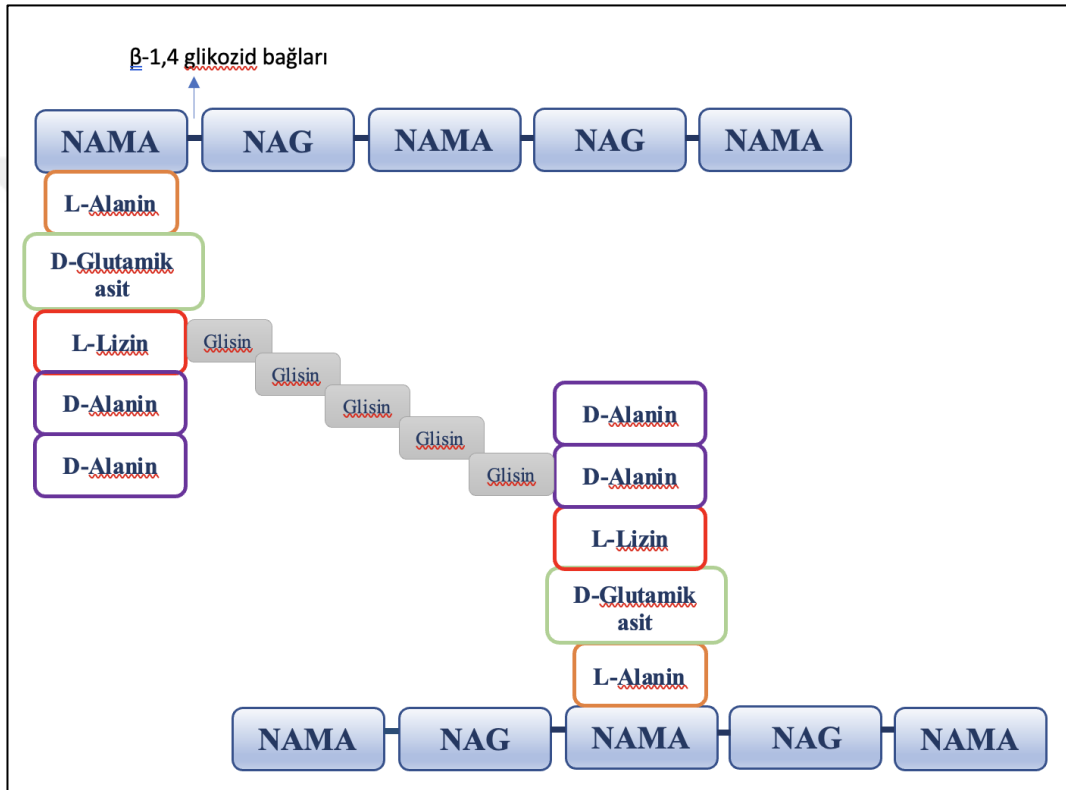
2.4. Hücre Yapısı ve Virulans Faktörleri

2.4.1. Hücre duvar yapısı

Birçok stafilocokta hücre duvarının dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülüdür. Bakterilerin, polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından fagositozunun engellenmesinde kapsül görev yapar. Kapsülün dışında stafilocoklar tarafından farklı miktarlarda monosakkaritler, proteinler ve küçük peptidler içeren, gevşek bağlı ve suda çözünen ince bir film tabakası (slime veya biyofilm) üretilir. Bu tabaka bakterilerin kateter, şant, eklem gibi doku veya yabancı cisimlere tutunmasını sağlar (23).

Hücre duvarının ana komponenti, duvar ağırlığının yarısını oluşturan peptidoglikandır. Peptidoglikan yapısı; β -1,4 glikozid bağları aracılığıyla birbirlerine bağlanan ve 10-12 kadar olup, ard arda dizilen N-asetil muramik asit (NAMA) ve N-

asetil glukozaminden (NAG) oluşan çapraz bağlı polimerlerden meydana gelir. Pentapeptid yan zincirleri N-asetil muramik asite bağlı halde bulunur ve sırasıyla; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin yapısındadır. Bunlar bir oligopeptiddeki D-alanin ile komşu oligopeptiddeki L-lizin arasında çapraz pentaglisin köprüleri ile birbirlerine bağlanır (Şekil 1). *S. aureus*'ta çok sayıda çapraz bağlı tabaka bulunmaktadır. Bu özellik hücre duvarının daha sağlam olmasını ve lizozim enzimine karşı direnci sağlar (24, 25).



Şekil 1. Peptidoglikanın yapısı

Hücre duvarının sentezi enzimatik olarak birçok adımdan oluşan bir süreçtir. Peptidoglikanın yapımında karboksipeptidaz, transpeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimler görev alır ve bunlar penisilin bağlayan proteinler (PBP) adını alırlar. Bakterinin büyümesi ve bölünmesi gibi durumlarda hücre duvarının şeklini koruması ve bir arada tutulmasından sorumludurlar. Beta-laktam antibiyotikler, penisilin bağlayan proteinleri hedef alırlar (26). *S. aureus*'un hücre duvarında PBP 1, 2 ve 3 bulunur ancak MRSA'larda farklı bir PBP olan PBP2a bulunmaktadır. PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere olan afinitesi azalırsa bakteride bu antibiyotiklere karşı

direnç oluşur. Eğer PBP'lerde inaktivasyon olursa o zaman bakterinin ölümü gerçekleşir (27, 28).

2.4.2. Teikoik asit

S. aureus'un hücre duvarında bulunan bir başka yapı peptidoglikana kovalan şekilde bağlı olan, özgün ribitol (beş karbonlu monosakkarit) fosfat polimerleri içeren teikoik asittir. Sitoplazmik membranın glikolipidlerine bağlanmış ise bu lipoteikoik asit olarak isimlendirilir. Mukozal yüzeylere bağlanmada ve hücre duvarı ile ilişkili enzimlerin tutunmasında işlev görür. Teikoik ve lipoteikoik asitler, hücre duvarına sertlik ve direnç sağlamanın yanında, virulansa katkı yapan biyolojik aktiviteye de sahiptir. Stafilokokların konağa adherensini sağlarlar (29).

2.4.3. Kapsüler polisakkaritler ve slime tabakası

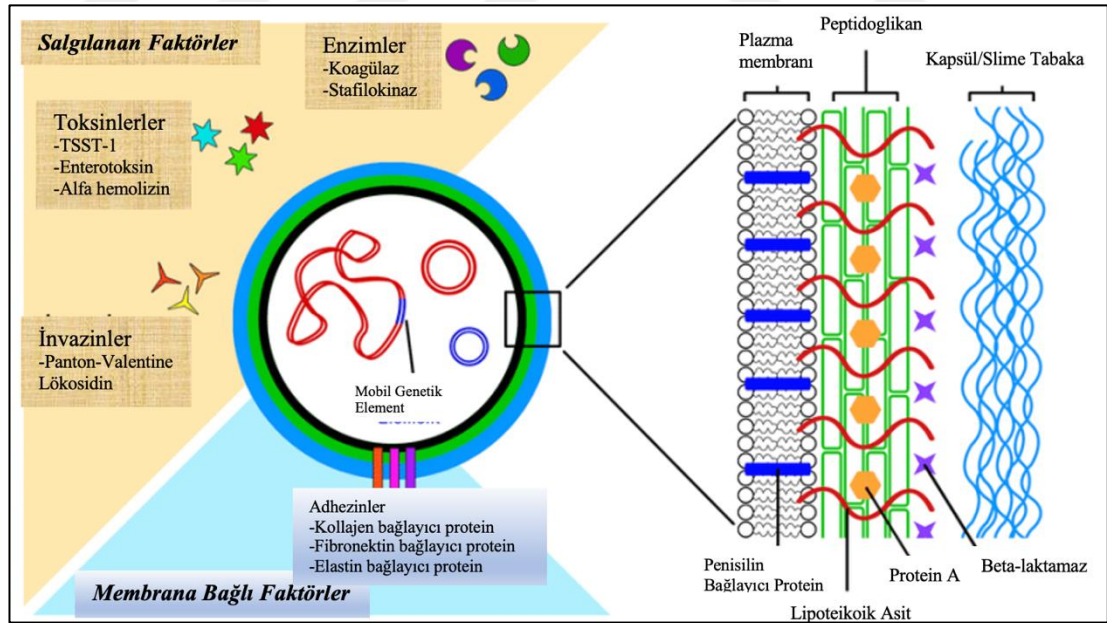
S. aureus izolatlarının çoğu polisakkarit yapıda bulunan bir mikrokapsüle sahiptir. Bu kapsüler polisakkaritler konak hücreye ve kataterler gibi yabancı cisimlere yapışmayı sağlamakta ve bakterinin polimorfonükleer hücreler tarafından fagosite edilmesini engellemektedir (30). Bugüne kadar immunotiplendirme sonucu 13 kapsüler polisakkarit tipi tanımlanmıştır. İnsanda enfeksiyona sebep olan önemli klinik izolatların %70-80'i kapsüler serotip 5 ve 8'e aittir. MRSA'nın %60'ı kapsüler serotip 5 iken, MSSA'nın %60'ı kapsüler serotip 8 olarak bulunmuştur (17).

İlk kez Christensen ve arkadaşları tarafından gösterilen slime tabakası gevşek ve suda çözünen bir tabaka olarak tanımlanmıştır. Bu tabaka %40 karbonhidrat ve %27 protein içeren hücre dışı bir maddedir. Yüzeylere yapışmayı kolaylaştıran bir virulans faktörüdür ve çok kuvvetli bir antijenik yapısı vardır. *S. aureus*'un özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarında vücut içine yerleştirilen katater, şant, prostetik kapak gibi yabancı cisimlere yapışması slime faktör kaynaklı enfeksiyon patogenezinde ilk basamağı oluşturur (16).

2.4.4. Yüzey adezyon proteinleri

S. aureus'un yüzey proteinlerinin görevi bakterinin; doku elemanları ve kan yardımıyla korunarak immün sisteminden kaçmasına aracılık etmek, konak matriks

proteinlerine (fibronektin, fibrinojen, elastin, kollajen ve diğer hücrel lipidler) bağlanarak dokuya ve plastik implantlara yapışmasını sağlamaktır. Bu yüzey adezyon proteinleri MSCRAMM (Adezif Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Elemanları; Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) olarak isimlendirilmekte ve konak dokulara kolonizasyona katkı sağlamaktadır. MSCRAMM adezin ailesine ait sayısı 20'den fazla olan küçük proteinler, *S. aureus*'un hücre duvarının peptidoglikan tabakasına bağlı halde bulunur (Şekil 2). Bu proteinlere ait genler kromozom üzerinde yer alır ve tüm *S. aureus* suşlarında bulunur. En iyi bilinen MSCRAMM proteinleri; stafilokokkal protein A, fibronektin bağlayan protein A ve B, pıhtılaşma faktör (clumping factor) proteinleri A ve B'dir. Stafilokokkal protein A, IgG3 dışındaki IgG antikorlarının Fc reseptörlerine bağlanıp bakteriyi kompleman yanıtından ve fagositozdan korur. Bazı adezinler stafilokokların neden olduğu özellikli hastalıklarla ilgili virulans faktörleridir. Örneğin pıhtılaşma faktörü B nazal kolonizasyon; fibronektin bağlayıcı protein A ve B ventriküler destek cihazı ile ilişkili enfeksiyonlar; kollajen bağlayıcı protein ise osteomyelit ile ilişkilidir (17, 30).



Şekil 2. *S. aureus*'un hücre duvarı ve virulans faktörleri (31)

2.4.5. Stafilokokal toksinler

S. aureus; sitolitik toksin, enterotoksin, toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) ve eksfoliyatif toksin gibi toksinler üretmektedir. Sitolitik toksinler kendi aralarında sitotoksinler (alfa, beta, delta ve gama) ve Panton-Valentin l kosidini (PVL) olarak ayrılır. Sitotoksinler nötrofilleri parçalayarak açığa çıkan lizozomal enzimlerle  evre dokulara zarar vermektedir. PVL ise nekrotizan pn monilerle ve ciddi deri, yumuşak doku enfeksiyonları ilişkili bir sitokindir (17, 32).

Enterotoksinler, TSST-1 ve eksfoliyatif toksin ise s perantijenler olarak bilinen polipeptidlerdir. Makrofajlardan ve T lenfositlerden büyük miktarlarda sitokin salınımı (sitokin fırtınası) gerçekleştirirler. Bu durum, şiddetli bir inflamatuvar yanıt ve çok sendromuna yol açar (23, 33, 34).

2.4.5.1. Sitotoksinler

Alfa toksin: *S. aureus*'un çoğu su u tarafından üretilen, plazmid ve bakteriyel kromozom tarafından kodlanabilen 33 kDa a ırlı ında bir polipeptiddir. Hücrelerde por oluşumuna neden olarak hücreden K^+ atılımı ve hücreye Na^+ , Ca^{+2} alımı gerçekleştirir. Sonuç olarak hücreler  ismeye ba lar ve parçalanmalar meydana gelir. Alfa toksine en duyarlı hücreler eritrositlerdir. Koyun kanlı agarda oluşan hemoliz zonundan sorumludur (23, 35, 36).

Beta toksin: Sfingomiyelinaz C olarak da adlandırılan, ısıya duyarlı, 35 kDa a ırlı ında bir proteindir. Sfingomiyelin  zerine etki ederek membranların lipit komponentlerini bozar. Membran fosfolipidlerinin hidrolizine yol açar. Alfa toksin ile birlikte abse oluşumundan ve doku hasarından sorumludur (37, 38).

Gama toksin: Bu toksinler nötrofil, makrofaj gibi hücrelerde por oluşumuna sebep olur. Permeabilite artı ı ve osmotik geçirgenliği bozarak hücrenin parçalanmasını sa lar. Gama toksin ve PVL por oluşturan çift bileşenli toksinlerdir. Jel elektroforezinde g   hızlarına göre S (slow eluting proteins) ve F (fast eluting proteins) bileşenler olarak ayırt edilebilen polipeptidlerden oluşurlar (32, 39).

Delta toksin: Bu toksin *S. aureus* suşlarının %97'sinden fazlası tarafından üretilen immünolojik olarak alfa ve beta toksinden ayrılan 3 kDa ağırlığında bir polipeptittir. Deterjan benzeri etki gösterip hücre membranının stabilizasyonunu bozarak hasarlar oluşturur (32, 40).

Panton-Valentine Lökosidin (PVL): Panton ve Valentin adlı araştırmacılar tarafından 1932'de deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili olduğu açıklanmış, adını bu araştırmacılar tarafından almıştır (41). Lökositler ve polimorfonükleer hücreler üzerindeki litik etkisiyle doku nekrozuna sebep olur. Lökotoksiktir fakat hemolitik özellik göstermez (17, 41, 42).

Toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) enfeksiyonlarının patogeneğinde özellikle de hemorajik pnömoni, osteomyelit ve deri-yumuşak doku enfeksiyonlarında PVL'nin rolü olduğu düşünülmüştür (43). Çoğunlukla toplum kökenli enfeksiyonlarda görülmekle birlikte, PVL pozitif suşların hastanelerde de yayılabildiği, hatta hastane kaynaklı salgınlara neden olabildiği görülmüştür. PVL pozitifliği TK-MRSA suşlarının tamamında saptanırken hastane kaynaklı suşların minimum %5'inde saptanmaktadır (32).

PVL pozitif *S. aureus* enfeksiyonları, negatif olan enfeksiyonlara göre daha şiddetli seyreder; lökopeni, yüksek ateş, sepsis ve ölümle sonuçlanabilir (41). PVL, normal veya bütünlüğü bozulmuş deride nekrotik etki gösterir ve fronkül ve abse gibi oluşumlara sebep olur. Ağır nekrotizan pnömonilerle de ilişkili olduğu gösterilmiştir (44, 45).

2.4.5.2. Eksfoliyatif toksinler

Eksfoliyatif toksinler, 24 kDa ağırlığında iki protein olan Eksfoliyatif toksin A (ET-A) ve Eksfoliyatif toksin B (ET-B)'den meydana gelir. ET-A ısıya dirençli ve kromozoma entegre bir bakteriyofajla taşınırken, ET-B ısıya duyarlı ve plazmid üzerinde taşınır (46). Ortak özellikleri süperantijen olmaları ve serin proteaz aktivitesine sahip olmalarıdır. Stafilokokun sebep olduğu enfeksiyonlarda eksfoliyatif ve veziküler deri lezyonlarından sorumludur. Bu enfeksiyonlara örnek olarak "Stafilokokal haşlanmış deri sendromu" verilebilir (47, 48).

2.4.5.3. Enterotoksin

Stafilokokal enterotoksinler A, B, C, D, E, G, H, I olmak üzere serolojik olarak sekiz farklı enterotoksin tipi ve enterotoksin C'nin 3 subtipinden oluşur. Enterotoksin F günümüzde artık TSST-1 olarak adlandırılmaktadır. Enterotoksinler ısıya ve gastrointestinal sistemdeki enzimlerle hidrolize dirençlidir. Bu sebeple enterotoksin üreten stafilokoklarla besin maddesi bir kere kontamine olursa sindirim süreci ve yiyeceğin tekrar ısıtılması besin zehirlenmesi oluşumunu önlemez (21, 23).

2.4.5.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Eritrodermi, mental konfüzyon, diyare, ateş ve hipotansiyon ile giden toksik şok sendromundan sorumlu bir süperantijendir. *S. aureus* suşlarında %5-25 oranında TSST-1 geni bulunur (21, 49). 1980'lerde toksik şok sendromu yüksek absorban tamponları kullanan kadınlarda tespit edilmekteyken, günümüzde menstrasyonla ilişkilendirilemeyen durumlarda ve postoperatif yaralarda da oluşabildiği görülmüştür (23).

2.4.6. Enzimler

S. aureus'ların neredeyse hepsi enzim ve sitokin üretir. Esas amaçları bakterinin, konakçı dokusunda gelişebilmesi için uygun ortam sağlamaktır (50).

2.4.6.1. Katalaz

S. aureus'un virulansında rol alan enzimlerden biri olan katalaz, mikroorganizmanın sindiriminden sonra fagositik hücrelerdeki süperoksit dismutaz enziminin reaksiyonu sonucu oluşan bakteri hücresindeki hidrojen peroksiti ve serbest radikalleri inaktive ederek su ve oksijene katalize eder (17).

2.4.6.2. Koagülaz

S. aureus, serbest ve bağlı koagülaz olarak iki tip koagülaza sahiptir. Bağlı koagülaz hücre duvarında bulunur ve fibrinojeni doğrudan fibrine dönüştürerek kümelenme oluşturur. Serbest koagülaz ise serumda bulunan coagulase reacting factor (CRF) yardımıyla staphylothrombin adında trombin benzeri bir faktör oluşturur. Bu faktör

fibrinojenin fibrine dönüşmesine aracılık eder. Koagülazın hastalık patogenezindeki etkisi olarak stafilokokların neden olduğu abse çevresinde fibrin tabakası oluşumuna sebebiyet verdiği ve enfeksiyonu lokalize edip, organizmayı fagositozdan koruduğu düşünülmektedir (23).

2.4.6.3. Lipaz

Lipaz, yağları hidrolize ederek stafilokokların vücutta lipid içeriği fazla olan bölgelerde yaşamasını sağlamakta ve cilt, cilt altı dokulara invazyonu sağlayıp fronkül ve karbonkül gelişiminde rol oynamaktadır (25, 51).

2.4.6.4. Hyalüronidaz

Bağ dokunun hücreler arası matriksinde var olan hyalüronik asidi hidrolize eder ve *S. aureus*'un dokulara yayılımında rol oynar (52).

2.4.6.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)

Stafilokoklar tarafından üretilen stafilokinazlar, plazminojenden plazmin oluşumunu sağlar. Fibrinolitik etki ile fibrini parçalayarak dokularda enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (52).

2.4.6.6. Nükleaz

Visköz DNA'yı hidrolize eder ve ısıya dayanıklıdır. Stafilokokların neredeyse hepsi bu enzimi üretirken termostabil nükleaz enzimi *S. aureus*'a özgü bir markerdir (23, 25).

2.4.6.7. Deoksiribonükleaz (DNaz)

Deoksiribonükleaz enzimleri, nükleik asitleri 3'fosfomononükleotidlere ayıran fosfodiesterazlardır. Özellikle erişkin tip akut solunum yetmezliği sendromu ve yaygın damar içi pıhtılaşma bulunan hastalardan izole edilen suşlarla ilişkili bulunmuştur (53).

2.4.6.8. Beta-laktamaz (Penisilinaz)

Penisilinin tedavide kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda stafilokok izolatlarının çoğunun penisiline karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak bu mikroorganizmaların zamanla beta-laktamaz üretmeleri penisilin direnci gelişmesine sebep olmuştur. Beta-laktamazlar, antibiyotiklerin beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturup siklik amid bağını bozarak bir açıl enzim türevi oluştururlar. Böylece beta-laktam antibiyotiklerin antibakteriyel etkisini ortadan kaldırır.

Beta-laktamazlar geniş bir enzim grubudur ve moleküler yapılarına ve işlevselliklerine göre sınıflandırılırlar. Bugüne kadar tanımlanan dört moleküler sınıf vardır. A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar serin-ester aracılı mekanizma ile çalışırlar. Sınıf B beta-laktamazlar ise metallobetalaktamazlardır ve kofaktör olarak çinkoya gereksinim duyarlar. A sınıfı beta-laktamazlar, substrat olarak penisilini tercih eden beta-laktamazlardan oluşur. *S. aureus*'un beta-laktamazları (Grup 2a) da bu grup enzimler içerisinde yer alır (54).

Stafilokokal beta-laktamazlar çoğunlukla küçük plazmidlerle ya da transpozonlarla taşınır. Bununla beraber büyük plazmidler tarafından kodlanan beta-laktamazlar ve farklı direnç mekanizmaları da bulunmaktadır (55, 56).

2.5. Epidemiyoloji

Stafilokoklar yüksek ısı ve antiseptiklere duyarlı ancak kuru zeminlerde uzun süre hayatta kalabilen, yoğun tuz konsantrasyonu ve dış çevre şartlarına dayanıklılık gösteren bakterilerdir. Günümüzde hastane kaynaklı patojenler arasında görülmesi, artan antibiyotik direnci ve epidemilere yol açabilmesi nedeniyle önemini korumaktadır (23, 26).

İnsanlar *S. aureus* için doğal bir rezervuardır ve nemli deri bölgelerinde *S. aureus*'un geçici asemptomatik kolonizasyonu enfeksiyondan çok daha yaygındır. Yenidoğanlarda göbek kordonu kalıntısı, deri ve perianal bölgelerde sıklıkla *S. aureus* kolonizasyonuna rastlanır. Doğurgan kadınların vajeninde %10 oranında bulunur ve taşıyıcılık menstruel dönemde artar (19, 23). Erişkinlerde anterior burun deliklerinde % 20-40 oranında kolonize olmaktadır (17). Hastanede yatan hastalar,

ekzematöz cilt hastalığı olanlar, damar içi madde kullananlar, insüline bağımlı diyabetliler, uzun süreli kalıcı intravasküler kateteri olan hastalar ve sağlık çalışanlarında genel popülasyona göre daha yüksek oranlarda görülmektedir. Bulaşma, kolonize bir taşıyıcıyla doğrudan temas yoluyla gerçekleşir. Kolonizasyon geçici veya kalıcı olabilir ve yıllarca sürebilir (19, 23).

S. aureus, hastane enfeksiyonlarının en sık etkenlerinden biridir ve birçok suşu metisiline dirençlidir. MRSA suşlarının hastanede yatan bireyler arasında hızla yayılması 1980'li yıllardan itibaren bildirilmeye başlanmıştır. Bu suşlar özellikle hastane çalışanlarının elleriyle kolonize hastalardan diğer hastalara yayılır. MRSA enfeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye hatta hastaneden hastaneye farklılıklar göstermektedir Türkiye'de 2016 sürveyans verilerine göre invaziv *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci sefoksitin tarama ve/veya oksasilin MİK sonuçlarına göre % 23,6 olarak belirlenmiştir (57).

2.6. *S. aureus*' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar

S. aureus'un neden olduğu hastalıklar, bakterinin dokulara doğrudan yayılımı ve harabiyeti ile ya da bakterinin ürettiği toksinlerle oluşur (23).

2.6.1. Deri enfeksiyonları

Folikülit: Kıl folikülleri ve çevresiyle sınırlı piyogenik bir enfeksiyondur. Kızarıklık, ağrılı lezyonlar şeklindedir. Sistemik semptomları yoktur (19).

Fronkül: Kıl folliküllerine derin yerleşmiş, çoğunlukla yüz, boyun, aksillada ağrılı, kırmızı, çevresi endurasyonlu, nodüllerdir. Lezyonun içinde bakteri, kan ve ölü deri hücrelerinden oluşan sarı bir sıvı vardır ve cerrahi insizyonla ya da kendiliğinden drene olur (17).

Karbonkül: Birçok kıl follikülünü içeren daha derin yerleşimli lezyonlardır. Ateş, titreme gibi sistemik bulgular eşlik edebilir. İyileşme sonrasında eskar dokusu bırakır. Karbonkül oluşan kişiler sıklıkla *S. aureus* için burun taşıyıcısıdır (19).

İmpetigo: Sıklıkla çocuklarda gözlenen yüzeysel bir deri enfeksiyonudur. Büllöz ve büllöz olmayan impetigo olarak iki şekilde görülür. Büllöz olmayan impetigo tek,

kırmızı makül şeklinde başlar ve vezikül haline döner. Devamında veziküller rüptüre olur ve kaşıntılı, bal rengi bir kurut tabakası ile kaplanır. Büllöz impetigo ise stafilokoksik haşlanmış deri sendromunun lokalize bir formudur (17).

Hidradenit: Koltuk altı, kasık, perianal bölgeler gibi apokrin ter bezlerinin bulunduğu bölgeleri içeren piyojenik enfeksiyondur (19).

Mastit: Doğum ve sonrasında emziren annelerde ikinci ve üçüncü haftalarda görülen meme enfeksiyonudur (17).

Yara enfeksiyonları: Cerrahi sonrası alan çevresinde eritemli, ödemli ve ağrılı yaralar olarak gözlenir. Bu enfeksiyon sıklıkla enfekte hastanın burnunda taşıdığı aynı *S. aureus* suşuyla oluşur. Yara enfeksiyonları yayılırsa sellülit, lenfadenit ve nekrotizan fasiite sebep olabilir (19).

2.6.2. *S. aureus*'un toksinleriyle yaptığı hastalıklar

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu: Çoğunlukla *S. aureus* suşlarının sebep olduğu çocukluk döneminde görülen eksfoliyatif toksinler (ET-A ve ET-B) aracılığıyla oluşan eritemli ve yaygın büllü bakteriyel deri hastalıklarındandır. Deri hafif bir travma ile soyulabilir. Buna "Nikolsky belirtisi" denir (58).

Toksik şok sendromu: 1980'li yıllarda menstruasyon sırasında tampon kullanan kadınlarda görülen bir hastalık olarak dikkat çekmiştir. Ancak daha sonra menstruasyon ile ilişkisiz vakalar da bildirilmiştir. Yüksek ateş, hipotansiyon, şiddetli miyalji, bol sulu ishal başlıca semptomlardır. Mukozalar kızarır ve vajinal akıntıda *S. aureus* saptanabilir (19).

Besin zehirlenmeleri: Isıya dayanıklı enterotoksin üreten *S. aureus* suşlarıyla kontamine gıdaların alınmasıyla meydana gelir. Toksin kaynatma veya pişirmeyle inaktive olmaz. Dondurma, krema, işlenmiş etler, patates salataları ve konserve gıdalar sık rastlanan sorumlu besinlerdir. Gıda alımından sonraki 2-6 saat içinde bulantı ve kusmayla semptomlar başlar ve devamında tabloya ishal eklenir (59).

Bakteriyemi: *S. aureus*'a bağlı bakteriyemi insidansı son zamanlarda giderek artmaktadır. Nazokomiyal bakteriyemi hastaneye yatıştan 2 gün sonra ortaya çıkan,

toplumdan kazanılan bakteriyemi ise başvuru esnasında ya da hastaneye yatıştan 2 gün öncesine kadar saptanan bakteriyemidir (60). Stafilokokal bakteriyemilerin %86'sı nozokomiyal kökenlidir.

2.6.3.Endokardit

S. aureus doğal kapak ve prostetik kapak endokarditinin başlıca sebeplerinden biridir. *S. aureus* endokarditleri ani başlar ve hızlı ilerler. Yüksek ateş, yeni oluşan üfürümler veya üfürüm seslerinde değişimler oluşabilir. Peteşiyel deri lezyonları, Janeway lezyonları, Osler nodülü, Roth spots gibi bulgular tanıda yardımcı olabilir (19).

2.6.4.Alt solunum yolu enfeksiyonları

Pnömoni ve ampiyem: Toplum kaynaklı pnömonilerin %10'undan, hastane kaynaklı pnömonilerin ise %20-30'undan *S. aureus* sorumludur (61). Toplum kökenli *S. aureus* pnömonileri sıklıkla influenza epidemilerinin peşine görülür. Hastane kökenli olanlar ise sıklıkla entübasyona veya aspirasyona bağlı olarak görülür.

Plevral ampiyem başlıca pnömoni ve akciğer absesinden komşuluk yoluyla veya göğüs cerrahisinin bir komplikasyonu sonucu oluşur. Ateş, göğüs ağrısı, solunum sıkıntısı gibi semptomlar görülür (19).

2.6.5.Kemik-eklem enfeksiyonları

Osteomyelit: Yüksek ateş ve uzun kemiklerin metafiz bölgesinde ağrı ile ortaya çıkar. Olguların yarısında kan kültürü pozitifdir. Tedavide penisilinaza dirençli penisilinler tercih edilmelidir (62).

Septik artrit: Puberte öncesinde septik artritin başlıca sebebi *S. aureus*'tur. Erişkinlerde sıklıkla romatoid artrite sekonder olarak görülür. Lokal enfeksiyonlardan sonra hematogen yolla veya iyatrogenik olarak gelişebilir (25).

2.7. Stafilokok Enfeksiyonlarında Tedavi

Stafilokoklar deri ve mukozalarda yaygın olarak bulunurlar ve deri bütünlüğünün bozulmasıyla vücuda girerler. Yarada yabancı bir cisim olmadığı sürece enfeksiyonun gelişmesi için gereken bakteri sayısı çok fazladır. Ancak cerrahi yara enfeksiyonları, yabancı cisim ve cansız doku varlığı nedeniyle nispeten daha az sayıda organizma ile gelişir (23).

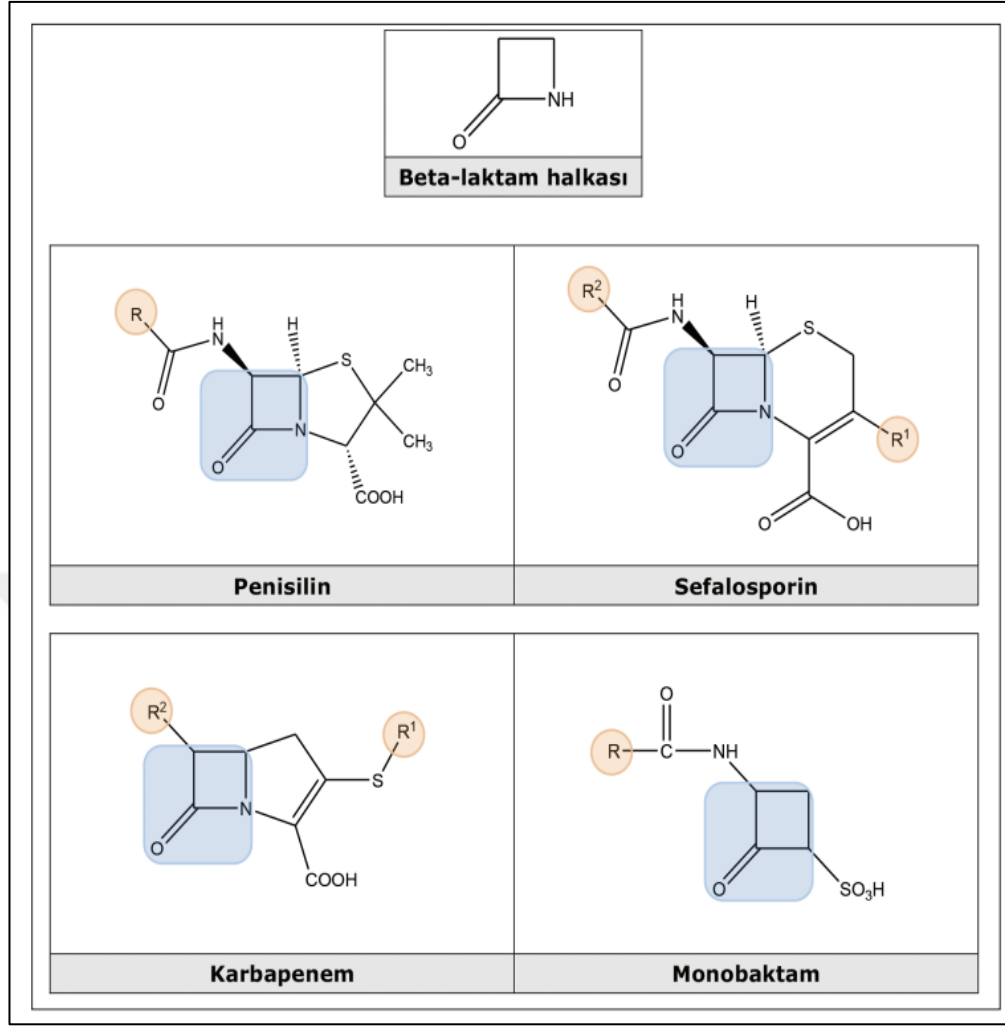
Penisilinin keşfinden sonra stafilokoklar hızla bu ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Bu sebeple penisilin direncine karşı semisentetik penisilinler (örn. metisilin, nafsilin, oksasilin, dikloksasilin) geliştirilmiştir. Bu semisentetik penisilinlerin etkisi beta-laktamaz hidrolizine karşı direnç göstermeleridir. Ancak metisilinin yaygın ve özensiz kullanımı sonucu metisiline karşı da direnç gelişmeye başlamıştır. Metisiline dirençli olan *S. aureus* suşları aslında beta-laktam antibiyotiklerin tümüne karşı direnç gösterir. MRSA enfeksiyonlarının yoğun olarak görüldüğü hastanelerde antibiyotik tedavisi olarak ilk seçilecek ilaç grubu glikopeptidlerdir (19).

2.7.1. Hücre duvar sentezini etkileyen antibiyotikler

2.7.1.1. Beta-laktam antibiyotikler

Beta laktam halkası taşıyan, benzer yapıda ve benzer etki mekanizmalarına sahip antibakteriyel ajanlardır. Bu antibiyotik grubunun içerisinde penisilinler, karbapenemler, monobaktamlar, sefalosporinler ve beta-laktamaz inhibitörleri bulunur. Bu antibiyotikler, farklı kimyasal bileşiklerin beta laktam halkasına eklenmesiyle birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 3). Penisilinlerde tiazolidin halkası bulunurken, sefalosporinlerde dihidrotiazin halkası bulunur. Karbapenemlerde ise tiazolidin halkası bulunur ancak bu halkaya sülfür yerine bağlı olan şey karbon atomudur. Monobaktamlarda beta laktamdan başka halka bulunmamaktadır (63).

Bakteri hücre duvarının yapısında temel bileşen peptidoglikan tabakadır. Bu tabakayı oluşturan zincir ve çapraz bağlar serin proteazlar (transglikozilazlar, transpeptidazlar, karboksipeptidazlar) tarafından yapılır. Bu enzimlere PBP de denir ve beta-laktam antibiyotiklerin hedefidir. Beta-laktam antibiyotikler PBP’i inhibe ederek etkisini gösterir (23).



Şekil 3. Beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı (63)

Penisilinler: Penisilin, Alexander Fleming tarafından 1928 yılında *Penicillium notatum* isimli küf mantarından elde edilmiş ve insanlara uygulanan ilk antibiyotik olmuştur. Birçok türevi olmasına rağmen gram pozitif bakterilere en etkili olanı penisilin G'dir. Kimyasal yapısı; beta-laktam halkası, tiazolidin halkası ve bir yan zincirden oluşur (64). Penisilinlerin hedefi hücre duvar sentezinde rol alan PBP'lerdir. PBP'ine bağlanıp, inhibe ederek peptidoglikan sentezini engeller. Böylece transpeptidasyon işlevini önleyerek hücre duvar sentezini bozar (65). Stafilokoklarda penisiline karşı oluşan direnç β -laktamaz üretimi sebebiyle oluşur. Bu enzim beta-laktam halkasını parçalayarak etkisiz hale getirir. Günümüzde beta-laktamaz üreten nozokomiyal stafilokokların oranı %95'ten fazladır (66).

2.7.1.2. Glikopeptid antibiyotikler

Günümüzde metisiline dirençli stafilokoklar ve beta-laktamlara dirençli enterokoklardaki artış klinikte vankomisin ve teikoplanin kullanımına yol açmıştır. Vankomisin, *Streptomyces orientalis*; teikoplanin ise *Actinoplanes teichomyceticus* etkeninden elde edilmiştir. Bu gruptaki ilaçlar, bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidoglikanın D-Ala-D-Ala dizisine bağlanarak transglikozilasyon ve transpeptidasyon basamaklarını inhibe ederler (25, 67).

Vankomisin: Klinik kullanıma 1958 yılında girmiştir ve yalnızca gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Vankomisinin etki mekanizması hücre duvar sentezini inhibe etmektir. Bunun yanı sıra hücre zarı geçirgenliğini bozarak protoplast hasarına yol açmak ve RNA sentezini engellemek de etkileri arasındadır (68).

Uzun yıllar vankomisine direnç görülmezken 1989 yılında ilk direnç enterokoklarda izole edilmeye başlanmış; 1996 yılında ise vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA) izole edilmiş. Ardından 2002 yılında *S. aureus* suşlarında vankomisin direnci saptanmaya başlanmış. Bu olguların ortak özelliği hastaların öncesinde çok sayıda ve uzun süreli glikopeptid antibiyotikleriyle tedavi almış olmasıdır (69).

Teikoplanin: Glikopeptit grubu içerisinde moleküler yapısı ve etki mekanizması vankomisine benzeyen bir antibiyotiktir. Vankomisine göre daha lipofilik özelliktedir. Amino ve karboksil uçlarının fenol grupları ile oluşturduğu asit yükü fizyolojik pH'da çözünmesine etkilidir. Teikoplaninin klinikte MRSA gibi gram pozitif bakterilerin yol açtığı pnömoni, osteomyelit ve yumuşak doku enfeksiyonu gibi ağır enfeksiyonlarda kullanılır. Genel olarak iyi tolere edilebilen yan etkisi düşük oranlarda görülen bir ilaçtır (68, 70).

2.7.2. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler

2.7.2.1. Aminoglikozidler

Gentamisin, amikasin, tobramisin stafilokok enfeksiyonlarında kullanılabilen etkili aminoglikozidlerdenidir. Tedavide tek başlarına kullanımda direnç gelişebildiği için

bu şekilde kullanımı önerilmez. Aminoglikozidlerin yanına vankomisin eklenmesi in vivo sinerjistik etki sağlar (71).

2.7.2.2. Oksazolidinonlar

Linezolid ve eperozolid, organik sentez yoluyla elde edilen oksazolidinon grubu içerisinde yer alan antibakteriyel ajanlardır. N-formylmethionyl tRNA-mRNA-30S kompleksini inhibe ederek protein sentezini engeller ve bakteriyostatik etki gösterirler. Linezolid, bu grubun ilk üyesidir (72).

2.7.2.3. Streptograminler

Streptograminler, ribozomda 50S alt üniteye bağlanıp peptid zincirinin uzamasını ve peptidil transferazı engelleyerek protein sentezini inhibe eden parenteral bir antibiyotiktir. Yapısında 30:70 oranında A ve B iki grup molekül olan kinupristin/dalfopristinin kombinasyonunu içerir. A ve B grup streptograminler protein sentezinin erken ve geç basamaklarını sırasıyla inhibe ederek birbirine sinerjik etki gösterir. Tek başlarına bakteriyostatik etki gösterirken kombine halleri bakterisidal etkilidirler (73).

2.7.3. Nükleik asit sentez inhibitörleri

2.7.3.1. Sülfonamidler ve trimetoprim

Sülfonamidler, dihidrofolat sentezinde paraaminobenzoik asidin (PABA) bakteri tarafından kullanılmasını kompetitif olarak engelleyerek dihidropteroat sentaz enzimini inhibe eder. Sonuçta dihidrofolat sentezi yapılamaz. Trimetoprim ise dihidrofolat redüktaza bağlanır, reversibl olarak inhibe eder ve dihidrofolattan tetrahidrofolat sentezini bloke eder. İn vitro testlerde MRSA suşlarının çoğuna trimetoprim-sülfametoksazol kombinasyonu etkili bulunmuştur (74, 75).

2.7.3.2. Kinolonlar

Bu grubun ilk üyesi nalidiksit asittir. Sonrasında nükleusuna flor atomu eklenerek florokinolonların etki spektrumu genişlemiştir (76). Kinolonlar, DNA giraz enzimini inhibe ederler ve bakterisidal etki göstermektedirler. Kinolonlara karşı direnç, DNA

girazdaki ve hedef topoizomerez IV'teki yapısal mutasyonlara veya efluks pompası norA'nın fazla ekspresyonuna bağılı olabilir (71).

2.7.3.3. Rifampin

Rifamisin, *Streptomyces mediterranei*'den elde edilir. Rifampin ise rifamisinin yarı sentetik bir türevi olarak geliştirilmiştir. RNA sentezini engelleyerek etki gösterir. Bunu DNA'ya bağımlı RNA polimeraz ile bir kompleks oluşturarak yapar. Rifampin tek başına kullanılırsa hızla direnç gelişir. Bu yüzden başka antibiyotiklerle kombine şekilde kullanılması önerilir (76, 77).

2.7.4. Hücre zarına etkili antibiyotikler

2.7.4.1. Daptomisin

Daptomisin, 1980'li yılların başlarında *Streptomyces roseosporus*'un fermentasyon ürünü olarak geliştirilen, gram pozitif bakterilere etkili, siklik yapıda bir lipopeptittir. Bakterilerin hücre duvarında bulunan lipoteikoik asitte transmembran kanallar oluşturup membran sentezini bloke etmektedir. Bu kanallar hücre içi K^+ , Mg^{+2} gibi iyonların ve ATP'nin sızmasına sebep olur (78). Ca^{+2} iyonları daptomisinin negatif yükünü azaltır ve hücre zarıyla etkileşimini artırır. DNA, RNA ve protein sentezi gibi makromoleküllerin sentezinin engellenmesine sebebiyet verir. Daptomisin hücre yıkımına yol açmadan bakterisidal etki gösterir. Bu da hücre duvarına etkili diğer antibiyotiklerden farklılık gösterir (79, 80).

2.7.5. Diğer ajanlar

2.7.5.1. Tetrasiklin

Tetrasiklinler, aminoaçil-transferaz RNA (tRNA)'nın 30S ribozom-mRNA kompleksine bağlanmasını bloke ederek protein sentezini inhibe eden geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiklerdir (81).

2.7.5.2. Mupirosin

Pseudomonas fluorescens'in fermantasyon ürünü olarak elde edilen antibiyotiktir. İzolösil-tRNA sentetazı inhibe ederek bakteriyel protein sentezini durdurur. Metabolik yıkımı hızlı olduğu için oral ve parenteral uygulamaya göre topikal kullanımı önerilir (25).

2.8. Stafilokoklarda Metisilin Direnci

Penisilin direncine karşı 1960'ta beta-laktamaza karşı dayanıklı yarı sentetik metisilin antibiyotiği kullanıma girmiştir. Metisilin yaygın ve özensiz kullanımı sonucu penisilin direncine karşı bulunan bu çözüm uzun sürmemiş ve kısa bir süre sonra ilk MRSA olguları Jevons tarafından 1961 yılında İngiltere'de bildirilmiştir (82) (83).

2.9. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları

Metisilin direnci; metisilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin gibi beta-laktamaz ile inhibe olmayan beta-laktam antibiyotiklere karşı gözlenen dirençtir. Metisilin direnci, beta-laktamaz enzimiyle değil, kromozomal yolla meydana gelir (71).

Penisilin bağlayan proteinlerin görevi, peptidoglikan öncüllerini hücre duvarına taşımak ve bağlamaktır. Bu PBP'lerin bir kısmı çift fonksiyonlu olup transglikozidaz ve transpeptidaz etkinliği bulundurulur. *S. aureus*'ta dört adet PBP bulunur. Bunlarda PBP2 çift fonksiyonlu, PBP1, PBP3 ve PBP4 tek fonksiyonludur. Transpeptidasyon pentapeptid zincirinin D-ala-D-ala terminalinde gerçekleşir. Duyarlı stafilokoklarda beta-laktam antibiyotikler hücre duvar prekürsörleri ile yarışarak enzimin (PBP) aktif bölgesine bağlanıp, transpeptidasyon basamağını inhibe ederler. Ancak doğal hücre duvar prekürsörlerinden ayrı olarak bu bağlanma kovalan bağ ile geriye dönüşsüzdür. Böylece PBP'lerin inaktivasyonu gerçekleşir ve bakteriyel ölüm gerçekleşir. MRSA'da temel direnç mekanizması, *mecA* geninin ürettiği farklı bir penisilin bağlayan protein olan beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı düşük affiniteye sahip PBP2a sentezine dayanmaktadır. Transpeptidasyonu sağlayan diğer PBP'ler beta-laktamlar varlığında inaktive olurken, PBP2a inaktive olmuş PBP'lerin yerini alarak hücre duvarının sentezini tamamlar (84).

2.10. Biyofilm

2.10.1. Biyofilmin tanımı ve tarihçesi

Biyofilm varlığından ilk kez 17. yüzyılda mikrobiyolojinin babası olarak bilinen Leeuwenhoek bahsetmiştir. Kendi dışından aldığı örnekte biyofilmi plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (85). Marshall, biyofilmin hücre dışı polimer bir fibril olduğunu ve bakterinin yüzeylere tutunabilmesinde öneminin olduğunu söylemiştir (86). Costerton ve arkadaşları, 1978 yılında biyofilm ile ilgili bir teori ortaya koymuş ve mikroorganizma tarafından üretildiğini, canlı ve cansız yüzeylere yapışmayı sağladığını mekanizmalarla açıklamıştır (87). Carpentier ve Cerf ise basit olarak biyofilmi, bakterilerin içerisinde gömülü olarak bulunan, yüzeye yapışmayı sağlayan organik polimer bir matriks olarak tanımlamıştır (88). Bu gelişmeler, araştırmacıların ilgisinin hücre duvarı yapılarından uzaklaşıp, biyofilm ve mikrokolonilerin ara yüzünü oluşturan ekstraselüler glikokaliks yapılarına kaymasına neden olmuştur. Biyofilmin günümüzdeki tanımı ise; herhangi bir yüzeye veya birbirlerine yapışmayı sağlayan, mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (89).

Yüzeylerde her koloni halinde yaşayan mikroorganizmalar biyofilm yapısında özellik taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısına sahip olan topluluklarda gösterilen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma özelliği bu biyofilm yapısı taşımayan kolonilerde görülmemekte ve bunlar planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedir. Bununla beraber, biyofilm yapısına sahip olan bakteriler zamanla matriksten kopup, planktonik formda dolaşıma geçseler bile ayrıldıkları topluluğun direnç karakterlerini barındırdıkları bildirilmiştir (90).

Biyofilmler canlı dokular, medikal implantlar, su sistemleri ve doğal su kaynakları gibi canlı veya cansız yüzeylerde oluşabilirler. Oluşumunda ise mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kan bileşenleri, kil veya çamur parçaları bulunabilir (89). Doğadaki sıvısal ekosistemler incelediğinde bakterilerin %99,9 oranında biyofilm aracılığı ile yüzeylere yapışıp çoğaldığı gösterilmiştir (90). Günümüzde biyofilmin, okyanusların derinlikleri ve derin yeraltı suları hariç tüm doğal ekosistemde bulunduğu kabul edilmektedir (91).

Biyofilm oluşturan bakteriler, planktonik formlarına göre antimikrobiyalere 100-1000 kat daha dirençlidir. Antimikrobiyalere karşı dirençli olmayan bir bakteri biyofilm oluşturduğunda dirençli hale, biyofilmden koptuğunda ise tekrar duyarlı hale geçebilmektedir. Biyofilm içerisinde oluşan anaerop ortam antimikrobiyale karşı direncin gelişmesinde önemlidir. Ayrıca biyofilm içerisinde metabolizma sonucu oluşan asidik atıkların pH'ı değiştirmesi antibiyotikler üzerinde antagonistik etki oluşturabilir. Biyofilm, bakteriler arasında direnç genlerinin aktarımında kolaylık sağlamak ve böylece bakterilerin antibiyotiklere dirençli hale gelmesinde önemli rol oynamaktadır (4, 92).

2.10.2. Biyofilmin yapısı

Biyofilm, hücre dış yüzeyinde düzensiz bir şekilde yayılmış olan polisakkarit yapıya sahip bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği, hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında ve aynı zamanda mikroorganizma türleri arasında değişkenlik gösterir (90). Biyofilmler, çok katmanlı heterojen bir yapıya sahiptir ve bu yapı içinde yaşayan hücrelere temel besin maddelerini ve oksijeni taşıyan “su kanallarını” bulunmaktadır (93).

Biyofilm yapısının bileşimi %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 ekzopolisakkaridler, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonları içermektedir (4). Biyofilmden fiziksel ve biyolojik yapı, çeşitli içsel ve dışsal faktörlerin etkileşimi ile düzenlenir ve fiziksel yapının ekzopolisakkaridler (EPS) ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir. EPS, bazen jelimsi veya viskoelastik özellikler sergileyebilir ve bu fazlara geçiş sırasında proteinler, Ca^{+2} iyonları ve polisakkaritler ile yapı daha sağlam hale gelir (94). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekzopolisakkaritler; fiziksel ve kimyasal özellikler açısından farklılık gösterebilir. Biyofilm içerisinde yaşayan mikrobiyal hücrelerin ürettiği polisakkaritler biyofilmin ana ekstrasellüler bileşimini oluşturur ve hücre yüzeyine ince şeritler halinde bağlanarak karmaşık bir ağ yapısı oluşturur. En yaygın olarak bulunan ekzopolisakkaritler arasında selüloz, aljinat ve poli-N-asetil glukozamin bulunur (95).

Biyofilm matriksinde bulunan proteinler dört ana grupta toplanabilir. Bu gruplar şunlardır: kıvrımlı fimbriyalar, biofilm associated protein topluluğu (biyofilm ile

ilişkili protein, BAP), lektinler (polisakkaritlerin çökmesine sebep olan bağlayıcı proteinler) ve oto taşıyıcı proteinler (bazı bakterilerin dış membranlarındaki proteinlerde bulunan yapısal bir bölüm). Pili ve kıvrımlı fimbriyalar, bakterilerin yapışkan uzantılarıdır (96).

Hücre dışı DNA (eDNA), son zamanlarda keşfedilen önemli bir biyofilm bileşeni olarak ortaya çıkmıştır. Ekzopolisakkarit yapısında fazlaca bulunan matriks elemanıdır. Antimikrobiyal ajanlara ve konakçının bağışıklık sistemine karşı bakterileri korur. Bakterilerde biyofilm gelişimini anlamak için eDNA'nın yapısını önemlidir (95).

Biyofilm oluşumu ortamın pH seviyesi, oksijen seviyesi, karbon kaynağı, osmolarite, yakın çevredeki besinlerin hücre içine alınması ve kullanılması ile atıkların uzaklaştırılması gibi faktörlerle yakından ilişkilidir. Ayrıca biyofilm oluşumunu etkileyen önemli bir faktör besin kısıtlaması sonucu üretilen "quorum sensing" moleküllerinin salınımıdır. Son zamanlarda bazı hücrelerden salgıladığı ve hücreler arasında sinyal iletimini sağlayan moleküllerin (örn.: açıl homoserin lakton) biyofilm üretimini düzenleyebildiği gösterilmiştir. Bu da biyofilmin çevresel adaptasyonunda "quorum sensing" in önemini arttırmıştır (87).

Biyofilm matriksi, içinde yaşayan organizmalara bağlı olarak farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin genellikle nötral veya polianyonik biyofilm matriksleri oluşturduğu, gram pozitif bakterilerin ise katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (94, 97).

2.10.3. Biyofilmin oluşum evreleri

Dönüşümlü tutunma: Biyofilm oluşumu, başlangıçta bakterilerin bir yüzeye tutunmasıyla başlar ve devamında biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik süreçler başlatılır. Biyofilm oluşumunun gerçekleşmesi için bakteriler yüzeye yeterince yakında olmalıdır. Yüzeye yaklaşırken hem çekici hem de itici güçler devreye girmektedir. Yaklaşık olarak 10-20 nm mesafede bakteri yüzeyindeki negatif yükler, çevre yüzeyindeki negatif yükler tarafından itilir. Bununla birlikte, bakteriyel hücreler ile yüzey arasındaki çekici etkileşim van der Waals kuvvetleriyle gerçekleşir

ve fimbria ve flagella gibi yapılarla mekanik bağlantı kurulur (98). Tutunma aşamasının ardından biyofilm oluşturmak için farklılaşma süreci “quorum sensing” adı verilen iletişim sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Quorum sensing ile bakteriler çevrelerindeki bakteri topluluğunun yoğunluğunu algırlar. Yüzeye tutunan her bakteri, ortama sinyal veren bir molekül salgılar. Yüzeye bağlı bakteri sayısı arttıkça, bu sinyal molekülün ortamdaki konsantrasyonu artar ve bu artış biyofilm oluşumu için bir dizi sürecin başlamasını tetikler. Biyofilm içerisindeki bakteriler hücreler arası, düşük molekül ağırlığına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (87).

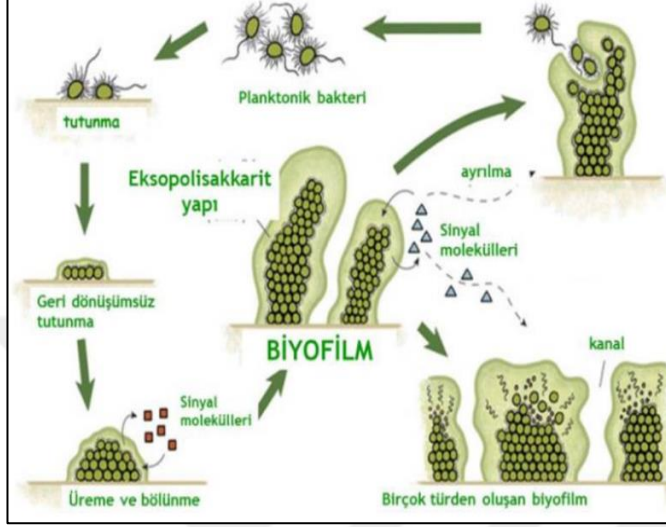
Dönüşümsüz tutunma: Yapışmada yüzeyle kısa mesafede olan iyon-dipol, dipol-dipol, iyonik ve kovalent bağlar ile hidrofobik ve hidrojen etkileşimler görev yapmaktadır. Bakteriler yüzeylere fimbria ve flagella gibi yapılar ile EPS oluşturarak dönüşümsüz bağlanabilirler. Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller yüzeye tutunduğunda, mikroorganizmalar önce organik materyale dönüşümlü olarak, ardından flagella ve fimbrialarını kullanarak dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye bağlanan bakteriler, EPS üretirler. Ancak EPS üretmeyen bakteri türleri de yüzeylere bağlanabilmektedir. Dönüşümsüz tutunmanın basamağının uzaklaştırılması için fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemler gerekmektedir (99).

Kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu: Yüzeye bağlanan bakteriler zamanla çoğalarak ilk koloniyi oluştururlar ve ardından farklı bakteri türlerinin de katılımıyla ikincil koloni oluşumu görülür. Biyofilm büyüdükçe matriks içinde kapsül oluşturan mikroorganizmaların sayısı artar. Mikrokoloniler büyür ve karmaşık mantar benzeri yapılar veya kulelere dönüşebilir (95).

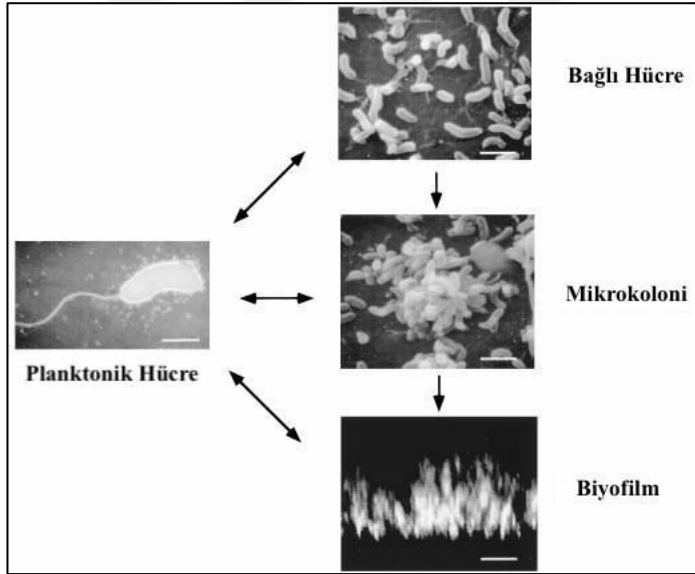
Olgun biyofilm: Biyofilmin mikrokoloni oluşumundan sonra EPS için gerekli olan genlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Bu aşama besin, oksijen gibi maddelerin hücrelere iletilmesi ve atıkların uzaklaştırılması için mikro kanalların oluşturulduğu aşamadır. Bu aşamalar ile yapı üç boyutlu şeklini kazanır (95).

Kopma veya ayrılma evresi: Biyofilm oluşum aşamalarının sonunda mikroorganizmalar besin durumuna bağlı olarak ayrılma sürecine geçerler. Ayrılma işlemi sıvı kayma kuvvetine, zayıf bağlanmaya, oksijen ve besin kaynaklarının

tükenmesine bağlıdır. Sıvı kayma kuvveti nedeniyle oluşan aşınma, küçük biyofilm parçalarının uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Dökülme ise besin kaynaklarının azalması ile büyük biyofilm parçalarının rastgele ayrılması anlamına gelir (95). Biyofilm oluşum evreleri Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 4. Biyofilm oluşum aşamaları (100)



Şekil 5. Planktonik bakteride biyofilm gelişme aşamaları (101)

2.10.4. Biyofilm mikroorganizma ilişkisi

Bakteri, konakçı yüzeyinde sabit kalabilmesi için bir takım virulans faktörlere sahiptir. Yüzey adezin proteinleri konakçının elastin, fibrinojen, fibronektin gibi

ekstraselüler matriks proteinlerine yapışır (29). Bu adherans sonrası bakteriler bir yandan çoğalırlarken bir yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Bu biyofilm oluşumu bakterilere birçok avantaj sağlar. Bakterileri nem, ısı, pH değişiklikleri, besin yokluğu ve ultraviyole ışığa maruz kalma gibi çevresel koşullardaki değişimlerin doğuracağı zararlardan korur. Konakçının kan akımı, tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlerine karşı dayanıklılık sağlar. Su kanalları sayesinde besinler biyofilm içinde homojen bir şekilde dağıtılırken, toksik metabolitlerin uzaklaştırılması da sağlanır (102).

Ayrıca bakterilerin ekzopolisakkarid matrikste kümeler halinde bulunmaları bakterilerin fagositoza karşı korunmalarını sağlar. İmmün sistemin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur. Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikallerine, dezenfektanlara, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelere göre daha dirençlidirler. Biyofilmin, mikroorganizmalara bu direnci sağlaması kronik seyirli enfeksiyonlara yol açmaktadır (90).

2.10.5. Biyofilm hastalık ilişkisi

Biyofilm oluşturan bakterilerin, antimikrobiyallere karşı daha dirençli olması, kronik seyirli enfeksiyonlara yol açması gibi sebepler biyofilm oluşturan bakterinin konakçıdan uzaklaştırılmasının ne kadar güç olduğunun göstergesidir. Biyofilm oluşturan bakterilerle doğal kapak endokarditi, kistik fibrozis, periodontit gibi rahatsızlıklar ve santral venöz katater, üriner kateter ve protez kapak gibi yabancı cisim sebebiyle oluşan enfeksiyonlar arasındaki ilişki ve bu ilişkide önemli bazı mekanizmalar tespit edilmiştir (90).

Hücrelerin ayrılması veya hücre agregatları: Hücrelerin büyümesi ve çevresel stresin artması biyofilmin içindeki bakterinin kopmasına sebep olabilir. Ayrıca biyofilm oluşumunu düzenleyen açıl homoserin lakton molekülü biyofilminin oluşmasına neden olurken aynı zamanda kopmaya da yol açabilir, bu da dolaşım sisteminde enfeksiyon riskini artırır.

Endotoksin üretimi: Biyofilm üreten gram negatif bakteriler endotoksin üretimini artırarak hastada daha fazla bağışıklık yanıtına neden olabilirler. Oluşan inflamatuvar yanıtın şiddeti enfeksiyonun seyrini etkiler.

Konağın immün yanıtına direnç: Biyofilm üreten bakterilere karşı makrofajın göstermiş olduğu fagositozun ya da antikorların opsonizasyonunun yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Bakterilere direnç aktarımı: Plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu direnç genlerinin farklı türler arasında transfer edilebildiğini göstermiştir (103).

2.10.6. Quorum sensing (çoğunluğu algılama) mekanizmaları

Quorum sensing, 1994 yılında Fuqua ve arkadaşları tarafından tanımlanan hücreler arası iletişimin bir örneğidir. Bu tür hücreden hücreye iletişimin bakteriler arasında gen sunumunun uyumu ve işlevselliğinde temel rolü olduğu bilinmektedir. Bakteri, biyofilm içindeki konsantrasyonu dolaylı yolla izler ve eşik değere ulaştığında hücreyi etkileyecek tarzda davranışlarını düzenler, gen ekspresyonunu değiştirir, enzim ve toksin gibi ihtiyacı olan genlerin transkripsiyonunu sağlar (85).

Quorum sensing, sadece özgür yaşayan bakterilerle ilişkili değil, aynı zamanda yüksek organizmalarla (simbiyozlar veya patojenler) ilişkili olan bakterilerin faaliyetlerini kontrol etmek için de kullanılır. Quorum sensing sisteminde sinyal molekülleri önemli bir görev üstlenir. Bu moleküller gram pozitif bakterilerde küçük peptitler, gram negatif bakterilerde ortama salınan yağ asidi türevi açıl homoserin lakton, hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde otoinducer-2'dir. Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen aminoasit sayısı 5-17 arasında değişen oligopeptitler otoindükleyici peptidler (AIP) olarak ifade edilir (85).

AIP, hücre içinden dışarı doğru yayılmayıp, membranda bulunan "ATP-binding cassette" sistemiyle aktifleşerek salgılanmaktadır. Hücre dışındaki quorum sensing molekülleri iki farklı mekanizma aracılığıyla bakteri hücrelerine etki eder. Birinci mekanizma bu moleküllerin membrana bağlı sensör kinazlara bağlanmasını içerir. Bu bağlanma hücre içinde gen ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici moleküllerin fosforilasyonunu tetikler, bu da hücre içinde transkripsiyonel değişikliklere yol açar.

İkinci mekanizma ise bazı bakterilerde bulunan oligopeptid permeazlar aracılığıyla gerçekleşir. Bu moleküller doğrudan hücre içine girer ve hücre içi reseptörlerle etkileşime geçer (104, 105).

Quorum sensing sistemi bakteriye birçok avantaj sağlar. Bu sistem bakterilerin davranışlarını koordine ederek, çevresel değişikliklere uyum sağlar. Aynı besin kaynakları için rekabet eden diğer bakterilere karşı savaşılabılır. Enfeksiyon sırasında virulans faktörlerinin düzenlenmesi bakterilerin konak organizmadaki bağışıklık yanıtından kaçmalarına yardımcı olur (87).

2.10.7. Biyofilm ve antimikrobiyal direnç

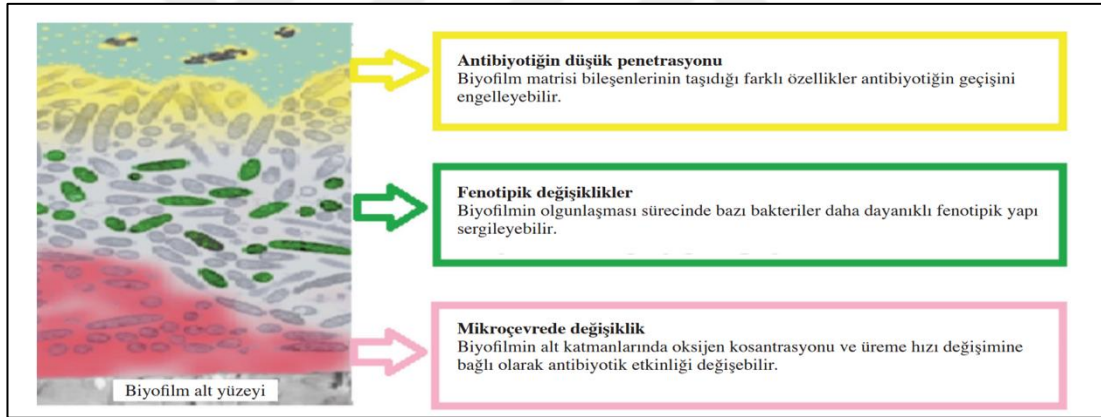
Bakteriyel hastalıklarının tedavisinde sıklıkla karşılaşılan önemli sorunlardan birisi antibiyotik direncidir. Planktonik haldeki bakterilerin antibiyotiklere olan direnci endişe vericiyken biyofilm yapısının neden olduğu direnç enfeksiyonların tedavisini daha da karmaşık hale getirir. Yapılan çalışmalarda biyofilm oluşturan mikroorganizmaların planktonik formlarına göre antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde biyofilm yapısında bulunan bakterilerin planktonik hallerine göre çeşitli antiseptiklere ve endüstriyel biyositlere karşı daha dirençli oldukları bildirilmiştir. Bu biyofilm direncinin altında yatan nedenler olarak dışa atım pompaları, enzimatik inaktivasyon ve ilacın hedefinde gerçekleşen mutasyon gibi bilinen antibiyotik direnç mekanizmaları görülmemektedir. Bunun yerine biyofilmlerin bu dirence sahip olmasının arkasında çoklu mekanizmaların olduğu düşünülmektedir (92, 106, 107). Biyofilm direnç mekanizmalarına ilişkin ileri sürülen farklı tezler Şekil 6'da verilmiştir. Bu mekanizmalar şunları içerir:

- Antimikrobiyal difüzyonu biyofilm matriksinde bulunan polimerik maddelerin zorlaştırdığı bilinmektedir. Bu yüzden antimikrobiyal ajan biyofilme tüm tabakaları boyunca penetrasyon gösteremez. Bu durum antibiyotiklerin yeterli konsantrasyona ulaşamaması anlamına gelmektedir.
- Biyofilme gömülü olan bakterilerin bir kısmı besin eksikliği yaşar ve bu bakterilerin büyüme hızları planktonik bakterilere göre belirgin şekilde düşüktür.

Yavaş büyüyen veya büyüemeyen hücreler birçok antimikrobiyale karşı direnç gösterir ve birçoğu hayatta kalabilmektedir.

- Biyofilm oluşumu için gerekli pH, O₂, CO₂, pirimidin konsantrasyonu gibi mikroçevrel değişkenler biyofilm oluşumunu kolaylaştırırken antimikrobiyallerin etkisini olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca biyofilm içindeki bakteriler arasında direnç genlerinin transferi de mümkündür (108).

Yapılan çalışmalar, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişini engellemekte moleküler filtre mekanizmasının en önemli mekanizma olduğu göstermektedir. Bazı araştırmalarda biyofilmin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmüştür. Ancak buna karşı vankomisinin yüksek dozlarda (500-1000 µg/ml) kullanılması durumunda, biyofilm oluşturan bakterilere karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir (110).

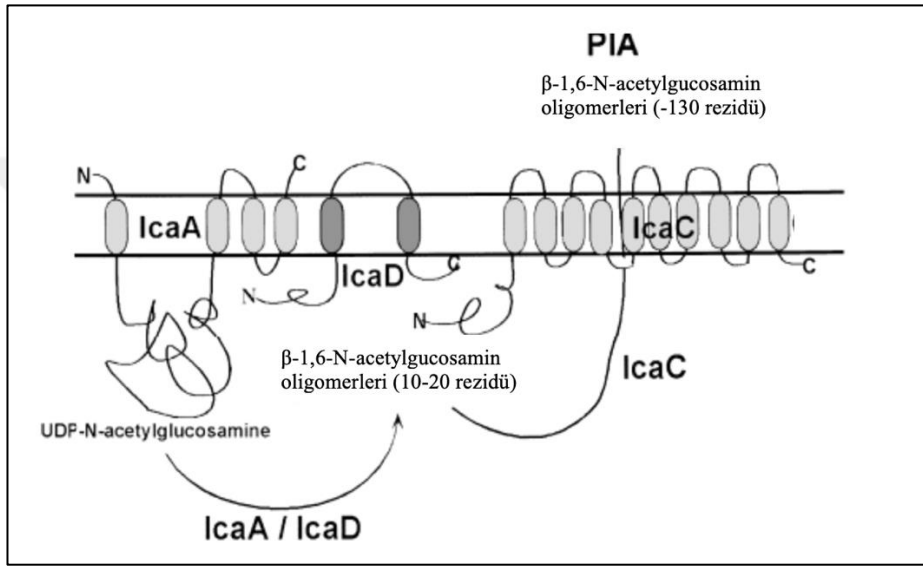


Şekil 6. Biyofilm direnç mekanizmalarına ilişkin ileri sürülen farklı tezler (92)

2.10.8. *S. aureus* ve biyofilm

Stafilokoklar biyofilm oluşturabilmek için öncelikle konak doku ligandları ve katı bir yüzey gibi uygun yüzeylere yapışarak tutunmayı gerçekleştirirler. Bu aşamadan MSCRAMM yüzey proteinleri sorumludur. Bir sonraki aşamada hücreler arası adezyon gerçekleştirilerek çok katmanlı bir biyofilm oluşturulur. *icaADBC* operonu biyofilm oluşumunun hücreler arası adezyonunda görev yapan “polysaccharide intercellular adhesin” (PIA) için “poly- N-acetyl-beta-1-6-glucosamine” (PNAG) oligomerlerini sentezletir (3, 29).

S. aureus'un biyofilm oluşumunda *icaA* ve *icaD* genlerinin yeri önemlidir. Bu genlerin görevi UDP-N-asetil glukoزامini kullanarak çeker oligomerleri sentezletmektir (şekil 7). Tek başına *icaA* geni düşük N-asetilglukoزامin transferaz aktivitesine sahiptir ancak *icaB* geni ile aralarında yerleşen *icaD* geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gözlenir. *icaA* ve *icaD* genleri tarafından sentezlenen oligomerlerin maksimum uzunluğu 20 reziddr. *icaC* bu oligomerleri uzatır. *icaB* deasetilasyon reaksiyonunu katalizler (109, 110).



şekil 7. PIA biyosentezinin modeli (110)

Bakterilerin biyofilm oluşturmasında görevli yapısal bir grup yüzey proteini önemli bulunmuştur. Özellikle mastitli sığırılardan (*S. aureus* V329) izole edilen ‘‘biofilm associated protein’’ (bap), biyofilm oluşumu için gerekli olan önemli yapılardan biri olarak tanımlanmıştır. *bap* genine sahip *S. aureus* suşlarının diğer biyofilm pozitif suşlara göre daha güçlü biyofilm oluşturdukları ifade edilmiştir. *S. aureus*'ta biyofilm oluşumu için önemli olan çeşitli yüzey bileşenleri PIA ve bap, MSCRAMM'lar ile bir arada bulunur ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. Bap, yüksek molekül ağırlıklı, ardışık C-domainleri içeren, bakterilerin güçlü biyofilm oluşturmasını sağlayan 2276 aminoasitlik bir proteindir. Yapılan araştırmalar *bap* geninin hem abiyotik yüzeylere yapışma hem de hücreler arası adezyon aşamalarında görev yaptığını göstermiştir (14).

S. aureus suşlarındaki *bap* geni ile yapılan araştırmalar, genin bulunma sıklığının azlığından dolayı oldukça kısıtlıdır. *bap* geni genellikle kronikleşen sığır mastitlerinde saptanmıştır (111).

2.10.9. Biyofilm saptama yöntemleri

Biyofilm oluşumunu belirlemek, biyofilm direncinin mekanizmalarını anlamak ve yeni tedavi seçenekleri geliştirmek için oldukça önemlidir. Bu amaçla farklı in vitro ve in vivo yöntemler kullanılmaktadır. Kongo kırmızılı agar (congo red agar, CRA) yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi) ve mikropalak yöntemi biyofilm oluşumunu tespit etmek için sıkça kullanılan yöntemlerden bazılarıdır. Ayrıca kuru ağırlık ve metabolik aktiviteye dayalı bazı nicel yöntemlerle birlikte floresan mikroskopi, konfokal lazer tarama mikroskopi ve elektron mikroskopisi gibi görüntüleme yöntemleri de mevcuttur (92).

CRA yöntemi, bakterilerin uygun bir besiyerine ekilmesi, 37°C’de 24 saat inkübasyon sonrası oluşan renk değişikliğinin gözlenmesi yoluyla biyofilm üretimini belirlemek için kullanılır. Besiyeri içerisinde sükröz, beyin kalp infüzyon buyyonu, kongo kırmızısı ve agar bulunur. Siyah veya koyu kırmızı renkli koloni oluşumu biyofilm üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilir (112, 113).

Standart cam tüp yönteminde, bakterilerin TSB besiyeri içeren tüplere ekiminden sonra tüpler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Ardından tüp içeriği aspire edilip metilen mavisi eklenir. Ardından tüp içeriği tekrar aspire edilir ve iç yüzeyinde boyalı bir tabaka oluşumu biyofilm üretimi açısından pozitif bir işarettir (114).

Modifiye tüp aderans yönteminde (Christensen yöntemi), glikozlu TSB besiyeri içeren cam tüplere bakterinin ekimi yapılır ve 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası tüp içeriği aspire edilir ve fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır ve sonra boyar madde eklenerek karıştırılır. Boyar madde olarak kristal viyole, trypan blue veya safranin kullanılabilir. Bir süre sonra boya aspire edilir ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek kurumaya bırakılır. Tüplerin iç yüzeyinde renkli tabaka varlığı pozitif, renk değişiminin olmaması ise negatif olarak kabul edilir (115).

Mikroplakların kullanıldığı yöntemler, çeşitli modifikasyonlarla sık tercih edilen yöntemlerdendir. Özellikle spektrofotometrik mikropalak yöntemi diğer yöntemlere göre daha hassas, duyarlı ve niceliksel sonuçlar elde edilebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde genellikle 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanılır. Bakteri süspansiyonu, %1-3 glukozlu beyin-kalp infüzyon buyyon veya TSB içeren mikropalak kuyucuklarına ekilir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikropalakların içeriği boşaltılır. Boşaltılan kuyucuklara yıkama işleminden sonra boya maddesi eklenir. Boyama amacıyla safranin, trypan blue veya kristal viyole kullanılabilir. Boyanın biyofilm içine nüfuz etmesi için bir süre beklenir ve ardından kuyucuklar tekrar boşaltılır ve yıkama işlemi yapılır. Bu aşamada kristal viyole biyofilm içindeki bakteri hücrelerini boyar ve biyofilm yapısına katılmamış hücreler ve maddeler yıkama ile uzaklaştırılır. Yıkama sonrası mikropalaklar oda ısısında kurumaya bırakılır. Daha sonra mikropalaklar etanol, asetik asit veya aseton gibi kimyasal ajanlarla işlenir ve belirli dalga boyunda, her bir kuyucuk için spektrofotometrik ölçüm yapan mikropalak okuyucu cihazda optik dansite (OD) değerleri belirlenir. Bu değerler kontrol kuyucuklarının ortalama OD değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi tespit edilebilir (92).

Gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi kolay uygulanabilen, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak dikkat çeker. Bu yöntemde özel olarak kaplanmış altın mikroelettrotlarla sahip mikropalaklar kullanılır. Hücreler yüzeye yapıştıkça elektrik akımına karşı direnç olarak adlandırılan impedans değişir ve bu değişim hücre sayısı ve biyofilm oluşumuyla orantılıdır (116).

Benzer bir mantıkla çalışan fiber-optik yöntem biyofilm gelişimini yine gerçek zamanlı izlemeye olanak tanır. Bu yöntem, fiber-optik çekirdeği üzerinde gelişen biyofilm tabakasının, kızılötesi ışınların penetrasyonunu azaltması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle biyofilm inhibitörlerinin etkisi de değerlendirilebilmektedir. Biyofilm oluşumunu belirlemede ekstraselüler matriks komponentlerinden yararlanan bir yaklaşım daha vardır. Bu yaklaşımda “luminisan konjuge oligotiyofen” molekülleri belirli ekstraselüler bileşenlere özgü olarak bağlanır ve hücrelere zarar vermeden biyofilm oluşumunu gözlemlemeyi mümkün kılar (92).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) biyofilm araştırmalarında geniş kullanım alanına sahip bir görüntüleme metotudur. Oluşturulan biyofilm yapısı gluteraldehit ve etil alkolle muamele edildikten sonra taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme sağlanır. Numunelerin hazırlık süreci zaman alsa da yüksek çözünürlükte görüntü elde edebilme özelliğine sahiptir (100).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasına ait etik kurul onayı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.10.2022 tarihli 2022/466 karar nolu mikrobiyoloji çalışması olarak verilmiştir. Etik kurul onayı EK-1’de sunulmuştur.

Bu çalışmada Nisan 2020- Aralık 2022 tarihlerinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı’na gönderilen klinik örneklerden izole edilen 130 MRSA izolatı kullanılmıştır. Tekrarlayan üremeleri olan hastalarda ilk saptanan izolat alınmak üzere her hastadan tek bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların 10’u (%7,69) polikliniklere ayaktan başvuran hasta örneklerinden, 120’si (%92,30) ise yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir.

3.1. Bakterilerin Tanımlanması

Laboratuvara gelen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar (KKA) ve eozin metilen blue (EMB) agara ekilip 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Saf koloni şeklinde üreme gözlenen plaklarda koloni morfolojisi gram pozitif bakteri üremesiyle uyumlu olanlara gram boyama ve basit biyokimyasal testler yapıp; gram pozitif, kok morfolojisinde, katalaz pozitif, koagülaz pozitif saptanan bakteriler *S. aureus* şüphesiyle ileri identifikasyon testlerine alındı. Bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması VITEK® MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile belirlendi.

3.2. Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesi

Çalışmaya alınan izolatların metisiline ve diğer antimikrobiyallere karşı direnci ilk olarak Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile belirlendi. Metisilin direnci sefoksitin diskiyle (30 µg), Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak doğrulandı. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (117) önerilerine göre inhibisyon zon çapı <22 mm olan izolatlar MRSA, ≥22 mm olan izolatlar MSSA olarak kabul edildi.

3.3. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm aktiviteleri mikrotitrasyon plağı yöntemiyle belirlendi. *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturabilme yeteneklerini değerlendirebilmek için izolatlar ilk olarak KKA besiyerine tek koloniler halinde pasajlandı ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda saf olan kültürler, %0,25 glukozlu Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife, İtalya) besiyeri içeren tüplere inoküle edildi ve 37°C’de 24 saat boyunca inkübasyona alındı. Sonrasında izolatlar %0,25 glukozlu TSB besiyeri ile 1/20 oranında seyreltildi ve 200 µl’si düz tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı içerisinde 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Her izolat 3 farklı kuyucukta çalışıldı. İnkübasyon süresi sonlandığında kuyucuklardaki besiyerleri boşaltıldı ve kuyucuklar distile su ile 3 kez yıkanarak planktonik hücreler kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Ardından mikrotitrasyon plağı kurutma kağıdının üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Kuyucuklara %1’lik kristal viyole 100’er µl dağıtılarak biyofilm oluşumunu boyamak için 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. İşlem sonrasında kuyucuklar tekrar distile su ile 3 kez yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdında kurutuldu. Kuyucuklara son işlem olarak 200 µl etanol/aseton (80:20) solüsyonu ilave edilip, 10 dakika bekletilip boya çözdürüldü. Plaklar 492 nm dalga boyunda ELISA reader optik okuyucuda (Chromate Awareness Technology, ABD) okutuldu. Çalışmada her plakta pozitif kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923, negatif kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Elde edilen optik dansite (OD) değerleri Chrestensen ve ark.; Chusri ve ark.’nın çalışmalarında kullandıkları biyofilm oluşum aktivitelerinin değerlendirme ölçeği ile değerlendirildi (115, 118). Biyofilm oluşum aktivitelerinin değerlendirme ölçeği Tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2. Biyofilm oluşum aktivitelerinin değerlendirmesi

Optik Dansite	Yapışma	Skor
KOD > MBOD	Yapışma olmayan	0
KOD < MBOD < 2KOD	Zayıf yapışma	1
2KOD < MBOD < 4KOD	Orta derece yapışma	2
4KOD < MBOD	Güçlü derece yapışma	3
KOD: Kontrol Optik Dansitesi, MBOD: Mikroorganizma Biyofilmi Optik Dansitesi		

3.4. Vankomisin ve Teikoplanin Duyarlılığının Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen antibiyotikler; vankomisin (Cayman Chemical Company, ABD) ve teikoplanin (Sigma-Aldrich, ABD) uygun çözücüler kullanılarak çözüldü ve çözeltiler 4096 µg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılacağı zamana kadar -20°C’de saklandı. Mikrodilüsyon yöntemi için steril 96 kuyucuklu U tabanlı plaklar tercih edildi. Her iki antibiyotik için farklı plaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl katyon ayarlı Mueller-Hinton Broth (KAMHB) (Condalab, İspanya) eklendi. Sonrasında 4096 µg/ml’lik antibiyotik stoğu KAMHB ile 1/128 oranında dilüe edilerek konsantrasyon 32 µg/ml’ye düşürüldü ve ilk kuyucuklara 100 µl eklendi. Ardından 10. kuyucuğa kadar olan kuyucuklarda seri dilüsyonlar yapılarak son konsantrasyonlar oluşturuldu, 11. kuyucuk pozitif kontrol, 12. kuyucuk ise negatif kontrol olarak kullanıldı. KKA besiyerinde üretilen izolatlar, 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar halinde hazırlandı ve sonrasında KAMHB ile 1/10 oranında seyreltildi. Negatif kontrol kuyucuğu dışındaki tüm kuyucuklara 5 µl eklendi. Plaklar 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edildi (119). İzolatların tamamı için vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri çalışıldı. Sonuçlar EUCAST standartlarına göre değerlendirildi ve kaydedildi. Vankomisin ve teikoplanin için >2 µg/ml dirençli, ≤ 2 µg/ml duyarlı olarak kabul edildi (117).

3.5. Vankomisin ve Teikoplaninin Oluşmuş Biyofilm Tabakasına Etkisinin Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu (BİK) ile Belirlenmesi

Güçlü derecede (skor:3) biyofilm oluşumu tespit edilen 30 izolat üzerinde antibiyofilm aktivitesi test edildi. Bu izolatlar KKA besiyerine pasajlandı. Sonrasında %0,25 glukoz içeren TSB besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İşlem sonrası kültürler %0,25 glukozlu TSB besiyeri ile 1/20 oranında seyreltilerek 200’er µl 96 kuyucuklu mikropalakların her satırına bir izolat olacak şekilde eklendi. Plaklardaki kuyucukların içine steril cam boncuklar konuldu ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Başka mikropalaklarda taze hazırlanan KAMHB içinde vankomisin ve teikoplaninin ayrı ayrı 4096 µg/ml konsantrasyondan başlatılarak seri

dilüsyonu yapıldı. Biyofilm oluşturan cam boncuklar antibiyotik seyreltme işlemi yapılmış mikropalakların ilgili kuyucuklarına yerleştirildikten sonra 24 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki cam boncuklar 200 µl KAMHB içeren ependorf tüplere aktarıldı ve 5 dk vortekslendi. Sonrasında tüplerden 100 µl alındı ve içinde 100’er µl KAMHB bulunan yeni bir plaktaki kuyucuklara aktarılıp 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon biyofilm inhibitör konsantrasyon (BİK) olarak değerlendirildi. Mikropalakların 12. kuyucuğuna ekim yapılmadan TSB eklenerek kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı (120).

3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Biyofilm üretmeyen 112 numaralı izolat ile biyofilm üreticisi olan 118 numaralı izolat, elektron mikroskobu ile görüntülenebilmesi için seçildi. İzolatlar KKA besiyerine pasajlandı ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında oluşan saf koloniler %0,25 glukozlu TSB besiyerine aktarıldı ve 37°C’ de 24 saat inkübe edildi. İşlemden sonra izolatlar %0,25 glukozlu TSB ile 1/20 oranında seyreltildi. Elde edilen inokülasyonlardan 2 ml’lik örnekler, 12 kuyucuklu plağa dağıtıldı ve bu plağa daha önce otoklavlanmış ve steril hale getirilmiş lamel parçaları yerleştirildi. Ardından 37°C’ de 24 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklardaki besiyeri aspire edilip lameller yıkandı. Başka bir plağa biyofilm oluşturmuş olan lameller aktarıldı. Yeni plaktaki kuyucuklara 1 ml %4 gluteraldehit eklenip, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Beklemenin sonunda gluteraldehit boşaltıldı ve sırayla kuyucuklara; %70, %80, %90, %96 ve saf olacak şekilde 1’er ml etil alkol (Isolab, Almanya) eklendi. Her basamak için oda ısısında 10 dakika beklendi. En sonunda saf alkol aspire edilip plak karanlık bir ortamda kurumaya bırakıldı.

SEM görüntüleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde elde edildi. Lamel parçaları kaplama cihazında altın/pal (Au/Pd) ile kaplandı. Taramalı elektron mikroskobunda (JEOL, ABD) 1000, 3000, 5000 ve 10000’lik büyötmelerde görüntüldü.

3.7. Virulans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi

3.7.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile yapıldı. İlk olarak bakteriler koyun kanlı agara pasajlanıp 37°C’ de bir gece inkübe edildi. Elde edilen saf kolonilerden 500 µl distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine bir öze dolusu aktarıldı. Tüpler vortekslenerek homojenize edildi. Sonrasında tüpler 100°C’de 15 dakika süre ile kuru ısı bloğuna yerleştirildi. Ardından santrifüj cihazına yerleştirilerek 4°C ve 15000 x g’de 20 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant DNA, çökeltiye dokunmadan pipetle alındı ve kullanılacağı zamana kadar -20°C’de saklamaya alındı.

3.7.2. DNA amplifikasyonu

Virulans genlerinin tespiti için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Otomatik termal döngüleyicide (Eppendorf, Hamburg, Almanya) *mecA*, *pvl*, *icaA*, *icaD* ve *bap* için unipleks PZR işlemleri gerçekleştirildi. Virulans genlerine ait spesifik primer dizileri Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. *mecA*, *pvl*, *icaA*, *icaD*, *bap* genlerine ait spesifik primer dizileri (3, 44, 121, 122)

Hedef gen	Primer sekansı (5’-3’)	Amplikon büyüklüğü
<i>mecA</i> forward <i>mecA</i> reverse	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310 bp
<i>lukS/F-PV</i> forward <i>lukS/F-PV</i> reverse	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCCA GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433 bp
<i>icaA</i> forward <i>icaA</i> reverse	CCTAACTAACGAAAGGTAG AAGA T A T AGCGA T AAGTGC	1315 bp
<i>icaD</i> forward <i>icaD</i> reverse	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATAT GATCAAGATAC	381 bp
<i>bap</i> forward <i>bap</i> reverse	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971 bp

mecA geni için *S. aureus* ATCC 43300 standart suşu, *pvl* geni için ise *S. aureus* ATCC 49775 standart suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. İzolatların *mecA* ve *pvl* gen bölgelerinin araştırılması için McClure ve ark. (122) ile Lina ve ark.'nın (44) kullandıkları yöntemler modifiye edilerek unipleks PZR yöntemi uygulandı. *mecA* ve *pvl* için PZR karışımları Tablo 4 ve Tablo 5'te verildi. Amplifikasyon programları ise Tablo 6'da verildi.

Tablo 4. *mecA* PZR karışımı

İçerik	Miktar
10X taq buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
2 mM dNTP mix	2,5 µl
2 pmol <i>mecA</i> -F	3 µl
2 pmol <i>mecA</i> -R	3 µl
5 U/ µl taq DNA polimeraz	0,2 µl
Kalıp DNA	5 µl
Saf su	5,8 µl
Toplam	25 µl

Tablo 5. *pvl* PZR karışımı

İçerik	Miktar
10X taq buffer	4 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
2 mM dNTP mix	3 µl
10 pmol <i>Luk-PV</i> -F	2 µl
10 pmol <i>Luk-PV</i> -R	2 µl
5 U/ µl taq DNA polimeraz	0,3 µl
Kalıp DNA	5 µl
Saf su	19,7 µl
Toplam	40 µl

Tablo 6. *mecA* ve *pvl* PZR amplifikasyon programı

<i>mecA</i>	İlk denatürasyon	94°C	10 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94°C	45 saniye	30 döngü
	Bağlanma	55°C	45 saniye	
	Uzama	72°C	75 saniye	
	Son uzama	72°C	10 dakika	1 döngü
<i>pvl</i>	İlk denatürasyon	94°C	5 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94°C	30 saniye	30 döngü
	Bağlanma	55°C	30 saniye	
	Uzama	72°C	60 saniye	
	Son uzama	72°C	7 dakika	1 döngü

icaA ve *icaD* genleri için *S. epidermidis* ATCC 35984 standart suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı; *bap* geni için ise pozitif kontrol olarak kullanılacak standart suş temin edilemedi. İzolatların *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin araştırılması Vasudevan ve ark. (121) kullandığı yöntem modifiye edilerek, *bap* gen bölgesinin araştırılması Vancraeynest ve ark. (3) kullandığı yöntem modifiye edilerek her üç gen bölgesi için unipleks PZR yöntemi uygulandı. *icaA*, *icaD* ve *bap* genleri için PZR karışımları Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9’da verildi. Amplifikasyon programları ise Tablo 10’da verildi.

Tablo 7. *icaA* PZR karışımı

İçerik	Miktar
10X taq buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
10 nmol <i>icaA</i> F	1 µl
10 nmol <i>icaA</i> R	1 µl
5 U/ µl taq DNA polimeraz	0,25 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	13,25 µl
Toplam	25 µl

Tablo 8. *icaD* PZR karışımı

İçerik	Miktar
10X taq buffer	6 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
10 mM dNTP mix	2,5 µl
10 nmol <i>icaD</i> F	1 µl
10 nmol <i>icaD</i> R	1 µl
5 U/ µl Taq DNA polimeraz	1 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	9,5 µl
Toplam	27 µl

Tablo 9. *bap* PZR karışımı

İçerik	Miktar
10X taq buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
10 pmol <i>bap</i> F	1 µl
10 pmol <i>bap</i> R	1 µl
1.25 U/ µl Taq DNA polimeraz	0,5 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf su	13 µl
Toplam	25 µl

3.7.3. Elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile görüntülenmesi

Konsantrasyonu %2 olan Trisma-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu içinde %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Eritilen jel yatay elektroforez kabına döküldü ve 30 dk soğuması için beklendi. Amplifikasyon ürünü (10 µl), 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Molekül boyutlarına göre DNA bantlarının ayrıştırılması için 120 V, 60 dk süresince yüklenen ürünler elektroforezde yürütüldü. Sonrasında jel 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dk boyunca boyandı. DNA bantları boyamanın ardından GeneRuler 100 bp DNA ladder

plus belirteçleri ile kıyaslanarak Gel Doc XR (Bio-Rad, ABD) cihazı ile görüntülendi. Bu görüntüler Quantity One (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile kaydedildi.

Tablo 10. *icaA*, *icaD* ve *bap* PZR amplifikasyon programı

<i>icaA</i>	İlk denatürasyon	95°C	3 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	95°C	30 saniye	40 döngü
	Bağlanma	50 °C	30 saniye	
	Uzama	72°C	90 saniye	
	Son uzama	72°C	15 dakika	1 döngü
<i>icaD</i>	İlk denatürasyon	92°C	3 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	92°C	45 saniye	30 döngü
	Bağlanma	49°C	45 saniye	
	Uzama	72°C	60 saniye	
	Son uzama	72°C	7 dakika	1 döngü
<i>bap</i>	İlk denatürasyon	94°C	30 saniye	1 döngü
	Denatürasyon	94°C	45 saniye	30 döngü
	Bağlanma	62°C	60 saniye	
	Uzama	72°C	60 saniye	
	Son uzama	72°C	7 dakika	1 döngü

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS V 21 kullanıldı. Bulguların istatistiksel analizine ki-kare (Chi-square) ve korelasyon (Spearman's rho) testleri ile bakıldı. Testler için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *S. aureus* İzolatlarının Özellikleri

Çalışmamızda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2020-Aralık 2022 tarihlerinde gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 130 MRSA izolatı kullanıldı. İzolatların 40'ı (%30,76) kan, 40'ı kateter kanı (%30,76), 50'si (%38,48) eksüda örneği idi. İzolatlar en sık dahili kliniklerden (%65,38) gönderilen örneklerden elde edildi. Laboratuvarımıza gönderilen materyallerden izole ettiğimiz *S. aureus* izolatlarının örnek türü ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 11'de verildi.

Tablo 11. *S. aureus* izolatlarının örnek türü ve kliniklere göre dağılımı

Örnek Türü	Yoğun Bakım n (%)	Dahili Klinikler n (%)	Cerrahi Klinikler n (%)	Toplam
Kan	7 (17,5)	31 (77,5)	2 (5)	40
Kateter Kanı	8 (20)	31 (77,5)	1 (2,5)	40
Eksüda	2 (4)	23 (46)	25 (50)	50
Toplam	17	85	28	130

4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri

Çalışmaya dahil edilen 130 *S. aureus* izolatı metisiline dirençli suşlardan seçildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST uluslararası standartlarına göre değerlendirildi (117). Antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 12'de verildi.

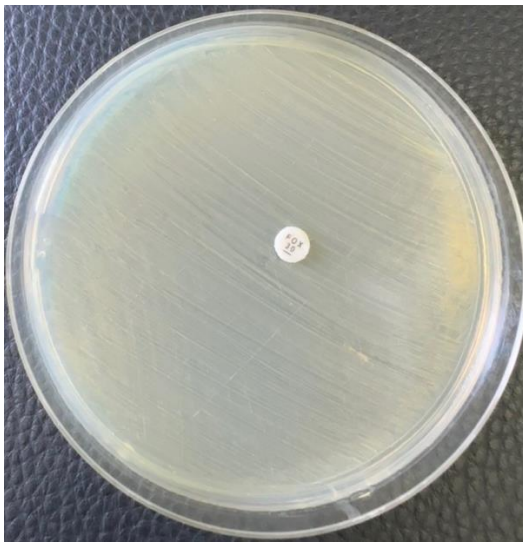
Tüm izolatlar penisiline dirençli vankomisin, teikoplanin ve linezolidde duyarlı olarak belirlendi. Diğer antibiyotikler yönünden değerlendirildiğinde izolatların en duyarlı olduğu antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazol iken, en dirençli olduğu antibiyotik tetrasiklin olarak saptandı.

Tablo 12. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Antibiyotikler	Duyarlı n (%)	Duyarlı, yüksek dozda n (%)	Dirençli n (%)
Penisilin	0	0	130 (100)
Oksasilin	0	0	130 (100)
Siprofloksasin	43 (33,07)	58 (44,61)	29 (22,30)
Gentamisin	68 (52,30)	0	0
Vankomisin	130 (100)	0	0
Teikoplanin	130 (100)	0	0
Eritromisin	88 (67,69)	0	42 (32,30)
Klindamisin	88 (67,69)	0	42 (32,30)
Tetrasiklin	84 (64,61)	0	46 (35,38)
Linezolid	130 (100)	0	0
Trimetoprim- sülfametoksazol	124 (95,38)	0	6 (4,61)

4.3. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

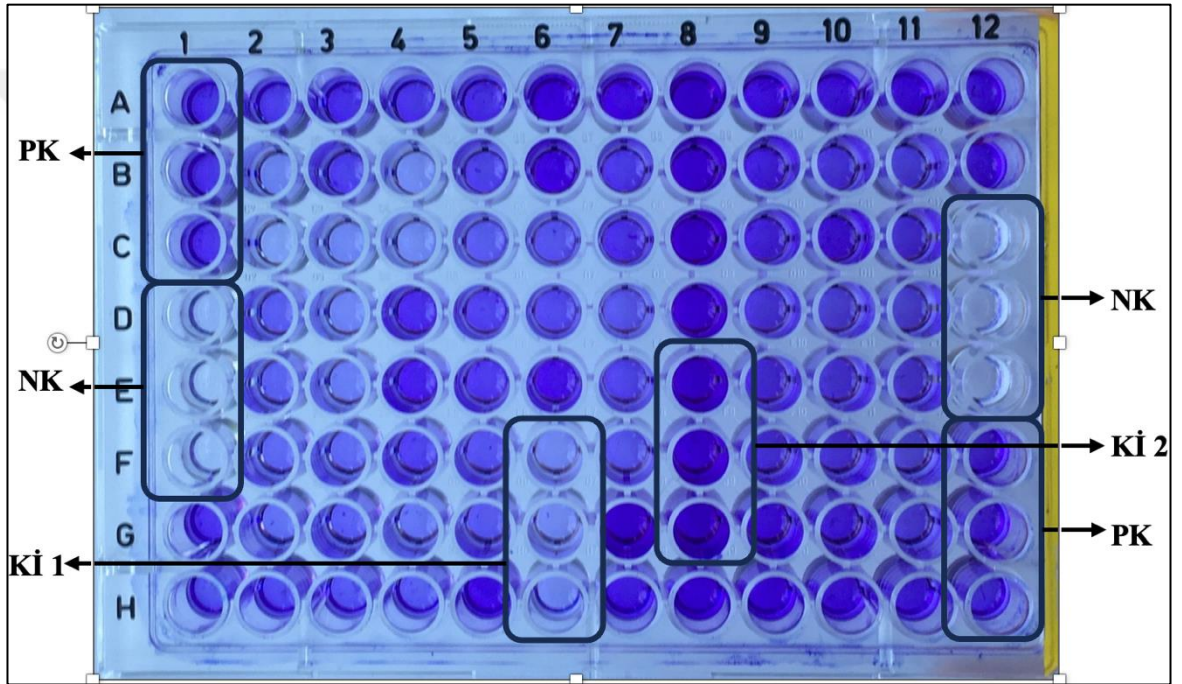
Sefoksitin duyarlılığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen disk difüzyon testi sonuçlarına göre, tüm izolatlar sefoksitine dirençli olarak bulundu. İzolatlardan birine ait disk difüzyon test sonucu Şekil 8’de gösterildi.



Şekil 8. Disk difüzyon testi ile sefoksitin duyarlılığının belirlenmesi

4.4. Biyofilm Üretimi

Çalışmamızda kullanılan izolatların biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plağı yöntemiyle incelendi. Bu yöntemle 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından kristal viyole ile boyama sonrası OD’ler belirlenerek tüm izolatların biyofilm aktiviteleri değerlendirildi. Çalışılan 130 *S. aureus* izolatının 81’inin (%62,30) biyofilm oluşturduğu görüldü. İzolatların 28’si (%21,53) zayıf derecede, 23’ü (%17,69) orta derecede, 30’u (%23,07) ise güçlü derecede biyofilm oluşturdu. Biyofilm oluşumunun araştırıldığı bir mikrotitrasyon plağı görüntüsü Şekil 9’da verildi.



Şekil 9. Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon yöntemiyle değerlendirilmesi

(NK: Negatif kontrol (*S. aureus* ATCC 29213), PK: Pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), Kİ 1: Klinik İzolat 1 (biyofilm oluşumu yok), Kİ 2: Klinik izolat 2 (güçlü derecede biyofilm oluşumu))

Biyofilm oluşturan örneklerin izole edildiği örnek türü dikkate alındığında kan kültürü örneklerinden 25’i (%62,5) biyofilm oluşumu gösterirken, 9’unda (%22,5) güçlü derecede biyofilm oluşumu görüldü. Kateterden kan kültürü örneklerinden 15’i (%37,5) biyofilm oluştururken, 10’unda (%25) güçlü biyofilm oluşumu görüldü. Eksüda kültürü örneklerinden ise 41’i (%82) biyofilm oluştururken, 11’inde (%22) güçlü biyofilm oluşumu görüldü.

Biyofilm üretimi tespit edilen 81 izolat için penisilin ve oksasiline direnç oranı %100'dü. Vankomisin, teikoplanin ve linezolide dirençli izolat bulunmadı. Diğer antibiyotikler için biyofilm oluşturma özelliklerine göre antibiyotik direnç oranları Tablo 13'te verildi.

Tablo 13. Biyofilm oluşturma özelliklerine göre antibiyotik direnç oranları

Antibiyotikler	Biyofilm Oluşturan Suşlar (n=81) (n/%)	Biyofilm Oluşturmayan Suşlar (n=49) (n/%)	P
Eritromisin	37 (45,67)	5 (10,2)	$p<0,05$
Klindamisin	37 (45,67)	5 (10,2)	$p<0,05$
Tetrasiklin	43 (53,08)	3 (6,12)	$p<0,05$
Siprofloksasin	23 (28,39)	6 (12,24)	$p<0,05$
Trimetoprim-sülfametoksazol	4 (4,93)	2 (4,08)	$p>0,05$

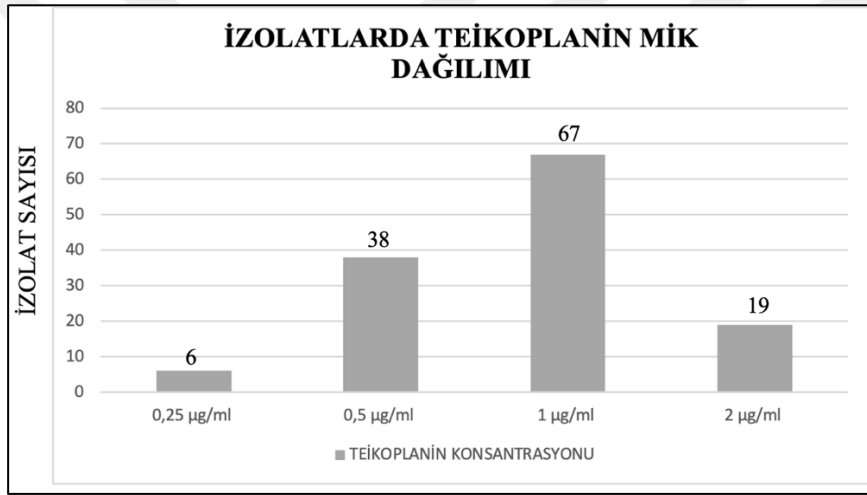
4.5. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Çalışmaya alınan 130 MRSA klinik izolatına vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri için sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK çalışıldı. MİK değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda, ≤ 2 µg/ml “duyarlı” olacak şekilde değerlendirildi (117). Çalışmadaki tüm izolatlar vankomisine 0,5-2 µg/ml, teikoplanine 0,25-2 µg/ml MİK aralıklarında duyarlı bulundu. Vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri için MİK dağılımları Şekil 10 ve Şekil 11’de gösterilmektedir.

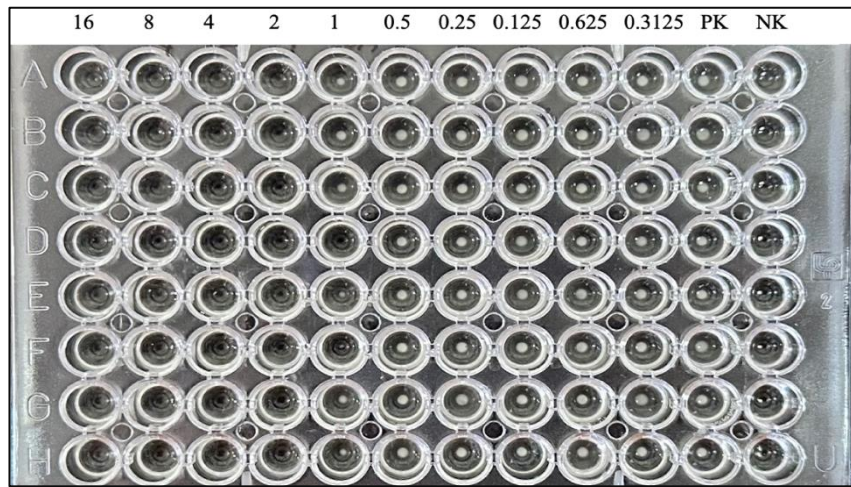
S. aureus izolatlarının %50’sini inhibe eden en düşük MİK konsantrasyonu MİK₅₀, %90’ını inhibe eden en düşük MİK konsantrasyonu ise MİK₉₀ olarak tanımlandı. Çalışmamızda *S. aureus* izolatlarının vankomisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak bulundu. Teikoplanin için MİK₅₀ değeri 1 µg/ml iken MİK₉₀ değeri 2 µg/ml olarak bulundu. MİK tespitinin araştırıldığı bir mikroplağın görüntüsü Şekil 12’de verildi.



Şekil 10. *S. aureus* izolatlarının vankomisin MİK dağılımları



Şekil 11. *S. aureus* izolatlarının teikoplanin MİK dağılımları



Şekil 12. Mikroplakta MİK tespiti

Şekilde 8 izolat için 1. sütundan 10. sütuna kadar azalan dilüsyonlarda 16-0,3125 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu bulunmaktadır. 11. sütun pozitif kontrol, 12. sütun ise negatif kontrol olarak tasarlandı.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen vankomisin ve teikoplanin duyarlılık sonuçları ile izolatların biyofilm oluşturma dereceleri Tablo 14'te verildi.

Tablo 14. *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
1	2	1	2
2	2	1	2
3	2	1	1
4	3	1	0,5
5	3	1	0,5
6	0	1	1
7	3	0,5	0,5
8	2	1	0,5
9	0	1	2
10	0	1	1
11	0	1	2
12	1	2	2
13	1	1	1

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
14	0	1	1
15	1	1	1
16	0	2	1
17	0	1	1
18	0	1	1
19	0	1	1
20	0	1	1
21	3	1	0,5
22	2	1	0,5
23	0	1	1
24	0	1	1
25	3	1	0,5
26	0	1	1
27	0	1	1
28	3	0,5	1
29	1	1	1
30	1	2	1

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
31	1	1	1
32	1	2	1
33	3	1	1
34	1	1	1
35	1	2	2
36	3	0,5	0,5
37	2	1	1
38	0	1	1
39	2	1	2
40	3	1	1
41	0	1	1
42	0	2	1
43	3	1	1
44	0	1	1
45	3	1	1
46	0	1	2
47	0	1	2

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
48	3	1	1
49	0	1	1
50	0	1	2
51	3	1	1
52	3	1	1
53	3	1	1
54	0	2	1
55	0	2	2
56	0	2	2
57	3	1	1
58	0	2	2
59	0	1	1
60	0	2	1
61	1	1	2
62	0	1	1
63	1	1	0,5
64	0	1	1

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
65	0	1	1
66	0	1	1
67	3	1	1
68	3	1	1
69	2	1	1
70	3	1	1
71	1	1	1
72	0	1	1
73	0	1	1
74	1	1	0,5
75	0	1	0,25
76	0	1	0,5
77	0	1	0,5
78	0	1	1
79	0	1	1
80	0	1	0,5
81	3	1	2

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
82	0	1	0,5
83	1	1	1
84	2	1	1
85	0	1	1
86	2	1	1
87	1	1	1
88	1	0,5	0,5
89	1	1	1
90	1	1	0,5
91	0	1	0,5
92	2	1	0,5
93	2	1	1
94	2	1	0,5
95	1	1	1
96	1	1	0,5
97	0	1	1
98	2	1	0,5

Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
99	2	1	0,5
100	2	1	0,5
101	2	1	0,25
102	0	1	0,5
103	3	1	1
104	2	1	0,5
105	1	1	0,5
106	3	0,5	2
107	2	0,5	0,25
108	3	1	1
109	1	1	0,5
110	1	1	0,25
111	3	1	1
112	0	1	0,5
113	2	1	0,25
114	2	1	0,5
115	2	1	2

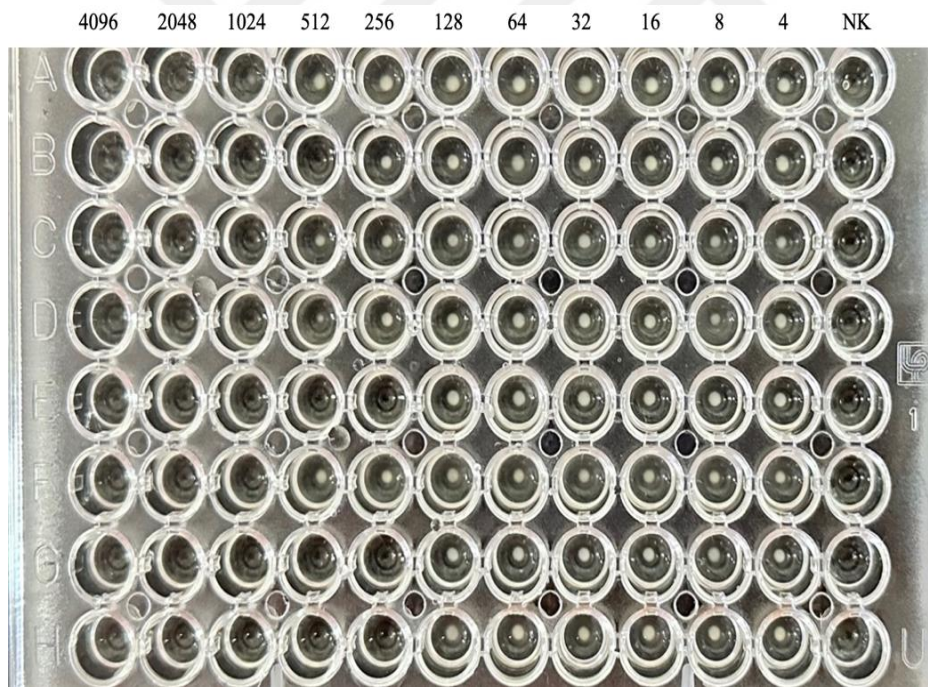
Tablo 14 (Devamı). *S. aureus* izolatlarının sıvı mikrodilüsyon MİK sonuçları ve biyofilm dereceleri

İzolat Numarası	Biyofilm Skoru	Sıvı Mikrodilüsyon	
		Vankomisin	Teikoplanin
116	2	1	0,5
117	3	1	0,5
118	3	1	2
119	3	1	0,5
120	1	1	0,5
121	1	1	0,5
122	3	1	1
123	1	1	0,5
124	1	1	0,5
125	0	1	2
126	3	0,5	1
127	0	1	0,25
128	1	1	0,5
129	0	1	0,5
130	3	1	1

Çalışmamızda vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerinin MİK değerleri ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki izolatlarımız arasında vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı dirençli izolat bulunmadığı ve tüm izolatlar duyarlı olarak tespit edildiği için istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

4.6. Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon (BİK) Sonuçları

Mikrotitrasyon yöntemiyle biyofilm oluşumu belirlenen izolatlardan güçlü biyofilm (skor:3) oluşturan 30 izolat dahil edildi. Biyofilm oluşumunun antimikrobiyal duyarlılığa etkisi bir gece önceden biyofilm oluşturmuş 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı içindeki steril boncukların üzerine değişen konsantrasyonlarda antibiyotik eklenerek üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon olan BİK değerleri saptandı. BİK değerinin araştırıldığı bir mikroplağın görüntüsü Şekil 13'te verildi. İzolatların MİK ve BİK değerlerinin karşılaştırması Tablo 15 ve 16'da verildi.



Şekil 13. Mikroplakta BİK tespiti

Şekilde 8 izolat için 1. sütundan 11. sütuna kadar azalan dilüsyonlarda 4096-4 µg/ml antibiyotik konsantrasyonu bulunmaktadır. 12.sütun negatif kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 15. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların vankomisin MİK ve BİK değerleri

İzolat no	4	5	7	21	25
MİK	1	1	0.5	1	1
BİK	512	512	128	64	1024
İzolat no	28	33	36	40	43
MİK	0.5	1	0.5	1	1
BİK	64	256	2048	512	512
İzolat no	45	48	51	52	53
MİK	1	1	1	1	1
BİK	64	256	256	256	256
İzolat no	57	67	68	70	81
MİK	1	1	1	1	1
BİK	128	512	4096	512	256
İzolat no	103	106	108	111	117
MİK	1	0.5	1	1	1
BİK	256	128	128	128	256
İzolat no	118	119	122	126	130
MİK	1	1	1	0.5	1
BİK	512	512	512	512	256

Tablo 16. Güçlü biyofilm oluşturan izolatların teikoplanin MİK ve BİK değerleri

İzolat no	4	5	7	21	25
MİK	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BİK	1024	1024	64	64	1024
İzolat no	28	33	36	40	43
MİK	1	1	0.5	1	1
BİK	128	512	2048	256	256
İzolat no	45	48	51	52	53
MİK	1	1	1	2	1
BİK	64	32	512	512	128
İzolat no	57	67	68	70	81
MİK	1	1	1	1	2
BİK	256	256	4096	256	64

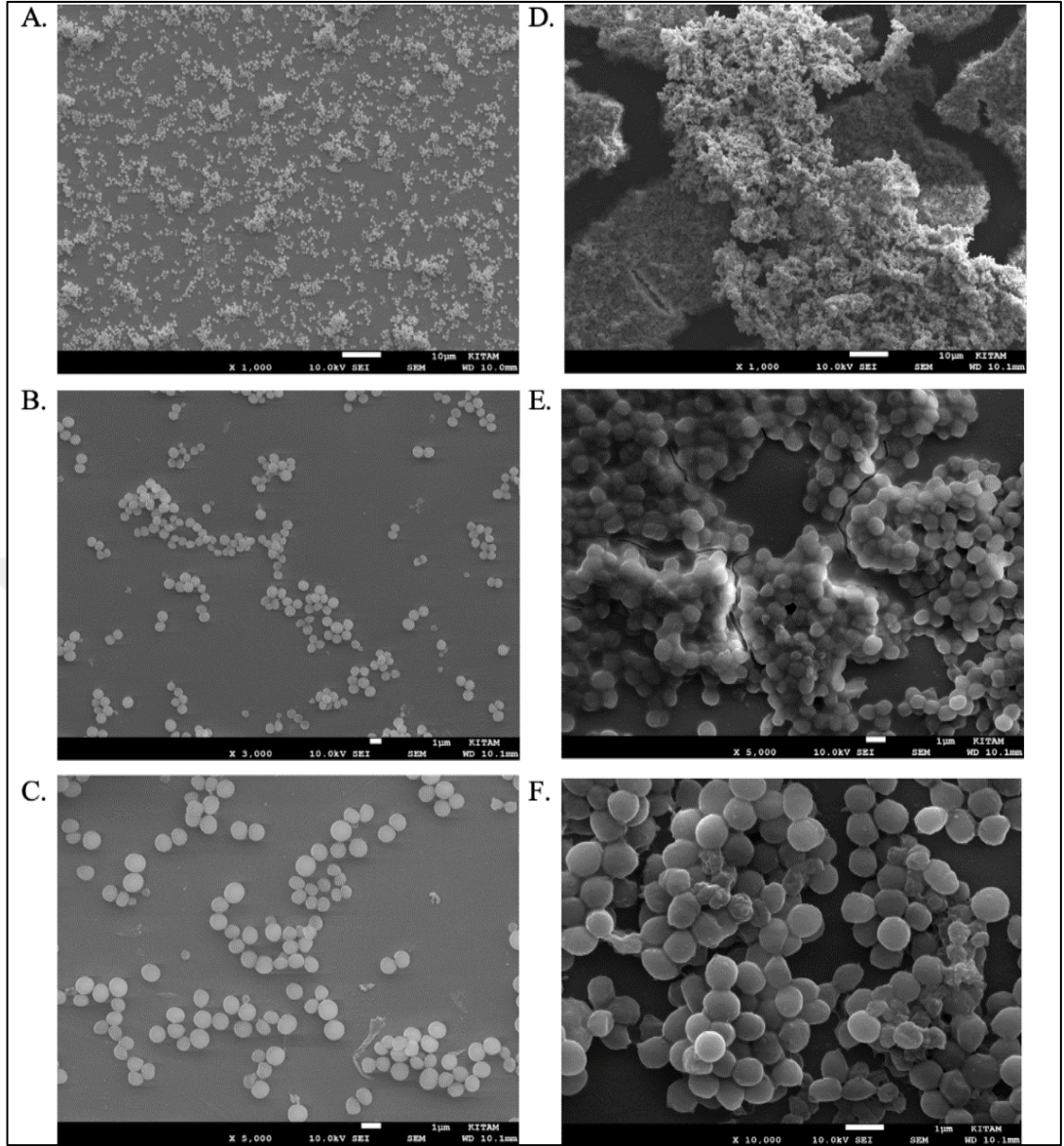
Tablo 16 (Devamı). Güçlü biyofilm oluşturan izolatların teikoplanin MİK ve BİK değerleri

İzolat no	103	106	108	111	117
MİK	1	2	1	1	0.5
BİK	256	128	256	256	256
İzolat no	118	119	122	126	130
MİK	2	0.5	1	0.5	1
BİK	512	512	2048	512	128

Biyofilm oluşumunun %50'sini inhibe eden en düşük BİK konsantrasyonu BİK₅₀, %90'ını inhibe eden en düşük konsantrasyon ise BİK₉₀ olarak tanımlandı. Güçlü biyofilm (skor:3) oluşturan klinik izolatların vankomisin için MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 1 µg/ml ve BİK₅₀ değeri 256 µg/ml, BİK₉₀ değeri 512 µg/ml olarak hesaplandı. Teikoplanin için ise MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 2 µg/ml ve BİK₅₀ değeri 256 µg/ml, BİK₉₀ değeri 1024 µg/ml olarak hesaplandı. Buna göre izolatların vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri için BİK₉₀ değerleri MİK₉₀ değerlerinin 512 katı olarak bulundu. Güçlü biyofilm oluşturan 30 izolatın vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri için MİK ve BİK değerleri arasında korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

4.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Biyofilm üretmeyen 112 numaralı ve biyofilm üreten 118 numaralı izolatların elektron mikroskobu ile 1000'lik, 3000'lik, 5000'lik ve 10000'lik büyütmelelerdeki görüntüleri Şekil 14'te verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde 112 numaralı *S. aureus* izolatında (A, B, C) biyofilm üretimi gözlenmezken; 118 numaralı *S. aureus* izolatında (D, E, F) ise biyofilm üretimi gözlenmektedir.

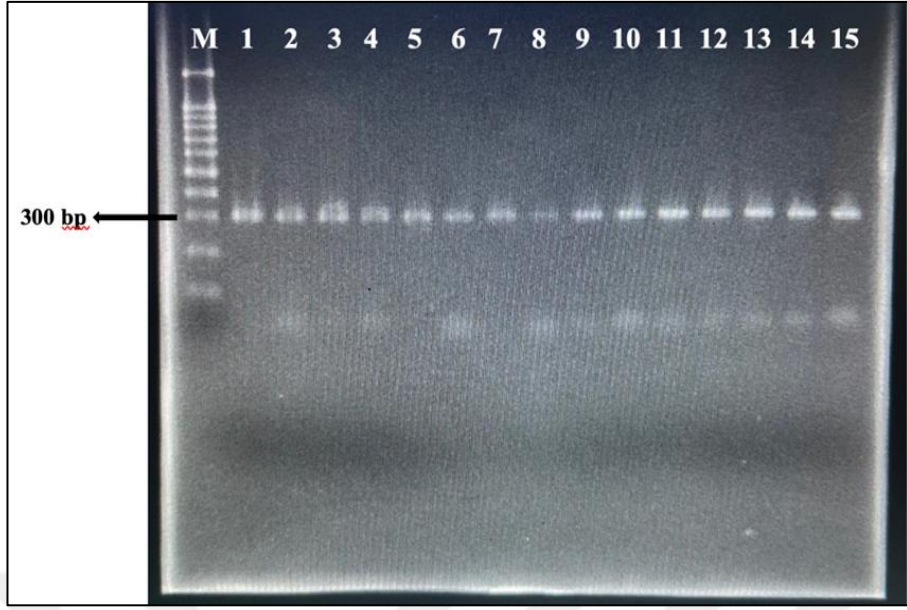


Şekil 14. 112 numaralı biyofilm üreticisi olmayan *S. aureus* izolatının ve 118 numaralı biyofilm üreticisi olan *S. aureus* izolatının SEM görüntüsü

(A: 1000'lik büyütme; B: 3000'lik büyütme; C: 5000'lik büyütme; D: 1000'lik büyütme; E: 5000'lik büyütme; F: 10000'lik büyütme)

4.8. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları

mecA geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 125 izolatta 310 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüsü Şekil 15'te verildi.



Şekil 15. *mecA* geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: *mecA* pozitif kontrol, 2-15. bantlar: *mecA* pozitif hasta izolatları, *mecA*:310 bp)

pvl geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve iki izolatta 433 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüsü Şekil 16’da verildi.



Şekil 16. *pvl* geni yönünden pozitif izolatın PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: *pvl* pozitif kontrol, 5,6. bantlar: *pvl* pozitif hasta izolatları, 2,3,4,7,8,9. bantlar: *pvl* negatif hasta izolatları, *pvl*: 433 bp)

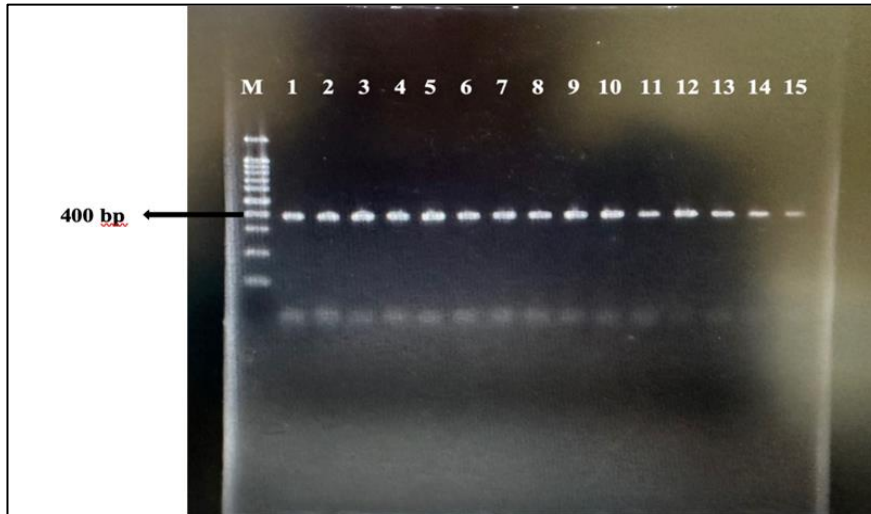
icaA geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 96 izolatta 1315 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüleri Şekil 17’de verildi.



Şekil 17. *icaA* geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1,3,8,12,14. bantlar: *icaA* negatif hasta izolatları, 2,4,5,6,7,9,10,11,13. bantlar: *icaA* pozitif hasta izolatları, 15. bant: *icaA* pozitif kontrol, *icaA*: 1315 bp)

icaD geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 100 izolatta 381 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüleri Şekil 18’de verildi.



Şekil 18. *icaD* geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1.bant: *icaD* pozitif kontrol, 2-15. bantlar: *icaD* pozitif hasta izolatları, *icaD*: 385 bp)

bap geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşu temin edilemediği için çalışmaya pozitif kontrol suşu dahil edilemedi. Çalışılan klinik izolatlarda ise *bap* geni saptanmadı.

S. aureus'ların izole edildikleri örnek türleri ve saptanan virulans genlerinin dağılımı Tablo 17'de verildi. *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı açısından izole edildikleri örnekler arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Antibiyotik direnç oranları ile virulans genleri arasında ise anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Antibiyotik direnç oranları ile virulans genlerinin dağılımı Tablo 18'de verildi.

Tablo 17. Örnek türlerine göre virulans genlerinin dağılımı

Örnek Türü	<i>mecA</i> n:125 (n,%)	<i>pvl</i> n:2 (n,%)	<i>icaA</i> n:96 (n,%)	<i>icaD</i> n:100 n,%)
Kan	40(32)	0	33(34,37)	37(37)
Kateter Kanı	39(31,2)	0	16(16,66)	18(18)
Eksüda	46(36,8)	2(100)	47(48,95)	45(45)
Toplam	125	2	96	100

Tablo 18. Antibiyotik direnç oranlarına göre virulans genlerinin dağılımı

Antibiyotikler	<i>mecA</i> n:125 (n,%)	<i>pvl</i> n:2 (n,%)	<i>icaA</i> n:96 (n,%)	<i>icaD</i> n:100 (n,%)
Eritromisin	42 (33,6)	-	29 (30,2)	32 (32)
Klindamisin	42 (33,6)	-	29 (30,2)	32 (32)
Tetrasiklin	46 (36,8)	1 (50)	35 (36,45)	37 (37)
Siprofloksasin	29 (23,2)	1 (50)	24(25)	24 (24)
Trimetoprim-sülfametoksazol	6 (4,8)	-	5 (5,20)	5 (5)

Çalışmaya alınan 130 *S. aureus* izolatının 81'i mikrotitrasyon plağı yöntemiyle fenotipik olarak biyofilm üretti. Biyofilm üretimi gözlenen 81 izolatın biyofilm ile ilişkili genlere sahip olma oranı *icaA* ve *icaD* için %96,29 olarak tespit edildi. Biyofilm üretmeyen 49 izolatın biyofilm ile ilişkili genlere sahip olma oranı ise *icaA* için %36,73, *icaD* için %44,89 olarak tespit edildi. Biyofilm üretimi güçlü derecede

pozitif olan 30 izolatın ise hepsinde *icaA* ve *icaD* genleri tespit edildi. Biyofilm üretimi ve biyofilm üretme dereceleri ile *icaA* ve *icaD* genleri varlığı arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$).



5. TARTIŞMA

İnsanlar, *S. aureus* bakterileri için doğal bir rezervuardır. *S. aureus* %20-25 oranında dirençli şekilde, %60'a varan oranlarda da aralıklı olarak burunda kolonize olabilir. Çalışmalarda *S. aureus*'un nazal kolonizasyonu enfeksiyon riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Hastanede yatan hastalar, ekzematöz cilt hastalığı olanlar, damar içi madde kullananlar, insüline bağımlı diyabetliler ve uzun süreli kalıcı intravasküler kateteri olan hastalarda kolonizasyon, normal popülasyona göre daha yüksek oranlarda görülmektedir. Bulaş, kolonize bir taşıyıcıdan doğrudan temas yoluyla gerçekleşir (19, 123).

Dünyada hastane kaynaklı patojenler arasında *S. aureus* ilk sıralarda yer almaktadır. Özellikle de cerrahi alandan kaynaklanan enfeksiyonlar arasında en yaygın patojendir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda *S. aureus*'un çoğu suşu metisiline dirençlidir ve tedavisi güçtür. Morbidite ve mortalite oranı yüksektir (124, 125). Bunun yanında toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarında ise virulansla ilişkilendirilen *pvl* geni bulunmaktadır. Bu gen invazif deri-yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoni ile ilişkili bulunmuştur (41).

Bhatta ve ark. (126) Nepal'de yaptıkları çalışmada, 139 MRSA izolatını *pvl* gen varlığı yönünden incelemiş, izolatların %56,8'inde *pvl* gen varlığını pozitif olarak saptamışlardır. Bu *pvl* geni pozitif izolatların tümünün TK-MRSA olduğunu, %93,67'sinin de eksüda örneklerinden elde edildiğini bildirmişlerdir. Cirit ve ark. (127) ise çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri 130 MRSA ve 20 MSSA izolatında *pvl* gen varlığını araştırmışlardır. Yatan hasta örneklerinden elde edilmiş olan iki MRSA ve bir MSSA olmak üzere üç izolatta *pvl* gen pozitifliği saptamışlardır.

Çoğunlukla toplum kökenli enfeksiyonlarda görülmekle birlikte *pvl* geni pozitif suşların hastanelerde de yayılabildiği görülmüştür. *pvl* gen pozitifliği toplum kaynaklı *S. aureus* suşlarının çoğunda saptanırken, hastane kaynaklı suşlarının minimum %5'inde saptanmaktadır (32). Bizim çalışmamızdaki izolatların 10'u (%7,69) polikliniklere ayaktan başvuran hasta örneklerinden, 120'si (%92,30) ise yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir. Bununla beraber *pvl* gen pozitifliği saptanan iki izolattan (%1,53) biri ayaktan başvuran bir hastanın yara yeri kültür

örneğinden, diğeri ise serviste yatmakta olan bir hastanın yara yeri kültür örneğinden izole edilmiştir. Çalışmamız yapılan diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında hasta profilinin çoğunlukla yatan hasta grubundan olmasıyla birlikte TK-MRSA izolat sayısının düşük olması ve izolatların farklı klinik örneklerden elde edilmesi sebebiyle eksüda örneklerinin tüm örneklerin bir kısmını oluşturması, düşük *pvl* gen pozitifliğinin sebebi olarak görülmüştür.

S. aureus'un mobil genetik elemanlarla direnç geni transferi başta olmak üzere pek çok mekanizmayla antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirme yeteneği enfeksiyonların tedavisini güçleştirmekte, bu da mortalite ve morbiditenin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Cosgrove ve ark.'nın (128) yaptığı çalışmada, MRSA bakteriyemisinin MSSA bakteriyemisinden daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple MRSA suşlarının doğru tanısı oldukça önemlidir. Dhungel ve ark. (129) 39 *S. aureus* izolatında sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle metisilin direncini araştırmış, izolatların %87,2'sini MRSA olarak tespit etmişlerdir. Bu MRSA izolatlarının ise %94,1'inde *mecA* gen varlığı tespit etmişlerdir. *mecA* genini içermeyen izolatların ise PBP'nin oksasiline afinitesindeki değişiklikle yeni bir *mecA* homoloğu geliştirebileceğini ifade etmişlerdir. Doğan ve ark. (130) ise oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleriyle metisiline dirençli buldukları 45 *S. aureus* izolatının tamamında *mecA* genini pozitif olarak tespit etmişlerdir. Metisilin dirençli izolatlarda *mecA* gen varlığı yüksek oranda pozitiflik göstermektedir. Bizim çalışmamızda tüm izolatlar sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle dirençli olarak belirlenirken; izolatlardaki *mecA* gen pozitiflik oranı %96,15 olarak tespit edilmiştir. Yöntemler arasında ortaya çıkan uyumsuz izolatların direncinin ise *mecA* ile %70 benzerlik gösteren *mecC* geninden kaynaklanabileceğini düşündük. Çalışmalarda *mecC* geninin PBP2a benzeri bir PBP kodlayarak metisilin direncine neden olduğu gösterilmiştir (131).

Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının yol açtığı enfeksiyonların çoğunlukla çoklu ilaç direnci ile seyretmesi tedavi seçeneklerinde kısıtlılığa yol açmaktadır (132). SENTRY sürveyans çalışmasında 2009-2016 yılları arasındaki MRSA'ların antimikrobiyal duyarlılık profiline baktığımızda eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, siprofloksasin, gentamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılık sıklıklarının

sırasıyla %17, %67, %88, %27, %86 ve %97 olduğu bildirilmiştir. Vankomisin ve teikoplanine direnç gösteren MRSA izolatı gözlenmemiş, bir izolat linezolid dirençli bulunmuştur (133). Bizim izolatlarımızda vankomisin, teikoplanin ve linezolid direnci görülmemiş; eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, siprofloksasilin, gentamisin ve trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotiklerine duyarlılık oranları ise sırasıyla %67,69, %67,69, %64,61, %33,07, %52,30 ve %95,38 olarak saptanmıştır. MRSA izolatlarında eritromisin, tetrasiklin ve gentamisin duyarlılığı dışında çalışmamız verilerindeki antibiyotik direnç oranları SENTRY sürveyans çalışması verileriyle benzerdir. Çalışmamızda gentamisin antibiyotiği için duyarlılık sonucu yalnızca 68 izolatta mevcuttur ve bu izolatlar duyarlı olarak bulunmuştur. Kalan izolatlar için gentamisin duyarlılık bilgisi verilerimizde mevcut değildir. Eritromisin ve tetrasiklin duyarlılık oranlarının ise SENTRY sürveyans çalışmasının tersine çalışmamızın tek merkezli çalışma olması sebebiyle farklılık gösterebileceği düşünülmüştür.

S. aureus enfeksiyonlarının tedavisinde metisilin dışında birçok antibiyotiğe karşı giderek artan çoklu ilaç direnci en önemli sorunlardan biridir. MRSA tedavisinde ilk seçenek antibiyotikler ise glikopeptidlerdir. Vankomisinin antibiyotik duyarlılık testleriyle duyarlı görünmesine rağmen MİK değerlerinde yükselme ve rutin laboratuvar testleri ile saptanamayan dirençli alt popülasyonlarının varlığı gibi durumlar tedavi başarısını etkilemektedir. Ülkemizde Arabacı ve ark. (134) yaptıkları çalışmada MRSA izolatlarında MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerini vankomisin ve teikoplanin için 1,5/2 µg/ml; MİK aralıklarını ise vankomisin için 0,38-2 µg/ml, teikoplanin için 0,125-2 µg/ml şeklinde bulmuşlardır. Yine Taşkın Dalgıç ve ark. (135) yaptıkları çalışmada MRSA izolatlarında vankomisin MİK aralığını 0,5-1 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 1 µg/ml; teikoplanin MİK aralığını 0,25-2 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 2 µg/ml olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda vankomisin MİK değerlerinin aralığı 0,5-2 µg/ml, teikoplanin MİK değerlerinin aralığı ise 0,25-2 µg/ml; vankomisin ve teikoplanin için MİK₅₀ değerleri 1 µg/ml, MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 1 µg/ml, 2 µg/ml olarak saptanmış ve yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında benzer bulunmuştur.

S. aureus bakterisiyle ortaya çıkan enfeksiyonlar yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi gibi oldukça çeşitli akut enfeksiyonları içerir. Bunun yanında osteomyelit, endokardit gibi uzun süreli enfeksiyonlar da görülebilir. Bunlar çoğu zaman kateter, protez eklemi gibi implante edilmiş malzemeler üzerinde tutunan bir biyofilm ile ilişkilidir (136, 137). Biyofilm, bir yüzeye veya dokuya bağlanan, koruyucu bir hücre dışı matriks içine gömülü, sapsız bir mikrobiyal topluluk olarak tanımlanır. Biyofilmin gelişim aşamaları birçok kişi tarafından tanımlanmıştır. Üç ana olaya ayrılabilir. Başlangıç aşamasında bireysel bir planktonik hücrenin, doku veya yabancı materyale geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz adezyonu, ikinci basamakta hücre proliferasyonu ve EPS sentezi, üçüncü basamakta ise beslenme ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan kanalların bulunduğu üç boyutlu yapının oluşumu şeklindedir (138).

Biyofilm matriksi konakçının bağışıklık tepkisine ve antimikrobiyal ilaçların etkisine karşı direnç sağladığı için biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonların tedavisi zordur (139). Biyofilm üretimine sebep olan mikroorganizmaların hastalık oluşum sürecindeki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. İmplantlar üzerindeki biyofilmden kopan hücrelerin üriner sistem enfeksiyonu veya sepsis oluşturmaları, endotoksin üretimi ve konak immün sistemine karşı direnç geliştirmeleri gibi mekanizmalar öne sürülmektedir. Stafilokoklar tarafından oluşturulan biyofilmler, biyofilmle ilişkili enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir (90, 106). Biyofilm gelişimi ve biyofilmin antibakteriyel ilaçlara karşı direnci ile ilgili farklı araştırmacılar tarafından birçok çalışma mevcuttur.

Belbase ve ark. (140) yara örneklerinden izole ettikleri 76 *S. aureus* izolatında mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanarak biyofilm üretimini araştırmışlardır. Bu izolatların 35'inin (%46,1) biyofilm ürettiğini, izolatlar arasındaki 36 MRSA izolatının ise %63,8 oranında biyofilm ürettiğini tespit etmişlerdir. Gür Vural ve ark. (141) mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanarak 200 *S. aureus* izolatının biyofilm üretimini araştırdıkları çalışmada tüm *S. aureus* suşları arasında %51 oranında; MRSA suşları arasında ise %68 oranında biyofilm oluşumu tespit etmişlerdir. Hortaç İştär ve ark. (142) 200 *S. aureus* izolatının mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm oluşumunu araştırdıkları çalışmada izolatların 83'ünün (%41,5) biyofilm

oluşturduğunu, bu izolatların 49'unun (%59) MRSA olduğu tespit etmişlerdir. Biyofilm üretimini etkileyen birçok yapısal ve çevresel faktör vardır. Çalışmalardaki sonuçlara göre MRSA izolatlarının biyofilm üretme oranlarının MSSA'ya göre yüksek olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise biyofilm üretimi sonucunda izolatların 81'inde (%62,30) biyofilm üretimi saptanmıştır. Çalışmamızdaki MRSA izolatlarındaki biyofilm üretim oranı yapılan çalışmalarla kıyaslandığında benzer bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Demir ve ark. (143) kronik yara enfeksiyonu etkeni olarak izole ettikleri 112 *S. aureus* izolatında %70,5 oranında biyofilm oluşumu tespit etmişlerdir. Arciola ve ark. (144) ise protez enfeksiyonlarından izole ettikleri 15 *S. aureus* izolatının 11'inde (%73.0) biyofilm üretimini pozitif olarak bulmuşlardır. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızdaki *S. aureus* izolatlarında biyofilm üretimi düşüktür. Sonuçlar arasındaki farklılık, özellikle yara yerlerinden ve yabancı cisim enfeksiyonlarından izole edilen örneklerde daha yüksek oranlarda görülen biyofilm oluşumundan kaynaklanıyor olabilir. Poudel ve ark. (145) ise kan kültürlerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarında biyofilm varlığını araştırmış ve izolatların %66,7'sinde biyofilm oluşumu saptamışlardır. Çalışmamızdaki biyofilm üretim oranı bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmalarda çeşitli örnek türlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretimi arasındaki farklılıklar dikkati çekmektedir. Hortaç İhtar ve ark. (142) biyofilm oluşturan izolatlar arasında yara izolatlarının kan ve kateter izolatlarına oranla daha yüksek oranda biyofilm ürettiğini gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda kan örneklerinde %62,5, kateter örneklerinde %37,5, eksüda örneklerinde %82 oranında biyofilm üretimi gözlenmiştir. Biyofilm üreten izolatlar arasında örnek türüne göre güçlü derecede biyofilm üretme oranları ise kan örneklerinde %22,5, kateter örneklerinde %25, eksüda örneklerinde %22 şeklindedir. Çalışmamızda Hortaç İhtar ve ark.'nın (142) çalışmasındaki gibi eksüda izolatlarının kan ve kateter izolatlarına göre daha yüksek oranda biyofilm üreticisi olduğu gözlenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Biyofilm oluşturma dereceleri ile örnek türleri arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyofilm üreten suşların üretmeyenlere kıyasla antibiyotik direncinin yüksek olduğu bilinmektedir. Neopane ve ark. (146) yara örneklerinden elde ettikleri 43 klinik *S. aureus* izolatının %69,8'inin biyofilm üreten izolatlar olduğunu ve biyofilm üreten izolatlarda üretmeyenlere göre eritromisin, klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direncin daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bhattacharya ve ark. (147) çeşitli örnek türlerinden izole ettikleri *S. aureus* izolatlarının %55'inde biyofilm üretimi saptamışlardır. Biyofilm üretenlerde eritromisin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol ve klindamisine daha yüksek direnç görürken, biyofilm üretmeyenlerde ise tetrasiklin ve gentamisin direncinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da biyofilm üreten *S. aureus* izolatlarının üretmeyenlerle arasındaki antibiyotik direnç profili kıyaslaması sonucunda eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı biyofilm üreten izolatlarda üretmeyenlere kıyasla antibiyotik direnç oranlarının daha yüksek olduğu, trimetoprim-sülfametoksazol dışında diğer antibiyotikler için bu oranların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Antibiyotiklere direnç geliştiren ve aynı zamanda biyofilm üreten bakteri varlığında tedavi zorlaşmaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerin planktonik bakterilere göre antibiyotiklere 100-1000 kat dirençli olduğu bildirilmiştir. Polisakkarit ve proteinden oluşan biyofilm matriksi içinde yerleşen bakterilerin implante yabancı cisimlere veya hasarlı dokulara yapışabilmeleri daimi enfeksiyonlara yol açılmasına sebep olur (148, 149). Antibiyotik tedavisi biyofilmden ayrılan serbest bakterilerin sebep olduğu semptomları yok edebilir fakat biyofilmi ortadan kaldıramamaktadır. Biyofilm yapısının bir diğer özelliği ise konak immün hücrelerinden korunabilmesidir. Ayrıca nötrofil, lenfosit aktivitesini ve kemotaksisi önler (106, 150). Biyofilmin antibiyotiklere karşı direnç oluşturmada bazı mekanizmaların rol aldığı düşünülmektedir. Bunlardan biri ekzopolisakkarid matriksin antibiyotiği absorbe edip, difüzyonunu kısıtladığı düşüncesi olsa da biyofilm tabakasına çoğu antibiyotiğin kolayca difüze olduğu bilinmektedir. Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişini engellemekte ise moleküler filtre mekanizmasının önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Antibiyotik tedavisi, biyofilmlerin kenarlarında bakterisidal etki gösterir ancak derin kısımlarda bakteriler canlı kalmakta ve

reenfeksiyon gelişimine sebep olmaktadır (102, 106, 151). Logaritmik üreme dönemindeki *S. aureus*'larda respiratuvar aktivite artmaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerin planktoniklere göre metabolizmasının yavaş, membran potansiyellerinin ve büyüme hızlarının düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca *S. aureus*'ların biyofilm oluşturma hızı ile antibiyotiklere karşı direnci arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar beslenmesi kısıtlanarak büyüme hızları düşürülen *S. aureus*'lara antibiyotiklerin yeterince etkili olamadığını göstermiştir. Bu sonuçlarla biyofilmin, bakteri beslenme ve büyümesine etki ederek antibiyotiklere karşı direnç gelişimine katkı sağladığı görülmektedir (152). Antibiyotik direncinin araştırılması daha etkili tedavilerin geliştirilmesi için önemlidir. Geliştirilen tedavilerin biyofilm içinde, durağan fazda bekleyen mikroorganizmalara etkili olması tercih edilir. Bu amaçla farklı antibiyotiklerin farklı bakteri türlerindeki biyofilmlere olan etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (104, 153).

Günümüzde metisiline dirençli stafilokoklardaki artış klinikte vankomisin ve teikoplanin kullanımına yol açmıştır. Glikopeptidler, gram pozitif bakterilerde transglikolizasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu engeller. Ayrıca RNA sentezini engelleyip, membran geçirgenliğini bozarak protoplastlara zarar verip bakterisidal etki gösterir. Biyofilmin, antimikrobiyal geçişini engelleyerek bakterinin ilaçtan korunmasına ve tedavinin başarısız olmasına sebep olduğu gösterilmiştir (19, 154). Wilcox ve ark. (155) intravasküler kateterlerin içerisinde oluşmuş biyofilm içerisindeki antibiyotik konsantrasyonunu vankomisin ve linezolid infüzyonu ile değerlendirmişler, vankomisin antibiyotiğinin konsantrasyonunu linezolidde oranla daha yüksek bulmuşlardır. Vankomisinin yüksek konsantrasyonunun sebebini ise glikokaliks yapısının glikopeptidleri bağlaması olarak açıklamışlardır. Trafny (156) yaptığı çalışmada 19 *S. aureus* izolatında vankomisin, teikoplanin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin bakterilerin sesil formlarına etki eden MİK değerleri ile biyofilm oluşturmuş formlarına etkili BİK değerlerini karşılaştırdığında biyofilm oluşturmuş formlarda belirgin artış olduğunu göstermiştir. Nishimura ve ark. (157) artroplasti hastalarından elde ettikleri 6 stafilokok suşu ile yaptıkları çalışmada, biyofilm oluşturan ve oluşturmayan bakterilerin vankomisin için minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerini karşılaştırdıklarında belirgin fark bulmuşlardır. Planktonik bakterilerin MBK değerlerini 0,5-1 µg/ml arasında bulurken, biyofilm

oluşturan bakterilerin MBK değerlerini bir izolat için 512 µg/ml değerinde, diğer izolatlar için ise 1024 µg/ml değerinin üzerinde bulmuşlardır.

Erdoğan ve ark. (152) yaptıkları çalışmada mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilen stafilokok izolatlarında biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan formların üzerine oksasilin, vankomisin ve eritromisin antibiyotiklerinin etkisini belirleyebilmek için MİK, BİK ve minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değerlerini karşılaştırmışlardır. İzolatlarda BİK ve MBEK değerleri tüm antibiyotikler için benzerlik göstermiş ve 640 µg/ml olarak bulunmuştur. İzolatlarda vankomisin antibiyotiği için BİK değeri en düşük MİK değerinin 40 katı; MBEK değeri ise en düşük MİK değerinin 80 katı olarak saptanmıştır. Şahin ve ark. (108) ise çalışmalarında 8 *S. aureus* klinik izolatının planktonik ve biyofilm oluşturan yapılarında MİK₉₀, BİK ve MBEK değerlerini karşılaştırmışlardır. İzolatların vankomisin antibiyotiği için en düşük BİK değerini MİK₉₀ değerinin 8 katı, en düşük MBEK değerini ise MİK₉₀ değerinin 32 katı olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise güçlü derecede biyofilm oluşturan 30 klinik izolatın MİK ve BİK değerleri kıyaslanmış, vankomisin için en düşük BİK değeri MİK₉₀ değerinin 64 katı; teikoplanin için ise en düşük BİK değeri MİK₉₀ değerinin 16 katı olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar biyofilm oluşturan bakterilerin inhibisyonunun daha zor olduğunu ve bu bakterilerde antibiyotiklerin biyofilm oluşturmeyan formlarına etkili olan MİK değerlerinin üstünde dozlara gereksinim olabileceğini, diğer çalışmalarda da olduğu gibi biyofilmin antibiyotik etkinliğini azalttığını göstermiştir. Bu durum, biyofilmlerin yapısındaki farklılıklardan, kullanılan yöntemlerin farklılıklarından veya bölgeler arası farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Bu konuda yapılacak epidemiyolojik çalışmalar önemlidir.

Polisakkarit intraselüler adhezin (PIA) ya da poli-N-asetilglukozamin (PNAG) olarak adlandırılan, hücrelerin yüzeylere yapışmasını sağlayan adhezyon molekülünün üretimi stafilokoklarda biyofilm oluşumu için çok önemlidir. Bu molekül *icaADBC* operonu tarafından sentezletilir (158). *S. aureus*'un biyofilm oluşumunda *icaA* ve *icaD* genlerinin etkisi de önemlidir. Bu genlerin görevi UDP-N-asetil glukozamini kullanarak oligosakkarit sentezletmektir. *icaA* geni yalnız olduğunda N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi düşükken, *icaD* geni varlığında enzim

aktivitesi belirgin bir şekilde artar. *icaC* deasetilasyon basamağında görev alarak bu oligomerleri uzatır. *icaB*'nin ise deasetilasyonda katalizör olarak görev yaptığı düşünülmektedir (109, 110). Refaat ve ark. (159) diyabetik yara enfeksiyonu bulunan hastalardan elde ettikleri 48 *S. aureus* izolatu ile yaptıkları çalışmada izolatların 43'ünün (%89,58) mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm oluşturdıklarını tespit etmişlerdir. Bu izolatların %100'ünde *icaA*, *icaB* ve *icaD* gen bölgelerini; %56,25'inde ise *icaC* gen bölgesini saptamışlardır. Şahin ve ark. (160) *S. aureus* izolatları ile yaptıkları CRA ve mikrotitrasyon plak yönteminin en az birinde biyofilm oluşumu saptanan 152 izolatta *icaA* ve *icaD* gen pozitifliklerini araştırmışlardır. Bu izolatların 136'sında (%89,5) *icaA* ve *icaD* gen bölgeleri saptanmıştır. Mikrotitrasyon plağı yönteminde güçlü derecede biyofilm üreten 25 izolatın hepsinde, orta derecede biyofilm üreten 95 izolatın 93'ünde (%97,9), biyofilm üretimi negatif olan 32 izolatın ise 18'inde (%56,3) *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin her ikisi de bulunmuştur. Taşkın Dalgıç ve ark.'nın (135) yaptığı 50'si MRSA olan 100 *S. aureus* izolatının kullanıldığı bir çalışmada tüm MRSA izolatlarında ve 48 MSSA izolatında biyofilm oluşumu saptanmıştır. Bu izolatların tamamında *icaD* geni pozitif olarak bulunmuştur. *icaA* geni ise tüm MRSA ve 49 MSSA izolatında gözlenmiştir. Milletli Sezgin ve ark. (161) nazal sürüntü örneklerinden izole ettikleri 87 *S. aureus* izolatu ile yaptıkları çalışmada mikrotitrasyon plağı yöntemiyle izolatların 86'sının biyofilm üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir. Biyofilm üreten bu izolatların %90,6'sında *icaA*, %91,8'inde *icaD* gen bölgelerini pozitif olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda izolatların 96'sında (%73,84) *icaA*, 100'ünde (%76,92) *icaD* gen bölgeleri saptanmıştır. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm üretimi pozitif olan 81 izolatın 78'inde (%96,29) *icaA* ve *icaD*; negatif olan 49 izolatın 18'inde (%36,73) *icaA*, 22'sinde (%44,89) *icaD* gen bölgeleri saptanmıştır. Biyofilm oluşumu güçlü derecede pozitif olarak değerlendirilen 30 izolatın ise tamamında *icaA* ve *icaD* gen bölgeleri pozitif bulunmuştur. Biyofilm üretimi saptanan izolatlarda *icaA* ve *icaD* gen pozitifliğinin yüksek oranlarda saptanması yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Sonuçlara göre biyofilm aktivitesi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Elde ettiğimiz bulgularla biyofilm üretiminde *ica* genlerinin önemi gözlenmiştir ancak tek başına biyofilm üretiminden

sorumlu olmadığı diğer genetik faktörlerin ve çevresel şartların da biyofilm üretiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda *ica* genlerinin pozitifliğinin her zaman biyofilm üretimi ile sonuçlanmadığı da gösterilmiştir (13, 162).

Lasa ve ark. (14) sığır mastitisinden elde edilen *S. aureus* V329 suşunda, biyofilm oluşumu için gerekli olan ve *bap* geni tarafından kodlanan *bap* proteinini elde etmiş; *bap* proteininin hem abiyotik yüzeylere birincil bağlanmayı hem de hücreler arası yapışmayı desteklediğini göstermişlerdir. Çalışmalarında *icaADBC* operonunu içermemesine rağmen, *bap* genini barındıran stafilokok izolatlarının güçlü biyofilm üreticileri olduğunu bu bulgular ışığında *bap* geninin normal PIA/PNAG'a bağımlı mekanizmaya alternatif bir biyofilm geliştirme mekanizmasına aracılık edebileceğini bildirmişlerdir. Cucarella ve ark.'nın (163) yaptıkları çalışmada sığır mastitislerinden izole edilen 195 izolatta PZR ile *icaADBC* ve *bap* gen bölgesi araştırılmış, izolatların 184'ünde (%94,36) *icaADBC*; 50'sinde (%25,6) *bap* gen bölgesi pozitif saptanmıştır. Yine Cucarella ve ark.'ın (164) yaptığı bir başka çalışma ile mastitli sığırlardan edinilen 350 *S. aureus* izolatının %5'inde *bap* geni tespit edilirken, insanlardan edinilen 75 *S. aureus* izolatında *bap* geni tespit edilememiştir. Şahin ve ark. (160) CRA ve mikrotitrasyon plak yönteminin en az birisinde biyofilm saptanan 152 izolat ile yaptıkları çalışmanın PZR sonucunda izolatların yalnızca birinde *bap* geni saptamışlardır. Bizim çalışmamızın sonucunda ise *bap* gen bölgesi içeren izolat bulunamamıştır. Kuvvetli biyofilm oluşumundan sorumlu *bap* geninin *S. aureus* izolatları arasında yeteri kadar yaygın olmadığı ve prevalansının düşük olduğu öne sürülmektedir (165). *S. aureus* suşlarındaki *bap* geni ile ilgili yapılan çalışmalar, *bap* geninin bulunma frekansının düşüklüğünden dolayı oldukça kısıtlıdır ve çalışmalarda *bap* genine insan kaynaklı izolatlardan ziyade ağırlıklı olarak kronik sığır mastitlerinde rastlanılmıştır (111).

6. SONUÇLAR

- Klinik örneklerden elde edilen *S. aureus* izolatlarının (n:130) antibiyotik direnç oranları; penisilin %100, siprofloksasin %22,30, eritromisin %32,30, klindamisin %32,30, tetrasiklin %35,38, trimetoprim-sülfametoksazol %4,61 olarak saptandı.
- Kristal viyole kullanılarak elde edilen OD değerlerine göre izolatların 81'inin (%62,30) biyofilm üreticisi olduğu; 28'inin (%21,53) zayıf derecede, 23'ünün (%17,69) orta derecede, 30'unun (%23,07) ise güçlü derecede biyofilm oluşturduğu belirlendi.
- Klinik izolatların vankomisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 1 µg/ml, teikoplanin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 1 µg/ml ve 2 µg/ml olarak bulundu.
- Güçlü biyofilm (skor:3) oluşturan klinik izolatların vankomisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri 1 µg/ml, BİK₅₀ değeri 256 µg/ml, BİK₉₀ değeri 512 µg/ml; teikoplanin için MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 2 µg/ml, BİK₅₀ değeri 256 µg/ml, BİK₉₀ değeri 1024 µg/ml olarak hesaplandı. Buna göre izolatların vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri için BİK₉₀ değerleri MİK₉₀ değerlerinin 512 katı olarak bulundu. Vankomisin için en düşük BİK değeri MİK₉₀ değerinin 64 katı; teikoplanin için ise en düşük BİK değeri MİK₉₀ değerinin 16 katı olarak bulundu.
- Tüm *S. aureus* izolatlarının (n:130) virulans faktörleri değerlendirildiğinde *mecA* geni %96,15, *pvl* geni %1,53, *icaA* geni %73,84, *icaD* geni %76,92 oranında pozitif saptandı, *bap* geni izolatlarda saptanmadı. *icaA* ve *icaD* geni varlığı açısından izole edilen örnek türleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Antibiyotik direnç oranları ile virulans faktörlerinin varlığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$).
- Mikrotitrasyon plak yöntemiyle saptanan biyofilm aktivitesi ile *icaA* ve *icaD* genleri varlığı açısından anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Mikrotitrasyon plak yönteminde güçlü derecede biyofilm oluşturan 30 izolatın tamamında *icaA* ve *icaD* geni bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Tasneem U, Mehmood K, Majid M, Ullah SR, Andleeb S. Methicillin resistant staphylococcus aureus: a brief review of virulence and resistance. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2022;72(3):509-15.
2. Güler İ, Kılıç H, Atalay MA, Perçin D, Erçal BD. Metisilin dirençli staphylococcus aureus suşlarının antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi*. 2011;38(4):466-70.
3. 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. *Veterinary Microbiology*. 2004;103(3-4):241-7.
4. Yüksekdağ ZN, Baltacı N. Staphylococcus aureus türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2013;43(3):77-83.
5. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015;7(4):493-512.
6. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522-54.
7. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian Medical Journal*. 2012;5(7):344.
8. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(4):1968-70.
9. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;32(1):68-72.
10. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Ravaioli S, Otto M, Arciola CR. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and ica genes in Staphylococcus epidermidis strains from implant orthopedic infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2007;83(3):813-8.
11. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, Abd El-Baky RM. Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(05):342-51.
12. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(6):2151-6.
13. Ammendolia M, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola C, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(10):3235-8.

14. Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*. 2006;157(2):99-107.
15. Öcal DN, Dolapçı İ, Gençtürk Z, Tekeli A. Vankomisin ve daptomisinin koagülaz-negatif Stafilokok izolatlarının oluşturduğu biyofilm üzerine in vitro etkisi. *Mikrobiyol Bul*. 2017;51(3):220-35.
16. Cengiz AT. Bakteriyoloji. In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999; 339-47.
17. Procop GW, Church DL, Hall GS, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Çeviri Ed Hasçelik G, Yılmaz S, Göl N. 7. baskı. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2017;671-85.
18. Winn W, Allen S, Janda W, et al. Gram-positive cocci part I. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott W&W. 6.baskı. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishing, 2006; 623-71.
19. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Bakteri enfeksiyonları. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed. Dündar V, Dündar DÖ. 3. Baskı. 2. Cilt. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; 2065-76.
20. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. baskı. İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2004; 495-523.
21. Tünger A. Staphylococcus aureus: mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. In: Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. 1. baskı. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-22.
22. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Ed. Yenen OŞ. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2010;224-32.
23. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Stafilokoklar ve ilişkili gram pozitif koklar. In: Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Ed. Sultan N. 7. Baskı. Ankara, Pelikan Kitabevi, 2016;174-87.
24. Ünal S. Staphylococcus aureus: direnç mekanizmaları. In: Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları Ed. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 23-38.
25. Çalışkan T. Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus suşlarının direnç profillerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2011.
26. Cengiz T, Mısırlıgil A, Aydın M. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 2004; 937-43.
27. Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology*. 2007;51(9):787-95.
28. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000;16:3-10.
29. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology*. 1994;48(1):585-617.
30. Karlıbaş Z. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan üretilen Staphylococcus aureus'lar için konak risk faktörlerinin S. aureus virulans faktörlerinden olan panton-valentine lökositin geninin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi, 2012.

31. Kong EF, Johnson JK, Jabra-Rizk MA. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an enemy amidst us. *PLOS Pathogens*. 2016;12(10):e1005837.
32. Tunç E. Metisiline dirençli stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. Malatya İnönü Üniversitesi, 2014.
33. Freeman J, Goldmann DA, Smith NE, Sidebottom DG, Epstein MF, Platt R. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *New England Journal of Medicine*. 1990;323(5):301-8.
34. Ono HK, Omoe K, Imanishi K, et al. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and Immunity*. 2008;76(11):4999-5005.
35. Schubert S, Schwertz H, Weyrich AS, et al. *Staphylococcus aureus* α -toxin triggers the synthesis of B-cell lymphoma 3 by human platelets. *Toxins*. 2011;3(2):120-33.
36. Ulusoy S, Usluer G, Ünal SÖ. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-22
37. Huseby M, Shi K, Brown CK, et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(23):8719-26.
38. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(5):647-56.
39. Guillet V, Roblin P, Werner S, et al. Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal β -barrel pore-forming toxins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(39):41028-37.
40. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud J-M, Héchard Y. δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*. 2009;30(4):817-23.
41. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*. 2007;87(1):3-9.
42. Özkul H, Öktem İA, Gülay Z. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında panton-valentin lökositin (PVL) varlığının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2007;41:357-62.
43. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(3):616-87.
44. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;29(5):1128-32.
45. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(11):3117-27.
46. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;39(2):181-9.

47. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *Journal of Dermatological Science*. 2008;49(1):21-31.
48. Yamasaki O, Yamaguchi T, Sugai M, et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1890-3.
49. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(1):16-34.
50. Müştak HK, Esendal ÖM. *Staphylococcus aureus* ekzotoksinleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2008;19(1):69-74.
51. Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*. 2000;82(11):1005-14.
52. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ. Genotypic and phenotypic assessment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *International Journal of Microbiology*. 2009;2009:614371.
53. Winn W, Allen S, Janda W, et al. Gram-positive cocci part I. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott W&W. 6.baskı. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 623-71.
54. Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, Ankara, Güneş Kitabevi, 1999; 91-108
55. Kuyucu N. Antibiyotik direnci. *Çocuk Enf Dergisi*. 2007;33-8.
56. Zscheck K, Murray B. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(9):1966-70.
57. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi Yıllık Raporu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2016.
58. Gökçeoğlu E, Körkoca H. Stafilokoksik haşlanmış deri sendromu. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 1(2):127-36.
59. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 2000; 239-68.
60. Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok enfeksiyonları. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kitabı. Ed. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2003; 1507-16.
61. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. *Current Infectious Disease Reports*. 2000;2:207-14.
62. Que YA, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 6.Baskı. Londra, Churchill Livingstone, 2005; 2321-51.
63. Göncüoğlu C, Kara E, Demirhan K, Kalyoncu AF, Ünal S. Beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonları. *Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2021;26(1):23-33.
64. Doi Y, Chambers HF. Penicillins and β -lactamase inhibitors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease. 2015;1:263-77.
65. Budakçı İ. Linezolid ve diğer bazı antibiyotiklerin antibakteriyel etkisinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, 2010.
66. Yıldız O, Aygen B. Stafilokokların antibiyotik duyarlılığı ve direnç sorunu. *Enfeksiyon Hastalıkları Serisi*. 2002;5(3):128-36.

67. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(Supplement_3):S171-6.
68. Kanan B. Gram-pozitif bakterilere karşı in vitro linezolid aktivitesinin değerlendirilmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi*. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2002.
69. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(3):565-76.
70. Arman D. Dirençli gram pozitif kok infeksiyonları: kullanımdaki tedavi seçenekleri. *Ankem Derg*. 2008;22:287-96.
71. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(4):781-91.
72. Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(12):3251-5.
73. Bozdoğan B, Leclercq R. Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(11):2720-5.
74. Lundstrom TS, Sobel JD. Vancomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and rifampin. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1995;9(3):747-67.
75. Yorgancıgil B, Demirci M, Demir İ, Arda M. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin değişik antibiyotiklere dirençleri. *İnfeksiyon Dergisi*. 1999;13(4):501-3.
76. Yao JDC, Moellering RC. Antibacterial agents. In: *Manual Of Clinical Microbiology*. Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RM. 6. Baskı. Washington, ASM press, 1995; 1281-1307.
77. Erol S, Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003; 417-20.
78. Özaras R, Tabak F. Daptomisin/Daptomycin. *Klinik Dergisi*, 2010;23(2):35.
79. Hancock RE. Mechanisms of action of newer antibiotics for gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(4):209-18.
80. Eisenstein B. Treatment of staphylococcal infections with cyclic lipopeptides. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14:10-6.
81. Takcı Z. Sistemik Antibiyotikler. *TURKDERM-Turkish Archives of Dermatology and Venereology*. 2020;54(Supplement_1):S30-3.
82. Jcvons M. Celbenin-resistant staphylococci. *BMJ*. 1961;1:124-5.
83. Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(Supplement_4):S19-22.
84. Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005;5(5):479-89.
85. Altınok Ö, Gürpınar Ö, Özgen E. Bakteriyel biyofilmler. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*. 2018;1(2):45-51.
86. Marshall KC. *Interfaces In Microbial Ecology*. London, Harvard University Press, 1976; 107-29.
87. Sezgin FM. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonunda araştırılması. *Tıpta Uzmanlık Tezi*. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2012.

88. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;75(6):499-511.
89. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(9):881.
90. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.
91. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995;49(1):711-45.
92. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(1):1-13.
93. Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2003;129(5):599-601.
94. Hussain M, Wilcox M, White P. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;10(3-4):191-208.
95. Kartal MO, Ekinci MB, Poyraz B. Biyofilm yapısı ve önlenmesi. *Akademik Gıda*. 2021;19(3):353-63.
96. İlhan G, Ekinci FY. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*. 2009;34(3):165-73.
97. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001;147(1):3-9.
98. Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2007;34(9):577-88.
99. Duran T. Midye kabuğu tozunun paslanmaz çelik yüzeylerde oluşan biyofilm temizleme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi, 2011.
100. Köremezli A, Kariptaş E, Erdem B. Bakteriyel mikroorganizmalarda bir savunma sistemi: "biyofilm". *Black Sea Journal of Health Science*. 2022;5(1):153-61.
101. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(10):2675-9.
102. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion In Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 2004;12(3):185-90.
103. Sakarya S. Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. *Klinik Dergisi*. 2005;18(1):3-8.
104. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, et al. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;312(2):417-23.
105. Saraçlı MA. Quorum sensing: mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Güllhane Tıp Dergisi*. 2006;48(4):244-50.
106. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
107. Amorena B, Gracia E, Monzón M, et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999;44(1):43-55.

108. Şahin R. Staphylococcus aureus suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. Denizli Pamukkale Üniversitesi, 2007.
109. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters. 2004;236(2):163-73.
110. Götz F. Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiology. 2002;43:1367-78.
111. Tormo MA, Ubeda C, Marti M, et al. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in Staphylococcus aureus. Microbiology. 2007;153(6):1702-10.
112. Atshan SS, Shamsudin MN, Thian Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei C. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. BioMed Research International. 2012;2012; 417247.
113. Kart Yaşar K, Bilir Aybar Y, Pehlivanoglu F, Şengöz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. Ankem Dergisi. 2011;25(2):89-93.
114. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. Journal of Turgut Ozal Medical Center. 2006;13(3):193-7.
115. Christensen GD, Simpson W, Younger J, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. 1985;22(6):996-1006.
116. Valdés L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Monitoring in real time the cytotoxic effect of Clostridium difficile upon the intestinal epithelial cell line HT29. Journal of Microbiological Methods. 2015;119:66-73.
117. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023.
118. Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai S. Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology. 2012;54(6):511-7.
119. Dündar D. Sıvı mikrodilüsyon MİK testi. In: Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı. Ed. Başustaoglu A, Yıldiran ŞT. 3. Baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık, 2013; 5.2.
120. Tré-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against Pseudomonas aeruginosa biofilm and planktonic cultures. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008;31(4):329-36.
121. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. Veterinary Microbiology. 2003;92(1-2):179-85.
122. McClure J, Conly JM, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1141-4.
123. Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2014;4:178.
124. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and

- Prevention, 2009-2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2013;34(1):1-14.
125. Cheung GY, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547-69.
126. Bhatta DR, Cavaco LM, Nath G, et al. Association of panton valentine leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). *BMC Infectious Diseases*. 2016;16:1-6.
127. Cirit OS, Yıldırım T, Çoban AY. *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında panton-valentin lökositin varlığının araştırılması. *Balkan Medical Journal*. 2011;2011(2):119-24.
128. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(1):53-9.
129. Dhungel S, Rijal KR, Yadav B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and detection of *mecA* gene among cardiac patients from a tertiary care heart center in Kathmandu, Nepal. *Infectious Diseases: Research and Treatment*. 2021;14:1-10.
130. Doğan E, Kılıç A, Türütoğlu H, Öztürk D, Türkyılmaz S. Screening of *Staphylococcus aureus* isolates for *mecA* and *mecC* genes carriage. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2016;63(4):389-99.
131. Hancı H, Ayyıldız A, Baltacı MÖ, İgan H, Uyanık MH, Adıgüzel A. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Klinik Dergisi*. 2018;31(1):30-3.
132. Diekema D, Pfaller M, Schmitz F, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;32(Supplement_2):S114-32.
133. Diekema DJ, Pfaller MA, Shortridge D, Zervos M, Jones RN. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019;6(Supplement_1):S47-53.
134. Arabacı Ç, Uzun B. *Staphylococcus aureus* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Klinik Journal/Klinik Dergisi*. 2021;34(1):69-74.
135. Taşkın Dalgıç BÇ, Yenişehirli G, Otlu B, Tanrıverdi ES, Yenişehirli A, Bulut Y. The relationship between biofilm production and antimicrobial resistance in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: in vitro evaluation. *Mediterranean Journal of Infection, Microbes & Antimicrobials*. 2022;11:14.
136. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(Supplement_5):S350-9.
137. Barrett L, Atkins B. The clinical presentation of prosthetic joint infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(Supplement_1):S25-7.
138. Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JK. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new

diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. Reviews and Research in Medical Microbiology. 2006;17(2):45-54.

139. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2015;5:1.

140. Belbase A, Pant ND, Nepal K, et al. Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2017;16:1-5.

141. Gür Vural D, Bıyık İ, Torun EG, Çaycı YT, Bilgin K, Birinci A. *Staphylococcus aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırılması. Sağlık Bilimlerinde Değer. 2013(2):245-9.

142. Hortaç İstar E, Eda Alışkan H, Başustaoğlu A. Metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni Dergisi. 2020;54(2):223-34.

143. Demir C, Demirci M, Yigin A, Tokman HB, Yildiz SC. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020;29:101584.

144. 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. Diagnostic Molecular Pathology. 2001;10(2):130-7.

145. Poudel P, Poudel P, Adhikari N, Shah PK. Multi-drug resistant bacterial isolates associated with blood stream infection. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS). 2015;14(2):23-52.

146. Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. International Journal of General Medicine. 2018;11:25-32.

147. Bhattacharya S, Bir R, Majumdar T. Evaluation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a Tertiary Care Hospital, Tripura, Northeast India. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015;9(9):DC01.

148. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000;64(4):847-67.

149. Georgopapadakou N. Antibiotic resistance in biofilms. In: Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Ed. John LP, Mark ER, Roger GF. 1. baskı. Florida, CRC press, 2005; 401-7.

150. Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. 2001;9(1):34-9.

151. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2005;58(6):353.

152. Erdoğan SF, Konak S. Bazı antibiyotiklerin biyofilm oluşturan stafilokok izolatları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. Journal of the Institute of Science and Technology. 2020;10(2):838-45.

153. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 2005;437:41-7.
154. Öncül O. Vankomisin ve teikoplanin hikayesi. *Ankem Dergisi*. 2010;24:101-9.
155. Wilcox MH, Kite P, Mills K, Sugden S. In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47(2):171-5.
156. Trafny EA. Susceptibility of adherent organisms from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn wounds to antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1998;10(3):223-8.
157. 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. *Journal of Orthopaedic Science*. 2006;11(1):46-50.
158. Hira V, Sluijter M, Goessens WH, et al. Coagulase-negative staphylococcal skin carriage among neonatal intensive care unit personnel: from population to infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):3876-81.
159. Refaat SM, Mehdi LY, Al-khazraji SM. Detection (Icaa, Icab, Icac, Icad) genes of *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic wound infections. *HIV Nursing*. 2023;23(2):1042-6.
160. Şahin R, Kaleli İ. *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2018;52(2):111-22.
161. Sezgin FM, Mustafa A, Sevim E, Babaoglu UT. In vitro activity of fosfomycin on biofilm in community-acquired *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2019;9(3):202-9.
162. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1973-6.
163. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 2004;72(4):2177-85.
164. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Ini, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(9):2888-96.
165. Vautor E, Abadie G, Pont A, Thierry R. Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary Microbiology*. 2008;127(3-4):407-11.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı:B.30.2.ODM.0.20.08/ 693-733-901

17.02.2023

Sayın Dr Öğretim Üyesi Demet Gür Vural

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Metisilin dirençli Staphylococcus aureus** izolatlarında **biyofilm oluşumunun genotipik ve fenotipik yöntemlerle araştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2022/466 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 26.10.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ondokuz mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu T.c.036211121919/2782 -4576007 Omatack@gmail.com
Eski Dış Tıbbi Fakültesi 2.Kat Atakum/SAMSUN

Ek 2. Turnitin Orijinallik Raporu

METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA BİYOFİLMİN GENOTİPİK VE FENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI			
ORJİNALLİK RAPORU			
% 17	% 16	% 7	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4	
2	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2	
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1	
4	acikerisim.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
5	tmc.dergisi.org İnternet Kaynağı	%1	
6	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
7	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
8	www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org İnternet Kaynağı	<%1	
dspace.gazi.edu.tr			