

Metisiline Duyarlı ve Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

Determination of Biofilm Formation Properties of Methicillin Sensitive and Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates by Conventional and Molecular Methods

Elvan HORTAÇ İŞTAR¹(ID), Hikmet Eda ALIŞKAN²(ID), Ahmet BAŞUSTAOĞLU³(ID)

¹ Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Beytepe Murat Erdi Eker Devlet Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Ankara.

¹ Republic of Turkey Minister of Health Beytepe Murat Erdi Eker State Hospital, Central Laboratory, Ankara, Turkey.

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

² Baskent University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

³ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Baskent University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından desteklenmiştir (Proje no: KA16/264).

Makale Atfı: Hortaç İhtar E, Alışkan HE, Başustaoğlu A. Metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):223-234.

ÖZ

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar günümüzde en önemli tedavi başarısızlığı nedenlerinin başında gelmektedir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların en sık etkenlerinden biri *Staphylococcus aureus*'tur. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar bakterideki metisilin direnciyle birleştiğinde uygun tedavi protokolü belirlemek son derece güçleşmektedir. Çalışmada farklı klinik örneklerden izole edilmiş metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus*'ların biyofilm oluşturma potansiyelini gözlemek; biyofilm tespitinde kullanılacak güvenilir ve etkin yöntemleri belirlemek amaçlanmıştır. Klinik ve laboratuvar bulgular karşılaştırılarak etken olarak kabul edilen 107 adet yara, 93 adet kan ve kateter örneğinden izole edilmiş toplam 200 *S.aureus* izolatı (100 adet metisiline dirençli, 100 adet metisiline duyarlı) çalışmaya dahil edilmiştir. Metisilin duyarlılığının tespitinde otomatize sistem ile elde edilen oksasilin minimum inhibitör konsantrasyonu değeri ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleri birlikte değerlendirilmiştir. Bakterilerin biyofilm oluşumu modifiye Christensen (MC), MTT, BioTimer ve Kongo kırmızısı agar (KKA) yöntemleri ile incelenmiş, ayrıca biyofilm oluşumundan sorumlu *ica* operonu varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. MC, MTT ve BioTimer yöntemlerinin tümünde metisiline dirençli izolatların duyarlı izolatlara göre daha kısa sürede ve yüksek oranda biyofilm oluşturduğu, oluşturdukları biyofilm yapısının daha yoğun olduğu gösterilmiştir. Kan ve yara izolatları arasında biyofilm oluşumu açısından bir fark bulunmamıştır. Konvansiyonel yöntemlerden en duyarlı yöntemin MTT; en özgül yöntemin BioTimer yöntemi olduğu görülmüştür. PCR

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Elvan Hortaç İhtar, Beytepe Murat Erdi Eker Devlet Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, 1746. Sk. No: 1, 06800 Ahlatlıbel, Çankaya, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 906 0671, **E-posta (E-mail):** elvanhortac@gmail.com

ile *icaADBC* operonuna ait bir gen bölgesini içeren izolatlarla MC, MTT, BioTimer, KKA yöntemlerine göre biyofilm oluşturan izolatlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Tespit edilen biyofilm varlığı ile *ica* pozitifliği arasında yüksek korelasyon bulunduğu, *ica* gen sayısı arttıkça biyofilm oluşturma eğiliminin arttığı görülmüştür. Metisiline dirençli *S.aureus* gibi daha virülen izolatların biyofilm oluşturma eğiliminin daha yüksek olduğu ve bu iki direnç mekanizmasının birbirini kaskat şeklinde destekler nitelikte olduğu görülmüştür. *ica* tespitinin tek başına bile virülen izolatların belirlenmesinde önemli bir ayıraç olabileceği vurgulanmış, böylece tedavi kararlarının alınmasında, korunma stratejilerinin belirlenmesinde ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede erken bir belirteç olabileceği görülmüştür. Moleküler yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda biyofilm varlığının tespitinde kullanılacak hızlı sonuç veren, kolay uygulanabilir ve güvenilir konvansiyonel yöntemlerin varlığı son derece önem taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan tüm konvansiyonel yöntemler bu açıdan yeterli gözükmemektedir. MC ve MTT yöntemleri biyofilm kantitasyonu da yapması açısından ön plana çıkmaktadır. BioTimer yöntemi ise biyofilm varlığının tespitinde kullanılan çok yeni ve dikkat çekici bir testtir. Sonuç olarak kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak belirlenen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelini belirlemek ve girişimsel işlemlerden önce bu bakterilere yönelik gereken tedbirleri almak biyofilm kaynaklı enfeksiyonları ve bunlara bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*; biyofilmler; metisilin direnci.

ABSTRACT

Biofilm-related infections are considered as among the foremost causes of treatment failure nowadays. One of the most common causes of biofilm-related infections is *Staphylococcus aureus*. It becomes extremely difficult to determine the appropriate treatment protocol while biofilm-related infections are coexisting with bacterial methicillin resistance. The aim of this study was to observe the potential of biofilm formation of methicillin-sensitive and -resistant *S.aureus* strains isolated from different clinical specimens and to determine reliable and effective methods for biofilm detection. A total of 200 *S.aureus* strains (100 methicillin-resistant and 100 methicillin-susceptible) isolated from 107 wound, 93 blood and catheter specimens, which were accepted as causative agents, included in the study. In order to determine the methicillin sensitivity, oxacillin minimal inhibitory concentration value obtained by an automated system and cefoxitin disc diffusion method were evaluated together. Biofilm formation was investigated by modified Christensen (MC), MTT, BioTimer and Congo Red Agar (CRA) methods, and the presence of *ica* operon responsible for biofilm formation was also observed by polymerase chain reaction. It has been shown that methicillin-resistant isolates produce biofilms in a shorter time and higher rate, and their biofilm structure is denser than methicillin-sensitive isolates in all MC, MTT and BioTimer methods. There was no difference between blood and wound isolates in biofilm formation. The most sensitive and specific conventional methods were MTT and BioTimer methods respectively. There was no significant difference between the isolates containing a gene region of *icaADBC* operon and the biofilm forming isolates according to MC, MTT, BioTimer and CCA methods. There was a high correlation between the presence of biofilm and *ica* positivity, and the tendency to form biofilm augmented as the number of *ica* genes increased. It has been emphasized that more virulent strains such as methicillin-resistant *S.aureus* have a higher tendency to form biofilm, and these two resistance mechanisms have been shown to support each other as cascade. *ica* detection may be an important reagent in itself for the detection of virulent strains, thus detection of the *ica* presence may be an early marker of treatment decisions, determination of protection strategies, and struggle with biofilm-related infections. In cases where molecular methods are not available, the existence of quick, easy-to-apply and reliable conventional methods to detect biofilm formation is extremely important. All conventional methods used in this study seem to be sufficient in this respect. MC and MTT methods stand out in terms of biofilm quantitation. BioTimer method is a very new and remarkable test used to detect biofilm formation. In conclusion, determining the potential of biofilm formation of colonizing or causative agents and taking essential precautions before interventional procedures will decrease biofilm related infections and related morbidity and mortality.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; biofilms; methicillin resistance.

GİRİŐ

Günümüzde tüm dünyada hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların başında gelen etkenlerden biri olan *Staphylococcus aureus* birçok lokal ve sistemik enfeksiyonun sebebidir. Stafilokok enfeksiyonlarının patogenezinde toksin ve ekstraselüler enzim üretimi, antibiyotik direnci ve yabancı cisimlerin yüzeyine yapışarak bu yüzeylerde biyofilm oluşumu rol oynar. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda mikroorganizmanın vücut içine yerleştirilen malzemelere yapışması biyofilm kaynaklı enfeksiyon patogenezinde ilk aşamayı oluřurmaktadır¹.

S.aureus'un insanda deri, sindirim sistemi ve solunum yollarının normal flora üyesi olması ve yüzeylere yapışmasını kolaylaştıran "slime" faktör oluşturabilme yeteneği tüm dünyada toplum ve hastane kökenli patojenler arasında ilk sıralarda yer almasını sađlamıřtır².

Biyofilm yapısı ilk keşfedildiği günden bu yana çeşitli şekillerde tanımlansa da tam tanım olarak kendi ürettikleri polisakkarit yapıda ekstraselüler organik matriks içinde gömülü birbirine ve katı bir yüzeye tutunmuş sıkı ađ yapısında, hareketsiz ve birbirleriyle iletişim halinde bir hücre topluluğudur. Gerek büyüme ve gen ekspresyonu gerekse antibiyotik duyarlılığı açısından planktonik formlarından farklılaşmış bir yapıdır ve konakta kronik bir enfeksiyon kaynađıdır³.

Biyofilm yapısını tespit etmeye yönelik birçok boyama yöntemi, metabolik ve mikroskopik yöntem tanımlanmaya ve standardize edilmeye çalışılmıştır. *S.aureus* biyofilmlerinin oluşumundaki temel mekanizma olan polisakkarit interselüler adezin (PIA) sentezinden sorumlu *icaADBC* operonunu içeren izolatlar da potansiyel birer biyofilm üreticisi olarak tanımlanmaktadır^{4,5}.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden elde edilen metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatlarının moleküler ve konvansiyonel yöntemlerle biyofilm oluşurma yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu alışma, Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 11.08.2016 ve Karar no: 26862).

Çalışmaya Ocak 2013-Haziran 2016 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 107 adet yara, 72 adet kan ve 21 adet kateter örneğinden izole edilmiş, konvansiyonel yöntemler ve Phoenix (Becton Dickinson-BD, ABD) otomatize sisteminde tanımlanmış toplam 200 *S.aureus* izolatı (100 adet MRSA, 100 adet MSSA) dahil edildi. Yara örnekleri klinik bulgular ve Q skoruna göre, kan örnekleri klinik ve laboratuvar bulguları ile etken olarak kabul edilen izolatlardan seçildi. Kateter örnekleri periferik kanda üreme olup olmamasına göre kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu olarak değerlendirilen izolatlardan seçildi. Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu olarak tanımlanan hastaların kan kültür örnekleri genetik ve epidemiyolojik tekrarı önlemek amacıyla çalışmaya dahil edilmedi.

Metisilin duyarlılığının tespitinde Phoenix (Becton Dickinson-BD, ABD) otomatize sisteminde oksasilin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri > 2 mg/L olan bakteriler MRSA kabul edildi. Tüm sonuçlar sefoksitin disk difüzyon testi ile doğrulandı⁶.

Modifiye Christensen Yöntemi (MCY) ile Biyofilm Varlığının Saptanması

Christensen tarafından tanımlanan yöntem çeşitli modifikasyonlarla uygulandı⁷. Doksan altı kuyucuklu mikropklarda her bakteri için üçer kuyucuk kullanıldı. Mikropklarinin %5 koyun kanlı agar besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonrası kuyucuklar fosfat tampon solüsyonu (PBS) (AppliChem, Almanya) ile üç defa yıkandı. Fiksasyon için metanol, boyama için %2'lik kristal viyole kullanıldı. %95'lik etanol ile kuyucuk taban ve duvarlarındaki boya çözülerek optik dansiteler spektrofotometrik olarak ölçüldü (BioTek Instruments, Inc., ABD)^{8,9}.

MTT Yöntemi ile Biyofilm Varlığının Saptanması

İğne kapaklı 96 kuyucuklu mikropklarda (Thermo Scientific, Danimarka) inkübasyon aşamasına kadar MCY ile aynı prosedür izlendi. Mikropklarinin orbital çalkalayıcıda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Her çalışma öncesi steril PBS ile taze MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] çözeltisi hazırlandı (Thermo Fisher Scientific, Danimarka). Kuyucuklara eklenerek karanlık ortamda 37°C'de üç saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO (Sigma, Fransa) içerisinde çözülerek spektrofotometrik olarak ölçüldü¹⁰.

Her iki yöntemden elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması kaydedildi ve biyofilm kantitasyonu yapıldı⁸.

BioTimer Yöntemi ile Biyofilm Varlığının Saptanması

Bakteri sayısı-renk değişim zamanı korelasyon eğrisini çizmek için hazırlanan bakteri süspansiyonu (*S.aureus* ATCC 6538) BT-PR besiyeri içeren tüplere eklenerek seri dilüsyonları yapıldı. Tüplerin uygun aralıklarla renk değişim kontrolleri sonucunda her bir konsantrasyon için rengin kırmızıdan sarıya döndüğü süre (120-960 dakika) tespit edildi. Her kuyucuktan 10 µl alınarak katı besiyerine ekildi. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası koloniler sayılarak zaman/bakteri log₁₀ CFU grafiği çizildi^{11,12}. Biyofilm deneyleri iğne kapaklı mikropklarda gerçekleştirildi. Kuyucuklara 10⁷ cfu/ml bakteri süspansiyonu eklenerek orbital çalkalayıcıda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Her bakteri için üçer kuyucuk kullanıldı. İğne kapak steril PBS ile yıkanarak planktonik hücreler uzaklaştırıldı. BT-PR besiyeri dağıtılmış yeni bir mikropklaşa kapak kapatıldıktan sonra besiyerindeki dakikalık renk değişimi gözlemlendi. Oluşturulan eğri kullanılarak, oluşan biyofilmdeki mikroorganizma sayısı hesaplandı^{11,12}.

Kongo Kırmızısı Agar (KKA) Yöntemi ile Biyofilm Varlığının Saptanması

%5 koyun kanlı agarda üremiş saf kolonilerden KKA besiyerine tek koloni yöntemiyle ekimler yapıldı. Ekim işlemi takiben plaklar 37°C'de, ardından oda sıcaklığında birer gün inkübasyon sonrası iki ayrı kişi tarafından değerlendirildi. Tek koloni yöntemiyle ekilen bakterilerden koyu kırmızı-siyah veya pürüzlü, kuru koloni oluşturan izolatlar slime

pozitif; pembe-kırmızı, bordo veya yalnızca orta kısımları koyu renkte koloni oluşturanlar slime negatif olarak değerlendirildi^{13,14}.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Biyofilm Genlerinin Gösterilmesi

DNA ekstraksiyonu uyumlu izolasyon kitiyle üretici firmanın nerileri doğrultusunda yapıldı (Macherey-Nagel, Almanya). *icaA*, *icaB*, *icaC* ve *icaD* gen bölgelerinin varlığı literatürde tanımlanmış primer dizileri kullanılarak PCR yöntemi ile araştırıldı^{5,13}.

Tüm biyofilm deneylerinde *S.aureus* ATCC 6538 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 pozitif, *S.aureus* ATCC 29213 ve *S.epidermidis* ATCC 12228 negatif kontrol suşları olarak kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan sayısal verilerin bağımsız gruplar arası karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi; bağımlı gruplar arası karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Nominal değerlerin karşılaştırmasında bağımsız gruplar için ki-kare testi, bağımlı gruplar için McNemar testi uygulandı. p değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Yara rneği 107 (%53.5), kan ve kateter rneği 93 (%46.5) olmak üzere toplam 200 *S.aureus* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Metisiline dirençli 100, metisiline duyarlı 100 izolat saptanmıştır.

MCY'de izolatların 83 (%41.5)' biyofilm oluştururken, 117 (%58.5)'si oluşturmamıştır (Tablo I). Biyofilm oluşturan bakterilerin 62 (%31)'sinin zayıf, 18 (%9)'inin orta, 3 (%1.5)'ünün kuvvetli derecede biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Biyofilm oluşturan örneklerin 49 (%59)'u MRSA, 34 (%41)' ise MSSA olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, MRSA izolatlarının biyofilm oluşturma oranı MSSA izolatlarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur (p= 0.031). Kuvvetli derecede biyofilm oluşturan 3 bakteri MRSA, orta derecede biyofilm oluşturan 18 bakterinin 2'si MSSA olarak saptanmıştır. Yara izolatlarının kan ve kateter izolatlarına oranla daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (p= 0.029).

Tablo I. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

	Biyofilm pozitif			Biyofilm negatif		
	MRSA (n)	MSSA (n)	Toplam n (%)	MRSA (n)	MSSA (n)	Toplam n (%)
MCY	49	34	83 (41.5)	51	66	117 (58.5)
MTT	47	27	74 (37)	53	73	126 (63)
BioTimer	48	40	88 (44)	52	60	112 (56)
KKA	41	51	92 (46)	59	49	108 (54)

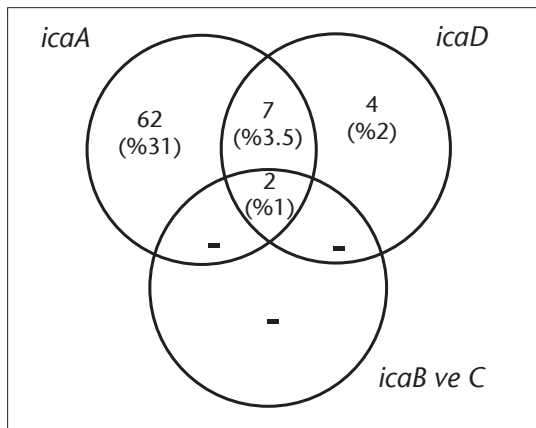
MCY: Modifiye Christensen yöntemi, MTT: MTT yöntemi, BioTimer: BioTimer yöntemi, KKA: Kongo kırmızısı agar, MRSA: Metisiline dirençli *S.aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*.

MTT yöntemine göre izolatların 74 (%37)'ü biyofilm pozitif, 126 (%63)'sü ise biyofilm negatif bulunmuştur (Tablo I). Biyofilm oluşturan bakterilerden 56 (%28)'sü zayıf, 17 (%8.5)'si orta, 1 (%0.5)'i ise kuvvetli derecede biyofilm oluşturmuştur. Biyofilm oluşturan örneklerin 47 (%63.5)'si MRSA, 27 (%36.5)'si MSSA olarak belirlenmiştir. MTT yönteminde MRSA izolatlarının biyofilm oluşturma oranı MSSA izolatlarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p= 0.003$). Kuvvetli ve orta derecede biyofilm oluşturan 17 bakteriden 16'sı MRSA olarak saptanmıştır. Kan ve kateter izolatları ile yara izolatları arasında biyofilm oluşumu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

BioTimer yöntemine göre çalışmaya alınan izolatlardan 88 (%44)'i biyofilm oluştururken, 112 (%56)'sinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Tablo I). Biyofilm pozitif örneklerden 40 (%45.5)'i MSSA iken, 48 (%54.5)'i MRSA olarak belirlenmiştir. Metisiline dirençli izolatların duyarlı izolatlara göre daha yoğun ve kısa sürede biyofilm oluşturduğu görülmüştür ($p= 0.011$). Yara izolatlarının kan izolatlarına göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir ($p= 0.005$).

KKA'da 108 (%54) izolat slime oluşturmazken, 92 (%46) izolatın oluşturduğu görülmüştür (Tablo I). Slime pozitif izolatlardan 51 (%55.4)'inin MSSA, 41 (%44.6)'inin MRSA olduğu tespit edilmiştir. Hem MRSA ve MSSA izolatları hem de kan ve yara izolatları arasında slime oluşumu bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

icaADBC gen bölgelerinin varlığına bakıldığında 71 (%35.5) izolat *icaA*, 13 (%6.5) izolat *icaD*, 2 (%1) izolat *icaB* ve *icaC* pozitifliği görülmüştür. Tek başına *icaA* pozitifliği gösteren bakteri sayısı 62 (%31), hem *icaA* hem de *icaD* gen bölgelerini birlikte içeren bakteri sayısı ise 9 (%4.5) olarak tespit edilmiştir. Her dört gen bölgesini birlikte içeren 2 (%1) bakteri olduğu görülmüştür. Tek başına *icaD* gen bölgesi içeren 4 (%2) izolat tespit edilirken, yalnızca *icaB* veya *icaC* gen bölgelerini bulunduran hiçbir izolat bulunmamıştır (Şekil 1). *icaB* ve *icaC* pozitifliği gösteren her iki izolat da MRSA olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. *Staphylococcus aureus* izolatlarındaki *icaADBC* pozitiflikleri.

MRSA ve MSSA izolatları *icaADBC* operonu barındırma yönünden karşılaştırıldığında metisiline dirençli izolatların duyarlı izolatlara göre anlamlı derecede ve yüksek oranda *ica* gen bölgesi içerdiği gözlenmiştir ($p < 0.05$).

icaADBC pozitifliği bakımından kan-kateter ve yara izolatları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

MCY ile *ica* varlığı karşılaştırıldığında *icaADBC* operonuna ait herhangi bir gen bölgesini bulunduran 75 bakteriden 13 (%17.3)'ünün biyofilm oluşturmadığı, 62 (%82.6)'sinin ise çeşitli derecelerde biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. PCR ile *icaADBC* operonuna ait bir gen bölgesini içeren izolatlarla MCY'ye göre biyofilm oluşturan izolatlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

ica bulundurduğu bilinen 75 bakteriden 19 (%25.3)'ü MTT yönteminde biyofilm oluşturmazken, 56 (%74.7)'si çeşitli derecelerde biyofilm oluşturmuştur. PCR'de *ica* pozitifliği saptanan izolatlar ile MTT yönteminde biyofilm oluşturduğu gözlenen izolatlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0.05$).

BioTimer yönteminde *ica* pozitifliği gösteren 75 izolattan yalnızca 10 (%13.3)'ü biyofilm oluşturmazken, 65 (%86.7) izolat çeşitli derecede biyofilm oluşturmuştur. PCR'de *ica* pozitifliği saptanan izolatlar ile BioTimer yöntemine göre biyofilm oluşturduğu gözlenen izolatlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0.05$).

ica pozitifliği gösteren 75 izolattan 20 (%26.7)'si KKA'da slime oluşturmazken, 55 (%73.3) izolatta slime yapısına rastlanmıştır. PCR'de *ica* pozitifliği saptanan izolatlar ile KKA'da slime oluşturduğu gözlenen izolatlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0.05$).

PCR'de herhangi bir *ica* gen bölgesi varlığı altın standart kabul edilerek tüm konvansiyonel yöntemlerin duyarlılıkları yukarıda bahsedilen sırayla %82.2, %84, %81.6, %68.8; özgüllükleri %81.3, %72, %86.7, %70.7 olarak hesaplanmıştır. En duyarlı yöntemin MTT, en özgül yöntemin BioTimer yöntemi olduğu tespit edilmiştir.

Biyofilm formasyonunun kantitatif değerlendirilmesinde *icaADBC* operonundaki gen bölgelerinden iki ve daha fazlasının birlikte pozitifliğinin oluşan biyofilm yapısını anlamlı derecede kuvvetlendirdiği görülmüştür ($p < 0.05$). Tek bir *ica* lokusu içeren izolatların hiç *ica* içermeyenlere göre anlamlı düzeyde kuvvetli biyofilm oluşturmamasının yanı sıra, iki ve daha fazla *ica* lokusu içeren izolatların da tek bir *ica* pozitifliği gösteren izolatlara göre anlamlı derecede kuvvetli biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Pozitif *ica* gen sayısının artışına paralel olarak biyofilm yapısının da giderek daha kuvvetli pozitiflik verdiği gözlenmiştir.

Yalnız bir *ica* pozitif olan ve birden fazla *ica* pozitifliği gösteren izolatlarda konvansiyonel yöntemlerin biyofilm varlığını tespit edebilme düzeyleri araştırıldığında kullanılan tüm yöntemlerin birden fazla *ica* pozitifliği gösteren izolatlarda anlamlı derecede yüksek pozitiflik verdiği görülmüştür ($p < 0.001$).

TARTIŞMA

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkenleri içerisinde *S.aureus* öne çıkan patojenlerden biridir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkeni olarak *S.aureus*'un Fransa, Almanya ve İtalya'da en sık, Amerika Birleşik Devletleri ve İspanya'da ikinci en sık etken olarak görüldüğü; Kuzey ve Güney Amerika ile Avrupa genelinde ise ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir. Uzak Doğu'da tüm patojenler içerisinde %42.3 ile en sık enfeksiyon etkeni olduğu tespit edilmiştir¹⁵⁻¹⁷.

Hastanede yatan hastalarda intravasküler kateter kullanımı %50-60 oranındadır ve gelişen bakteremilerin yaklaşık %40'ı kateter kaynaklıdır¹⁸. Kateter yüzeyi biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan yüzeye tutunmasını kolaylaştırarak damar içerisinde hızla platelet ve doku proteinleri tarafından kaplanır; bakteriyel yüzey proteinlerinin tutunması artar¹⁹. *S.aureus* kaynaklı bakteremilerde kateter kullanımı etyolojide büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda *S.aureus*'un en sık enfeksiyon etkeni olduğu deri ve yumuşak doku örnekleriyle, biyofilm oluşumunun bir göstergesi olan kateter kültür örnekleri ve çeşitli nedenlerle *S.aureus* bakteremisi olan hastaların kan kültür örnekleri kullanılmıştır.

Kan ve yara izolatları arasında *ica* operonu barındırma yönünden bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Türkiye'de kan ve sağlıklı erişkinlerin el kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda yapılan bir çalışmada iki grup arasında biyofilm oluşumu açısından bir fark saptanmamıştır²⁰. Burun ve kan kültürlerinden izole edilen *S.aureus* izolatlarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir²¹. Özellikle kronik ülseratif lezyonlarda *S.aureus* biyofilmlerinin önemli rolü olduğu, kronik yara ve ülserlerin %88-93.5'inde *S.aureus* ürettiği gösterilmiştir⁴. Bu durum *S.aureus*'un kolaylıkla dissemine olabilme özelliği de göz önünde bulundurulduğunda yara izolatları ile bakteremi etkeni olan izolatların biyofilm oluşturma karakteristiği açısından farklılık göstermemesini açıklamaktadır.

Kullandığımız biyofilm tespit yöntemlerinin tümünde MRSA izolatlarının *ica* bulundurma oranı, oluşturduğu biyofilm miktarı, biyofilm oluşturma süresi ve biyofilm yapısının yoğunluğu MSSA izolatlarına göre yüksek bulunmuştur. Yalnızca KKA'da slime oluşumu bakımından fark görülmemiştir. Bu sonuçlar biyofilm oluşumu-metisilin direnci ilişkisini inceleyen diğer çalışmaları destekler niteliktedir^{22,23}.

MRSA kökenli biyofilm yapılarının daha kalın olmasıyla alt katmanlardaki hücreler ilacın penetrasyon yetersizliğinden dolayı sürekli düşük antibiyotik konsantrasyonuna maruz kalır ve bakterinin direnç kazanma ihtimali artar. Antibiyoterapi sırasında alt katmanlardaki hücrelerin ek biyofilm tabakası geliştirme olasılığı da vardır²². Ayrıca bazı antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarının *ica* ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir²⁴. Stafilokoklarda antibiyotik direnci-biyofilm oluşumu ilişkisi değerlendirildiğinde her iki sistemin de birbirlerini kaskat şeklinde tetiklediği söylenebilir.

ica varlığıyla MCY, MTT ve BioTimer yöntemlerindeki biyofilm pozitifliği arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür. Ayrıca *ica* gen bölgesi sayısı arttıkça oluşan biyofilm

yapısının anlamlı derecede kuvvetlendiği görülmüştür. alışmalar MCY'nin *icaADBC* pozitifliğiyle yüksek korelasyon gösterdiğini; *ica* gen bölgesi sayısı arttıkça oluşan biyofilm yapısının anlamlı derecede kuvvetlendiğini ortaya koymuştur^{9,21,25}.

MTT yönteminde bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin biyofilmdeki canlı bakterilerin dehidrogenaz enzimleriyle formazana indirgenmesi llmektedir¹⁰. PCR'de *ica* pozitifliği altın standart kabul edilerek değerlendirildiğinde en duyarlı biyofilm tespit yönteminin %84 ile MTT yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Literatürde MTT yönteminin biyofilmlerdeki bakteriyel popülasyonun büyüklüğünü belirlemede başarlı, biyofilm inhibisyon deneyleri ve antibakteriyel ajanların etkinliğinin araştırılmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğundan bahsedilmiş ve spektrofotometride ölçülen formazan konsantrasyonuyla bakteri koloni sayısı arasında mkemmел derecede uyum olduğu gsterilmiřtir²⁶.

BioTimer yöntemi bakterileri doğrudan biyofilm yapısının içinde sayan, tekrarlanabilir ve güvenilir ilk yntemdir^{10,12}. Çalışmamızda değerlendirilen yöntemler içerisinde en özgül yöntem olduğu görülmüştür (%86.7). Doğrudan biyofilmdeki canlı hücreler tespit edildiğinden testin yanlış pozitiflik verme olasılığı çok düşüktür. BioTimer yöntemi biyofilm inhibisyon testlerinde ve nano partiküllerin mikrobiyolojik kalitesinin tespitinde kullanılabilme özelliğine sahip; biyofilm formasyonu oluşturmuş bakterileri saymada bir "biyosensör" olarak tanımlanmaktadır. Bakterisit konsantrasyonlarını belirlemekle kalmayıp dirençli bakteri sayısını da gösteren ilk yntemdir²⁷. Gelişmiş teknolojik cihazlara ve sonikasyon gibi işlemlere gereksinim duyulmaması yöntemin avantajları arasındadır²⁸. şimdilik bu yöntemin asıl dezavantajı güvenilirliği, verimliliği ve duyarlılığını referans yöntemlerle karşılaştırma imkanını kısıtlayan geçerli bir referans yönteminin eksikliğidir. Literatürde bizim çalışmamızdaki gibi diğer konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle BioTimer yönteminin uyumunu karşılaştıran yayın bulunmamaktadır.

KKA yönteminin kullanıldığı birçok çalışmada biyofilm ve slime kavramları birbirinin yerine kullanılsa da biyofilm tam tanım olarak matriks içine gömülü çok katlı hücre tabakası anlamına geldiğinden alışmamızda KKA yöntemi ile gözlenen patern biyofilm değil slime yapısı olarak tanımlanmıştır. Kongo kırmızısı bakterilerdeki slime faktörü ile birleşerek koyu bir renk oluřturmaktadır¹⁴. *S.aureus*'un diğer stafilokoklara göre daha yavaş slime ürettiği bilindiğinden çalışmamızda 48. saat okumaları esas alınmıştır^{13,25}. MRSA ve MSSA izolatları slime üretimi yönünden karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamızda iki ayrı gözlemci tarafından ayrı ayrı değerlendirme yapılsa da test sonuçlarının nispeten subjektif yorumlanabilmesi, özellikle MRSA kolonilerinin mor, kahverengi, bordo, koyu ve açık kırmızı gibi karar vermesi g renklerde koloniler oluşturması nedeniyle iki grup arasında bir fark görülmediği düşünülmüştür. MRSA izolatları KKA plağında MSSA izolatlarına göre daha belirsiz ve karar vermesi g koloniler oluşturduğundan yöntemin %13.9 gibi yüksek bir oranda çelişkili sonuçlar verdiğinden bahsedilmiřtir²⁹.

Literatürde yer alan çalışmalar, sonuçlarımızla uyumlu olarak *ica* varlığıyla KKA'daki slime oluşumunun paralelliğini gstermiştir^{13,25}. Her ne kadar slime biyofilm kavramını

tam olarak açıklamasa da moleküler testlerle tanının mümkün olmadığı ve çok basamaklı, özel hazırlık gerektiren yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda KKA yöntemi slime oluşumunu tespit etme bakımından kullanışlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olarak gözükmektedir.

Kullanılan tüm konvansiyonel yöntemlerde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, *ica* negatif olduğu halde biyofilm oluşturduğu gözlenen izolatlar rastlanmıştır. BioTimer ve KKA yöntemlerindeki subjektif yorumlama böyle bir sonuca neden olmuş olabilir; ancak daha muhtemel teori *ica* gen regülasyonu ile açıklanabilir.

Tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'i biyofilm kaynaklıdır ve bu oran nozokomiyal enfeksiyonlarda çok daha yüksektir³. Klinik izolatların saprofitik stafilokoklara göre daha yüksek oranda *ica* gen bölgesi içerdiği de bilindiğinden *ica* varlığının araştırılması virülan-nonvirülan izolatların belirlenmesinde tek başına bile önemli bir belirteçtir^{9,13}. Özellikle hastanede yatan hastalardan alınan örneklerde kültürde kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak tespit edilen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelini belirlemek ve bu bakterilerin girişimsel işlemler öncesinde planktonik formlarını elimine edici girişimlerde bulunmak biyofilm kaynaklı enfeksiyon sayısını, dolayısıyla buna bağlı morbidite ve mortalite oranlarını düşürecektir.

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

TEŞEKKÜR

İzolatların teminindeki yardımları için Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşe Hande Arslan ve Prof. Dr. Özlem Kurt Azap'a, PCR deneyleri başta olmak üzere verdiği tüm destek için TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Jülide Sedef Göçmen'e teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Sudağidan M, Cavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virulans genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(1): 29-39.
2. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3): 603-61.
3. Altun HU, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39: 82-8.
4. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. Virulence 2011; 2(5): 445-59.

5. Diamond-Hernandez B, Solorzano-Santos F, Leanos-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 68.
6. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.
7. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 996-1006.
8. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115(8): 891-9.
9. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(5): 342-51.
10. Saising J, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP, Nega M, Götzt F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(11): 5804-10.
11. Güven N, Kaynak Onurdağ F. İlaç, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 94-105.
12. Pantenella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods* 2008; 75(3): 478-84.
13. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003; 92(1-2): 179-85.
14. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42(8): 872-4.
15. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), pp: 2321-51. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
16. Moet GJ, Jones RN, Biedenbach DJ, Stilwell MG, Fritsche TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(1): 7-13.
17. Ho PL, Chuang SK, Choi YF, Lee RA, Lit ACH, Ng TK, et al. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61(3): 245-50.
18. Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; 9(16): 1-12.
19. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006; 64(4): 313-25.
20. Göçmen JS, Hortaç İştar E, Çökeliler D, Mutlu M, Kaleli Can G, Alparıslan S, et al. Kan ve el kültüründen izole edilen koagülaz-negatif stafilkok izolatlarının biyofilm oluşumunun plazma polimerizasyon tekniği ile kaplanmış mikroplaklarda incelenmesi: deneysel model. *FLORA* 2017; 22(4): 166-74.
21. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191(2): 101-6.
22. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 28(5): 1-9.
23. Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 2011; 79(3): 1153-65.

24. Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL, Xia PY. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(6): 2707-11.
25. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2151-6.
26. Traba C, Liang JF. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling* 2011; 27(7): 763-72.
27. Welch K, Cai Y, Stromme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. *J Funct Biomater* 2012; 3(2): 418-31.
28. Kaynak Onurdağ F, Ozgen S, Abbasoğlu U, Gürcan IS. *Candida* türlerinin biyofilm oluşturan ve planktonik formlarının antifungal ajanlara karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(4): 619-31.
29. Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicilin-resistant and methicilin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(3): 375-9.