

Gentamisin Etkisi Altındaki *Staphylococcus aureus* Suşlarının Biyofilm ve Koagülaz Yanıtları ile Mikroçevre İlişkisinin Değerlendirilmesi*

Evaluation of the Relationship Between Microenvironment and Biofilm and Coagulase Responses of *Staphylococcus aureus* Strains Under the Effect of Gentamicin

Nevcivan GÜLDAŞ¹, Vahide BAYRAKAL², İ. Hakkı BAHAR²

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Research Laboratory, İzmir, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma, 27. ANKEM Kongresi (25-29 Nisan 2012, Dalaman)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 04.06.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.07.2012

ÖZET

Staphylococcus aureus suşlarının neden olduğu enfeksiyonların görülme sıklığı ve buna bağlı olarak antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Bu nedenle hem hastane hem de toplum kaynaklı *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi problemler yaşanmaktadır. Bu çalışmada, gentamisinin MLK ve sub-MLK dilüsyonlarının *S.aureus*'un virülans faktörlerinden biyofilm ve koagülaz oluşumuna etkisinin in vitro olarak ve hücre kültür ortamında belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya standart *S.aureus* ATCC 25923 suşu ile kan kültürlerinden izole edilen iki klinik *S.aureus* suşu (K1 ve K2) alınmış; suşların gentamisin MLK değerleri CLSI standartlarına uygun olarak katyon ilaveli Mueller Hinton buyyonunda mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Her suş için gentamisin MLK, %50 MLK ve %25 MLK değerleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Belirlenen MLK yoğunluklarında suşların biyofilm oluşturma özelliği, kristal viyole boyama yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptanmış; koagülaz aktiviteleri ise tüpte değerlendirilmiştir. İnsan kökenli epitelyal hücre kültürleri olan HEp-2 hücre dizileri, standart ve klinik *S.aureus* suşları ile enfekte edildikten sonra (Multiplicity of infection: 50/1) iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Enfekte edilen hücre dizilerine her suş için ayrı ayrı belirlenen gentamisin MLK, %50 MLK ve %25 MLK yoğunlukları eklenecek 18 saat inkübe edilmiş; daha sonra hücreler distile su ile patlatılarak açığa çıkan bakterilerin biyofilm ve koagülaz üretimleri değerlendirilmiştir. Suşların hücre ile karşılaşmadan önceki ve sonraki biyofilm oluşumları değerlendirildiğinde *S.aureus* ATCC 25923 ve K1 suşlarında bir değişiklik gözlenmezken, K2

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Nevcivan Gültaş, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarı, 35340 Inciraltı, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 2222, **E-posta (E-mail):** nevcivanguldas@gmail.com

suşunda MK etkisinde sadece hücre ile karşılaştıktan sonra biyofilm oluşumunun meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı şekilde koagülaz yanıtları değerlendirildiğinde, K2 suşunda hücre ile karşılaştıktan sonra koagülaz üretiminin baskılandığı gözlenmiştir. Bu bulgular bakterinin biyofilm oluşumu, koagülaz üretimi gibi fenotipik özelliklerinin mikroçevreye uyum sürecinde değişebildiğine işaret etmektedir. Farklı antibiyotik kombinasyonları ve farklı hücre dizileri ile tasarlanacak olan ileri deneysel modeller, bu fenotipik değişikliklerin nedeni ve zamanlaması hakkında bilgi verecek ve yeni tedavi politikalarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; biyofilm; koagülaz; gentamisin; hücre kültürü.

ABSTRACT

The frequency of infections caused by *Staphylococcus aureus* strains and the rate of antibiotic resistance among these strains are gradually increasing. Accordingly, serious problems emerge in the treatment of community or hospital acquired *S.aureus* infections. This study was aimed to determine the role of MIC and sub-MIC concentrations of gentamicin on biofilm and coagulase forming effects of *S.aureus* in in vitro test systems and cell cultures. A standard *S.aureus* ATCC 25923 strain and two clinical *S.aureus* strains isolated from blood cultures (C1 and C2) were included in the study. Gentamicin MIC values of the strains were determined with microdilution method at the cation-adjusted Mueller Hinton broth according to CLSI standards. For each strain, MIC, 50% MIC and 25% MIC values of gentamicin were determined separately. At the determined MIC values, biofilm formations of strains were determined with crystal violet method spectrophotometrically. Also, coagulase activities of the strains were evaluated in glass tubes. Human origin epithelial cell cultures namely HEp-2 cell lines, were infected with the standard and clinical *S.aureus* strains (Multiplicity of infection: 50/1) and left for incubation for two hours. After all, MIC, 50% MIC and 25% MIC values of gentamicin, were added to infected cell lines and incubated for 18 hours. Cells were blown up with distilled water and then bacteria were collected. Biofilm formation and coagulase production of these bacteria were evaluated. When *S.aureus* ATCC 25923 strain and C1 strains' biofilm formation was evaluated before (in vitro) and after incubation in cell culture, no difference was observed. However in C2 strain, under the effect of MIC level gentamicin, biofilm formation was occurred after interaction with the cell. In the same way, when coagulase responses were evaluated, after interaction with the cell, coagulase production of C2 strain was inhibited. These results indicated that, phenotypic characteristics such as biofilm formation and coagulase production might change during the process of bacterial adaptation to microenvironment. Further advanced experimental modelling designed with different combinations of antibiotics and different cell lines may provide data about the causes and timing of these phenotypic changes and shed light on the development of new treatment policies.

Key words: *Staphylococcus aureus*; biofilm; coagulase; gentamicin; cell culture.

GİRİŞ

İnsanlarda epitelyal yüzeylere kolonize olan stafilokok türlerinden özellikle *Staphylococcus aureus* sepsis, nekrotizan pnömoni, toksik şok sendromu, deri ve mukoza enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Protein A, "clumping" faktör gibi hücre yüzeyi virülans faktörleri, ekzotoksinleri ve enzimleri olan *S.aureus*'un primer virülans faktörü biyofilm oluşturmalarıdır^{1,2}. Biyofilm yapısı; mikroorganizma, ekzopolisakkarit ve biyotik-abiyotik tutunma yüzeyi olmak üzere üç bileşenden oluşur ve mikroorganizmaların bir üreme şekli olarak tanımlanır. Bakterinin tutunmasında, anti-

biyotik direncinde, fagositozun önlenmesinde ve relapslarda biyofilm yapısının önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir^{3,4}. Stafilokok türlerinin patojenitesinin gösterilmesinde standart bir belirleyici olan koagülaz enzimi ise, "Coagulase-Reacting Factor (CRF)" ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. Bakteri yüzeyinin fibrin ile kaplanmasını sağlayan koagülaz enziminin, fagositozun önlenmesinde etkin olduğu düşünülmektedir⁵.

Kronik bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotiklerin sub-minimum inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'de biyofilm oluşumunu indüklediği gösterilmiştir⁶. Bu çalışmada, gentamisin MİK ve sub-MİK dilüsyonlarının *S.aureus*'un virülans faktörlerinden biyofilm ve koagülaz oluşumuna etkisinin in vitro olarak ve hücre kültür ortamında belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen iki klinik *S.aureus* (K1 ve K2) suşu ile standart ATCC 25923 *S.aureus* suşu kullanıldı.

Mikrodilüsyon Yöntemi

Her suş için gentamisinin MİK değerleri, mikrodilüsyon yöntemiyle katyon eklenmiş Mueller Hinton buyyon (MHB) besiyeri kullanılarak saptandı. Bakteri süspansiyonu, McFarland 0.5 (1.5×10^8 hücre/ml) bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı. ELISA mikropiplerindeki kuyucuklara önce eşit miktarlarda MHB besiyeri, daha sonra gentamisinin iki kat dilüsyonları ve son olarak da bakteri süspansiyonları dağıtıldı. Plaklar 18 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi^{7,8}.

Hücre Kültürü Yöntemi

Çalışmada, insan kökenli epitelyal hücre dizileri olan HEp-2 hücre kültürleri kullanıldı. HEp-2 hücre dizisi, %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin eklenmiş RPMI 1640 besiyeri içinde %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. Tek tabaka olarak çoğaltılan hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı; antibiyotik içermeyen hücre kültürü vasatı kullanılarak santrifüj ve süspanse edildi. Hücre süspansiyonu daha sonra 96 kuyucuklu mikropipleri %80 yoğunlukta (8×10^4 hücre/kuyucuk) kaplayacak şekilde dağıtıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı.

Enfeksiyon Modeli

İki klinik ve bir standart *S.aureus* suşu McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlandıktan sonra, MOI (multiplicity of infection) 50:1 olacak şekilde sulandırılarak, antibiyotik içermeyen RPMI 1640 besiyerinde inkübe edilen hücrelere eşit oranlarda dağıtıldı. Hücreler bakteri süspansiyonları ile 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra hücre içine girme-

yen bakterileri ortamdan uzaklaştırmak için fosfatlı tampon (PBS) ile üç kez yıkama yapıldı⁹.

Enfekte hücrelere, gentamisinin her suş için farklı olarak belirlenen MİK, %50 MİK ve %25 MİK yoğunlukları eklenerek 18 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler distile su ile patlatılıp, hücre dışına çıkan bakteriler santrifüj edilerek toplandı. Bu şekilde elde edilen bakterilerin koagülaz yanıtları ve biyofilm oluşturma özellikleri değerlendirildi.

Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

Suşların MİK'lerinin belirlendiği ELISA plaklarında biyofilm değerlendirmesi kristal viyole boyama yöntemi ile yapıldı¹⁰. Plakların içeriği boşaltılıp tutunamayan bakterileri uzaklaştırmak için üç kez PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa eşit miktarlarda %1'lik kristal viyole boyası dağıtıldı. Daha sonra plaklar 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bağlanmayan kristal viyole boyası üç kez distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra bu kez kuyucuklara %95'lik etanol dağıtıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plaklar, 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve besiyeri absorbansının iki kat olarak belirlendiği çukurlar, biyofilm oluşumu yönünden pozitif kabul edildi. Aynı biyofilm değerlendirmesi, enfeksiyon modeli sonunda elde edilen bakteriler için de yapıldı.

Koagülaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Koagülaz aktivitesi, gentamisinin her suş için belirlenen MİK ve sub-MİK değerleri ile karşılaşmış in vitro ortamdaki ve hücreden izole edilen bakteri süspansiyonları için tüpte koagülaz yöntemi ile ayrı ayrı değerlendirildi¹¹.

BULGULAR

Çalışmamızda, *S.aureus* ATCC 25923 suşu için gentamisin MİK değeri 4 µg/ml olarak saptanmıştır. Klinik *S.aureus* (K1 ve K2) suşları için MİK değerleri ise sırasıyla 64 µg/ml ve 32 µg/ml olarak tespit edilmiş ve bu suşların gentamisine dirençli oldukları izlenmiştir.

Gentamisinin her suş için ayrı ayrı belirlenen MİK, %50 MİK ve %25 MİK değerleri etkisinde değerlendirilen suşlardan *S.aureus* ATCC 25923 ve K1 suşlarının tüm dilüsyonlarda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. K2 suşunda ise %50 MİK ve %25 MİK değerlerinde biyofilm oluşumu belirlenirken, MİK değerinde biyofilm oluşumu saptanmamıştır (Tablo I). Gentamisinin çalışılan tüm dilüsyonlarında *S.aureus* ATCC 25923 suşunun koagülaz üretimi baskılanırken, K2 suşunda bu enzimin üretiminin devam ettiği görülmüştür. Bunlardan farklı olarak K1 suşunda koagülaz üretiminin sadece gentamisinin MİK değerinde baskılandığı, diğer dilüsyonlarda ise koagülaz üretiminin devam ettiği bulunmuştur (Tablo II).

Enfeksiyon modeli çalışması sonunda Hep-2 hücre dizilerinden izole edilen suşların biyofilm oluşumları tekrar değerlendirildiğinde; gentamisinin tüm dilüsyonlarında her üç

Tablo I. Gentamisinin MİK ve sub-MİK Değerleri Etkisinde *S.aureus* Suşlarının Biyofilm Yanıtları

	Gentamisin			Kontrol*
	MİK	%50 MİK	%25 MİK	
<i>In vitro biyofilm değerlendirmesi</i>				
ATCC 25923	+	+	+	+
K1	+	+	+	+
K2	-	+	+	+
<i>HEp-2 hücresinden izole edilen suşların biyofilm değerlendirmesi</i>				
ATCC 25923	+	+	+	+
K1	+	+	+	+
K2	+	+	+	+

* Kontrol: Antibiyotik uygulanmamış bakteri süspansiyonu.

Tablo II. Gentamisinin MİK ve sub-MİK Değerleri Etkisinde *S.aureus* Suşlarının Koagülaz Yanıtları

Gentamisin	MİK	%50 MİK	%25 MİK	Kontrol*
<i>In vitro</i> koagülaz yanıtlarının değerlendirilmesi				
ATCC	-	-	-	+
K1	-	+	+	+
K2	+	+	+	+
<i>HEp-2</i> hücresinden izole edilen suşların koagülaz yanıtlarının değerlendirilmesi				
ATCC	-	-	-	+
K1	+	+	+	+
K2	-	-	-	+

* Kontrol: Antibiyotik uygulanmamış bakteri süspansiyonu.

suşun biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo I). Koagülaz yanıtları değerlendirildiğinde, *S.aureus* ATCC 25923 ve K2 suşlarında enzim üretiminin baskılandığı, K1 suşunda ise enzim üretiminin devam ettiği saptanmıştır (Tablo II).

TARTIŞMA

Tüm dünyada hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen etkenlerden biri olan *S.aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit ve pnömoni gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır¹². Biyofilm oluşumu ve koagülaz enzimi, *S.aureus*'un önemli virülans faktörlerinden olup patojenitede etkin rol oynamaktadır¹³. Bakterilerin mikroçevreye uyumları sırasında fenotipik ve genotipik olarak farklılaşıp daha patojen hale geldiği birçok çalışmada gösterilmiştir^{4,13}. Endokardit, osteomyelit, deri ve implant enfeksiyonlarının persistan hale gelmesinde önemli bir rolü olduğu bilinen biyofilm yapılarındaki bakterilerin, serbest olanlara kıyasla antibiyotiklere karşı 10-1000 kat daha dirençli olduğu vurgulanmaktadır¹.

Hoffman ve arkadaşları⁶ aminoglikozidlerin sub-MLK konsantrasyonlarının gram-negatif bakterilerden *P.aeruginosa* ve *E.coli*'de biyofilm oluşumunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada *S.aureus* ATCC 25923 ve K1 suşlarında gentamisin tüm dilüsyonlarının (MLK, %50 MLK ve %25 MLK) etkisinde biyofilm oluşumunun görülmesi, gentamisin gram-pozitif bakteri grubunda da suşa bağlı olarak biyofilm oluşumunu baskılayamadığını düşündürmüştür. K2 suşunda ise bu etkinin sadece gentamisin %50 MLK ve %25 MLK değerlerinde olduğu, buna karşın MLK değerinde biyofilm oluşumunun baskılanabildiği görülmüştür.

HEp-2 hücre dizilerinden izole edilen suşların biyofilm oluşumları değerlendirildiğinde; gentamisin tüm MLK ve sub-MLK değerlerinde her üç suşın da biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Özellikle K2 suşu için MLK değerinde biyofilm oluşumunun baskılanmaması, bakterinin virülansında mikroçevrenin önemini göstermektedir⁹. K2 suşunun canlı bir sistemde biyofilm oluşturması, hücrelerin canlı kalabilmesi için oluşturulan mikroçevrenin zenginliği (büyüme faktörleri, vitaminler vb.) ve pH gibi faktörlerin, suşun ekzopozisyon üretimini artırdığını düşündürmektedir.

S.aureus ATCC 25923 suşunun koagülaz üretimi in vitro ve HEp-2 hücrelerinden izole edildikten sonra değerlendirildiğinde, enzim üretiminin gentamisin tüm dilüsyonları etkisinde baskılandığı görülmüştür. K1 suşunun koagülaz üretimi sadece in vitro koşullarda MLK değerinde baskılanırken, HEp-2 hücresi ile karşılaştıktan sonra bunun ortadan kalktığı dikkati çekmektedir. K2 suşunda ise bu baskılanma HEp-2 hücrelerinden izole edildikten sonra tüm dilüsyonlarda saptanmıştır. Gentamisin koagülaz üretimini baskılayıcı etkisinin K2 suşunda hücre ile karşılaştıktan sonra daha etkin olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, biyofilm ve koagülaz özelliklerine göre fenotipik olarak aynı olduğu düşünülen suşların, gentamisin farklı dilüsyonlarında fenotipik özelliklerinin değişebileceği belirlenmiştir. Bu bulgular, bakterinin mikroçevreye uyum sürecinde biyofilm oluşturarak fenotipik özelliklerini (enzim ve toksin üretimi gibi) değiştirebildiğine işaret etmektedir. Benzer şekilde Hoiby ve arkadaşları¹⁴, *P.aeruginosa*'nın virülans faktörlerinin hepsini her zaman eksprese etmediğini ve bu değişkenliğin en önemli göstergesinin, yeni mikroçevreye adapte olma yetenekleri olduğunu göstermişlerdir.

Son zamanlarda stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde artan direnç problemi nedeni ile tigesiklin, daptomisin, linezolid gibi yeni antibiyotiklerin kullanımı ve kombinasyon tedavileri gündeme gelmiştir¹⁵. McConeghy ve arkadaşları¹⁶, biyofilm oluşturan stafilokok suşları üzerinde tigesiklin-gentamisin kombinasyonunun etkinliğini araştırmışlar; bu kombinasyonun tek başına tigesiklin tedavisine göre suşlar üzerinde daha etkili olduğunu saptamışlardır. Buna karşın araştırmacılar, gentamisin monoterapisinin, tigesiklin kombinasyonundan daha etkin olduğunu göstermişlerdir¹⁷. Biyofilm oluşumunun enfeksiyonların tedavisinde zorluklara yol açması nedeniyle antibiyotiklerin tek başına ya da ikinci bir antibiyotikle kombinasyonunun etkinliğinin sorgulanmasının yanı sıra enfeksiyonun başlangıcında biyofilm oluşumunun engellenmesine yönelik antibiyofilm ajanlar ile alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Tran ve arkadaşları¹⁷, bir antibi-

yofilm ajan olan seleno-siyano-diasetik asit (SCAA) kaplı hemodiyaliz kateterlerinde *S.aureus*'un biofilm oluşumunun inhibe edilebildiğini ve organoselenyumun biyofilm oluşumunun engellenmesinde mevcut antimikrobiyal ajanlara göre çok daha etkili olduğu göstermişlerdir.

Kombinasyon tedavileri antibiyotiklerin etki mekanizmalarına, etken suşun virülans faktörlerine, enfeksiyonun evresine ve bölgesine göre farklılık gösterir. Bu durum göz önünde bulundurularak, yeni tedavi politikalarının geliştirilebileceği farklı kombinasyonlar ve antibiyofilm ajanlar ile deneysel modeller tasarlanıp etkinliği araştırılabilir. Ayrıca enfeksiyon sürecinde, etkenin mikroçevreye uyumunda biyofilm oluşumu ve koagülaz üretimi gibi fenotipik özelliklerini değiştirebilmesi, tedavide güçlükler neden olmaktadır. Bu nedenle bu değişikliklerin nedenlerinin ve zamanlamalarının kinetik çalışmalarla (antibiyotik yoğunluklarının zaman içindeki doz/yanıt özelliklerinin karşılaştırılabilmesi için) belirlenmesi, enfeksiyon patogenezinin aydınlatılmasına, buna bağlı olarak tedavinin düzenlenmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yarwood JM, Schliever PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. J Clin Invest 2003; 112(11): 1620-3.
2. Brady RA, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. Infect Immun 2011; 79(4): 1797-803.
3. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve yabancı cisim enfeksiyonları. Klimik Derg 2008; 21(3): 79-86.
4. Hill KE, Malic S, McKee R, et al. An in vitro model of chronic wound biofilms to test wound dressings and assess antimicrobial susceptibilities. J Antimicrob Chemother 2010; 65(6): 1195-206.
5. Bannerman TL. Staphylococci and other catalase positive cocci that grow aerobically, pp: 384-404. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
6. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacteria biofilm formation. Nature 2005; 436(7054): 1171-5.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Sixteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S16, 2006. CLSI, Wayne, PA.
8. Baskin H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Int J Antimicrob Agents 2002; 19(1): 79 -82.
9. Bayrakal V, Baskin H, Bahar İH. Deneysel mikroçevre modelleme çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*'nın farklı hücre dizilerinde çoğunluğu algılama ve biyofilm yanıtları. Türkiye Klinikleri Derg 2009; 29(3): 637-41.
10. Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, et al. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2006; 28(Suppl 1): 21-5.
11. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, s: 452-3. 1992, 1. Baskı. Barış Yayınları Tıp Fakülteleri Kitabevi, İzmir.
12. Sudağlıdan M, Çavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virülans genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(1): 29-39.
13. Bayrakal V, Doğan Y, Baskin H, Bahar İH. Gentamisine duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında gentamisin biyofilm ve koagülaz oluşumuna etkisi. ANKEM 2007; 21(3): 175-8.
14. Hoiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. Microbes Infect 2001; 3(1): 23-35.

15. Altun HU, Sancak B. *Staphylococcus aureus*'un tedavisinde yeni antibiyotikler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40(2): 63-74.
16. McConeghy KW, LaPlante KL. In vitro activity of tigecycline in combination with gentamicin against biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. Diag Microbiol Infect Dis 2010; 68(1): 1-6.
17. Tran PL, Lowry N, Campbell T, et al. An organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheters in vivo. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(2): 972-8.