

Stafilokok İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması*

Investigation of Biofilm Formation Properties of Staphylococcus Isolates

Duygu Nilüfer ÖCAL¹, İftar DOLAPÇI², Zeynep Ceren KARAHAN², Alper TEKELİ²

¹ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

¹ Ministry of Health Diskapi Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri'nde (18-20 Nisan 2014, İstanbul) poster bildiri olarak sunulmuş ve ikincilik ödülüne layık görülmüştür.

Geliş Tarihi (Received): 01.09.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.01.2017

ÖZ

Biyofilm üretimi, stafilokların tıbbi cihazlara yapışmasını sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm temel bileşenini oluşturan madde olan polisakkarit yapıdan oluşan interselüler adezin (PIA), bakteriyel kromozom üzerinde bulunan *ica* operonu tarafından kodlanan bir enzim (N-asetilglukozamin transferaz) tarafından sentezlenen beta-1,6-N-asetilglukozamin polimerlerinden oluşmaktadır. *ica* operonu dört gen (A, B, C ve D) ve transpoze olabilen IS256'yı içermektedir. Bu çalışmada; farklı türlere ait invaziv ve invaziv olmayan stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri arasında fark olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Stafilokok izolatlarının (n= 166) biyofilm oluşturma özelliği Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyerinde fenotipik olarak değerlendirilmiştir; *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Stafilokok izolatlarının %44.6 (74)'sı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), %15.1 (25)'i metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), %37.3 (25)'ü *Staphylococcus hominis*, %12 (20)'si *Staphylococcus epidermidis*, %15 (10)'i *Staphylococcus haemolyticus*, %13.4 (9)'ü *Staphylococcus capitis*, %3 (2)'ü *Staphylococcus saprophyticus* ve %1.5 (1)'i *Staphylococcus warnerii* olarak tiplendirilmiştir. MRSA izolatlarının 52'si kan, 22'si burun; MSSA izolatlarının ise tümü burun kültürlerinden izole edilmiştir. Koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) burun, santral venöz kateter ucu, kateteri olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen invaziv olan ve invaziv olmayan izolatlardan oluşmuştur. Çalışmamızda KNS ve *S.aureus* izolatlarının KKA besiyerinde biyofilm oluşturma oranları arasında anlamlı fark saptanırken (sırasıyla %40.3; %85.8, $p < 0.001$), PCR ile de *S.aureus* izolatlarının araştırılan her üç geni de taşıma oranları KNS'lere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (sırasıyla %78.8; %11.9, $p < 0.001$). Ayrıca invaziv izolatların invaziv olmayan izolatlara göre hem KKA besiyeri yönteminde

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Duygu Nilüfer Öcal, Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Şehit Ömer Halisdemir Caddesi 06110 Dışkapı, Ankara, Türkiye
Tel (Phone): +90 312 596 2671, E-posta (E-mail): drduygunil@hotmail.com

biyofilm oluşturma, hem de araştırılan her üç geni birlikte taşıma oranlarının yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). İnvaziv olan örneklerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin yüksekliğinin tedavisi güç enfeksiyonlara yol açabileceği, taşıyıcılığın ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesi açısından da bu izolatların yayılımının önüne geçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca stafilokoklarda biyofilm oluşumunun gösterilmesinde fenotipik ve genotipik testlerin birlikte kullanılmasının daha uygun olacağını önermekteyiz.

Anahtar sözcükler: *Biyofilm; Staphylococcus aureus; koagülaz-negatif stafilokok; Kongo kırmızısı agar; PCR.*

ABSTRACT

Biofilm production is an important virulence factor which allows staphylococci to adhere to medical devices. The principal component of biofilm is a "polysaccharide intercellular adhesion (PIA)" which is composed of a beta-1,6-N-acetylglucosamine polymer synthesized by an enzyme (N-acetylglucosamine transferase) encoded by the *ica* operon found on the bacterial chromosome. This operon is composed of four genes (A, B, C, and D), and a transposable element IS256. In this study, we aimed to determine the biofilm production characteristics of invasive/non-invasive staphylococcus isolates and different staphylococcus species. Biofilm production of 166 staphylococci was phenotypically investigated on Congo Red Agar (CRA); the presence of *icaA*, *icaD* and IS256 genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR). 74 of the isolates (44.6%) were identified as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 25 (15.1%) as methicillin sensitive *S.aureus* (MSSA), 25 (37.3%) as *Staphylococcus hominis*, 20 (12%) as *S.epidermidis*, ten (15%) as *Staphylococcus haemolyticus*, nine (13.4%) as *Staphylococcus capitis*, two (3%) *Staphylococcus saprophyticus* and one (1.5%) as *Staphylococcus warnerii*. Of the MRSA strains, 52 were isolated from blood and 22 from nose; all MSSA strains were isolated from nose cultures. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) strains were composed of invasive and non-invasive strains isolated from nose, catheter tip and blood cultures from patients with catheter. Production with CRA method was found to be statistically significant in invasive isolates ($p < 0.001$). It is concluded that; as the biofilm formation capacity of invasive isolates can cause refractory infections and the importance of carriage and hospital infections of these bacteria, it is important to prevent the spread of these isolates. A combination of phenotypic and genotypic tests is recommended for the investigation of biofilm formation in staphylococci. 40.3% of the CoNS isolates, and 85.8% of *S.aureus* isolates produced biofilm on CRA ($p < 0.001$) and with PCR method the ratio of carrying three genes was found to be statistically important in *S.aureus* when compared with CoNS. Carriage of three genes and biofilm formation capacity of invasive isolates can cause refractory infections and the importance of carriage and hospital infections of these bacteria, it is important to prevent the spread of these isolates. A combination of phenotypic and genotypic tests is recommended for the investigation of biofilm formation in staphylococci.

Keywords: *Biofilm; Staphylococcus aureus; coagulase-negative staphylococci; Congo red agar; PCR.*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus ve *Staphylococcus epidermidis*'i de içeren koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) sağlıklı kişilerin deri ve burun mukozasında bulunabilen ve ciddi invaziv enfeksiyonlara yol açabilen türlerdir. Günümüzde özellikle kateter ve benzeri kalıcı cihaz kullanımıyla ilişkili nozokomiyal enfeksiyonlarda etken olarak sıklıkla karşımıza çıkmakta ve konağın bağışık yanıtına da bağlı olarak, lokal ya da sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir¹⁻⁴. Zaman zaman ölümcül seyredebilen bu enfeksiyonların oluşumunda rol oynayan mikroorganizma virülans faktörleri arasında biyofilm oluşumu ilk sıralarda yer almaktadır⁴⁻⁸.

Stafilokoklarda biyofilm oluşumu; bakterinin polimer yüzeye tutunmasını takiben “polisakkarit interselüler adezin (PİA)” adı verilen bir hücre dışı polisakkarit üretimini ve bu oluşumun içerisinde hücre çoğalması aşamalarını içermektedir. PİA üretimi *ica* operon bölgesinde bulunan *icaA*, *icaD*, *icaB* ve *icaC* genlerinin kontrolündedir. Beta-1,6 bağlı lineer glikozaminoglikan yapıda olan PİA, in vitro olarak UDP-N-asetilglikozaminden “N-asetilglikozamin transferaz” enzimiyle sentezlenir. Bu enzim operonun *icaA* bölgesinde kodlanmaktadır. Ancak tek başına *icaA* ekspresyonunun enzimatik aktivitesinin düşük olduğu ve PİA üretimi için özellikle *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin ko-ekspresyonlarının gerekli olduğu gösterilmiştir^{1,4,9,10}. Stafilokok biyofilmlerin PİA dışında DNA ve protein de içerdiğini gösteren önceki çalışmalara dayanarak, PİA dışı yapısal elemanların stafilokok-hücre ölümüne bağlı olduğu ve bu aşamada pek çok başka genin de yer aldığı bilinmektedir. Ancak vahşi tip suşlara kıyasla *icaA* taşımayan mutantların in vivo olarak patojenitesindeki azalmanın gösterilmesiyle, biyofilme bağlı patogeneze PİA'nın katkısının büyük olduğu düşünülmektedir⁴. *ica* operon bölgesinin faz varyasyonuna gitmesine ve biyofilm oluşturan izolatların biyofilm oluşturmayan izolatlara dönmesine (ya da tam tersi) yol açan aktif hareketli bir genetik eleman olan IS256 bölgesi de, *ica* genlerinin ekspresyonunu kontrol eden bölge olarak tanımlanmaktadır¹⁰.

Biyofilm oluşturan bakteri enfeksiyonlarında, antibiyotiklerin mikroorganizmaya ulaşmaması ve bu yapı içerisinde bakterilerin bağışık yanıtta da etkilenmemesi nedeniyle tedavinin güç olduğu bilinmektedir¹¹. İmplant cihazlara bağlı gelişen enfeksiyonlarda metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA)'ların duyarlı olanlara göre daha fazla izole edildiğini¹¹ ya da *ica* operonunun toplum kaynaklı *S.epidermidis*'lerde bulunmadığını gösteren çalışmalardan¹² yola çıkarak çalışmamızda farklı türlere ait stafilokoklarda biyofilm oluşturma özellikleri araştırılarak, invaziv olan/olmayan izolatların ve farklı stafilokok türlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri arasında fark olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Toplanması ve Tiplendirilmesi

Çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, 2002-2014 yılları arasında izole edilen *S.aureus* izolatlarından randomize olarak seçilen 74 (%44.6) MRSA, 25 (%15.1) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ve 2012-2014 yılları arasında izole edilen 67 (%40.4) KNS [48 (%72) metisilin dirençli, 19 (%28) metisilin duyarlı] olmak üzere toplam 166 izolat değerlendirildi. MRSA'ların 52'si (%31.3) kan dolaşım enfeksiyonu (KDE) etkeni olarak, geri kalan 22'si (%13.3) ve tüm MSSA'lar burundan izole edildi. KNS'ler perifer kanda üremenin olup olmasına göre kateter kolonizasyonu (n= 24, %14.5) ve kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu (KİKDE) etkeni (n= 20, %12) olanlar ve hastane çalışanlarının burunlarından elde edilen izolatlar (n= 23, %13.9) olarak ayrıldı.

İzolatların tiplendirilmesi konvansiyonel yöntemler ve Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile yapıldı. KİKDE ile KDE etkenleri (n= 72, %43.4) invaziv, kateter kolonizasyonu ve burundan izole edilen KNS'ler (n= 94, %56.6) invaziv olmayan izolatlar olarak tanımlandı (Tablo I).

Tablo 1. Stafilokok Türlerinin İzole Edildikleri Bölgelere Göre Dağılımı

İzolatlar	İnvaziv izolatlar					
	KİKDE etkeni			İnvaziv olmayan izolatlar		
	KDE etkeni n (%)	Kateter n (%)	Kateterli hastanın periferik kanı n (%)	Kateter (kolonizan) n (%)	Burun n (%)	Toplam n (%)
<i>S.aureus</i>	52 (31.3)	-	-	-	47 (28.3)	99 (59.6)
<i>S.epidermidis</i>	-	5 (3)	5 (3)	9 (5.4)	1 (0.6)	20 (12)
<i>S.haemolyticus</i>	-	3 (1.8)	3 (1.8)	4 (2.4)	-	10 (6)
<i>S.hominis</i>	-	2 (1.2)	2 (1.2)	10 (6)	11 (6.6)	25 (15.1)
<i>S.capitis</i>	-	-	-	1 (0.6)	8 (4.8)	9 (5.4)
<i>S.saprophyticus</i>	-	-	-	-	2 (1.2)	2 (1.2)
<i>S.warnerii</i>	-	-	-	-	1 (0.6)	1 (0.6)
Toplam	52 (31.3)	10 (6)	10 (6)	24 (14.5)	70 (42.2)	166 (100)

KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu, KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu.
Yüzdeler toplam izolat sayıları üzerinden hesaplanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu

Bakterilerin koyun kanlı agar besiyerinde bir gecelik kültürünü takiben koloniler 3U lizostafin (Applichem, Almanya) içeren 100 µl lizis solüsyonu (20 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) içerisine toplandı, 37°C'de 4 saat bekletildikten sonra üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyon kiti (Fermentas, Lituanya) kullanılarak DNA'ları ekstrakte edildi. Elde edilen DNA'lar -20°C'de saklandı.

Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Kongo Kırmızısı Agar (KKA) ile fenotipik tespit: Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyeri; beyin kalp infüzyon buyyonu (37 g/L), sükröz (50 g/L), agar (10 g/L) ve Kongo kırmızısı boyası (0.8 g/L) ile hazırlandı. Besiyerine konulacak Kongo kırmızısı boyası, yoğunlaştırılmış sıvı solüsyon şeklinde ayrı olarak hazırlanarak 121°C'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 55°C'ye kadar soğuduktan sonra Kongo kırmızısı boyası solüsyonu eklendi. Hazırlanan besiyeri ertesi gün taze olarak kullanıldı¹³.

Her plak besiyerine en az bir pozitif, bir negatif kontrol ekimi yapıldı, pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 25923 ve *S.epidermidis* ATCC 35984; negatif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213 suşları kullanıldı. KKA besiyerine ekim için kullanılan birinci yöntemde tek koloni ekimi yapılırken, ikinci yöntemde seçilen koloniler 5 ml fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edildikten sonra 20 µl'si damlatma yöntemi ile plak üzerine aktarıldı. 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında plaklar değerlendirilerek, oda sıcaklığında 24 saat daha bekletilmiş ve 48. saatte yeniden değerlendirilme yapıldı. Değerlendirme iki ayrı araştırmacı tarafından, birbirinden bağımsız olarak yapılmıştır. Kuru kristal kıvamında koyu kırmızı-siyah renkli koloni oluşturanlar "slime-pozitif"; açık pembe-kırmızı ya da bordo renkte koloni oluşturanlar "slime-negatif" olarak yorumlandı. Slime faktörü oluşturmayan izolatların nadiren gösterdiği boğa gözü görünümü olarak tarif edilen, ortalarında siyahlaşma gösteren pembe renkli koloniler negatif olarak kabul edildi¹³.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile biyofilm genlerinin gösterilmesi: *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin varlığını gösterebilmek için literatürde daha önce tanımlandı, primer dizileri ile PCR yöntemi kullanıldı, reaksiyon koşulları Vasudevan ve Montanero'nun yöntemi modifiye edilerek uygulandı^{14,15}.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi Ki-kare ve Fisher's exact testleri kullanılarak yapıldı. İki yöntemin sınıflanmış değerleri arasındaki uyumu araştırırken Kappa uyum katsayısı ve anlamlılığı hesaplandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Araştırmaya alınan toplam 166 izolatin 99'u *S.aureus*, 67'si KNS'dir. KNS'lerin 25 (%37.3)'i *Staphylococcus hominis*, 20 (%29.9)'si *S.epidermidis*, 10 (%15)'u *Staphylococcus haemolyticus*, 9 (%13.4)'u *Staphylococcus capitis*, 2 (%3)'si *Staphylococcus saprophyticus* ve 1 (%1.5)'i *Staphylococcus warnerii* olarak tanımlanmıştır (Tablo I).

KKA yönteminin 24. ve 48. saat değerlendirme sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığından 24. saat sonuçları esas alınmıştır. KKA besiyerlerine ekimde tek koloni düşürme ve damlatma yöntemleri karşılaştırıldığında, izolatların %97.6'sında (162/164) iki yöntem ile aynı sonuç alınmıştır. Bir *S.haemolyticus* ve bir *S.hominis* izolatta tek koloni ekiminde tek düşen kolonilerin renk dağılımı birbirinden farklı görülmüş, ancak damlatma yönteminde pozitif bulduklarından "slime-pozitif" kabul edilmişlerdir. İki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamakla birlikte, tek koloni ekiminde kolonilerin zaman zaman farklı renkte röfleler vermesi nedeniyle damlatma yönteminin değerlendirilmesi daha kolay olmuştur (Şekil 1).

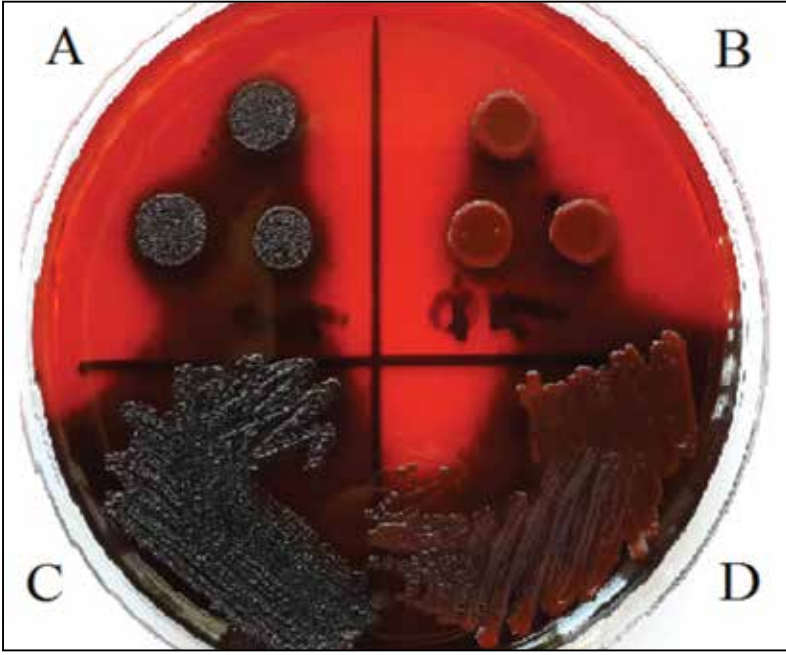
KNS'lerin %40.3'ünün (27/67) slime oluşturmaya karşı, *S.aureus*-larda bu oran %85.8 (85/99) bulunmuştur ($p < 0.001$). KKA'da pozitiflik oranları MRSA'larda %95.9, MSSA'larda %56 olarak saptanırken ($p < 0.001$), aynı oran metisiline dirençli KNS (MR-KNS)'lerde %39.6 (19/48); metisiline duyarlı KNS (MS-KNS)'lerde ise %42.1 (8/19) bulunmuştur ($p > 0.05$) (Tablo II). KNS izolatları içinde *S.epidermidis* izolatlarının KKA'da biyofilm oluşturma oranlarının (%60), diğer KNS izolatlarına göre (%31.9) daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p < 0.001$).

İnvaziv olan izolatların %84.7'si (61/72), invaziv olmayan izolatların %55.3'ü (52/94) slime-pozitif bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo III).

Bir *S.aureus* izolatta tek başına *icaA* gen varlığı izlenirken, *S.aureus* izolatlarında tek başına *icaD* ya da IS256 geni taşıyan izolata rastlanmamıştır. Buna karşılık *S.aureus* izolatlarının %78.8 (78/99)'ünün her üç geni birlikte taşıdığı, bir izolatta hiçbir genin bulunmadığı saptanmıştır (Tablo II).

Üç genin birlikte pozitifliğinin görülme sıklığı MRSA'larda %90.5 (67/74), MSSA'larda %44 (11/25) olarak saptanmıştır ($p < 0.001$) (Tablo II).

KNS izolatlarının %15'inin sadece *icaA*, %8.9'unun sadece *icaD*, %31.3'ünün ise sadece IS256 genlerini taşıdığı saptanmış, her üç geni birlikte taşıyan izolatların oranı %11.9 olarak bulunmuştur. Araştırılan genlerin hiçbirini taşımayan 7 (%10.4) izolat gösterilmiştir.



Şekil 1. KKA besiyerinde biyofilm pozitif ve negatif izolatların görünümü. (A) Biyofilm pozitif, damlatma yöntemi; (B) Biyofilm negatif, damlatma yöntemi; (C) Biyofilm pozitif, tek koloni düşürme yöntemi; (D) Biyofilm negatif, tek koloni düşürme yöntemi.

Tablo II. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

İzolatlar (n)	Biyofilm Genleri			
	Tek gen birlikteliği Sayı (%)	İki gen birlikteliği Sayı (%)	Üç gen birlikteliği Sayı (%)	KKA pozitifliği Sayı (%)
<i>S.aureus</i> (99)	1 (1.0)	19 (19.2)	78 (78.8)	85 (85.9)
MRSA (74)	0 (0)	6 (8.1)	67 (90.5)	71 (95.9)
MSSA (25)	1(4)	13 (52)	11 (44)	14 (56)
KNS (67)	37 (55.2)	15 (22.4)	8 (11.9)	27 (40.3)
MR-KNS (48)	25 (52.1)	11 (22.9)	8 (16.7)	19 (39.6)
MS-KNS (19)	12 (63.2)	4 (21.1)	0	8 (42.1)

KLA: Kongo kırmızısı agar, MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*, KNS: Koagüloz-negatif stafilokok, MRKNS: Metisiline dirençli koagüloz-negatif stafilokok, MS-KNS: Metisilene duyarlı koagüloz-negatif stafilokok.

Üç genin birlikte pozitifliğinin görülme sıklığı MR-KNS'lerde %16.7 (8/48) bulunurken, MS-KNS'lerde üç genin birlikte pozitifliğine rastlanmamıştır (0/19) ve bu dağılım istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.094$) (Tablo II).

Tablo III. İnvaziv Olan/Olmayan Stafilokok İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

İzolatlar (n)	Biyofilm Genleri			
	Tek gen birlikteliği n (%)	İki gen birlikteliği n (%)	Üç gen birlikteliği n (%)	KKA pozitifliği n (%)
İnvaziv örnekler (72)	8 (11.1)	10 (13.9)	54 (75)	61 (84.7)
İnvaziv olmayan örnekler (94)	30 (4.2)	24 (25.5)	32 (34)	52 (55.3)

KKA: Kongo kırmızısı agar.

Üç geni birlikte taşıyan *S.aureus* (%78.8; 78/99) ve KNS izolatlarının (%11.9; 8/67) oranları karşılaştırıldığında, *S.aureus*'lardaki oranın yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo II).

KDE etkeni ve burundan izole edilen stafilokoklarda *icaA* pozitiflik sıklığı ($p < 0.001$), KDE ve KİKDE etkenleri ile burundan izole edilenlerde *icaD* pozitiflik sıklığı ($p < 0.001$) ve kateter kolonizasyonu, KDE ile KİKDE etkenlerinde IS256 pozitiflik sıklığı ($p < 0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

İnvaziv izolatların hepsi araştırılan genlerden en az birini taşıırken, invaziv olmayan izolatların %8.5'inde hiçbir gene rastlanmamıştır. İnvaziv izolatlarda üç geni birlikte taşıma oranı %75 (54/72) iken invaziv olmayan izolatlarda bu oran %34 (32/94) olarak bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo III).

TARTIŞMA

Özellikle implante tıbbi cihazlara bağlı gelişen enfeksiyonlarda etken olarak izole edilen stafilokokların ana virülans faktörünün polimerik yüzeylerde biyofilm oluşturarak adranslarını sağlamak ve kolonizasyon yapmak olduğu gösterilmiştir. Mikroorganizma bu sayede konak bağışık yanıtı ve antimikrobiallardan korunmaktadır. Bu nedenle biyofimler, kateterize hastalarda tedavisi zor kronik enfeksiyonlara yol açarak önemli bir problem oluşturmakta, hastanede yatış süresi ve tedavi masraflarını arttırmaktadır^{14,16,17}.

Biyofilm oluşumunun saptanmasında, konfokal lazer tarama mikroskobu ile görüntüleme de dâhil olmak üzere pek çok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bunlar içerisinde tüp adrans testi¹⁸ ve KKA yöntemleri¹³ en sık kullanılan kalitatif; doku kültür plak metodu⁸ ise kantitatif yöntemdir. Biyofilmi oluşturan genlerin saptanması da bu yöntemleri tamamlamaktadır¹⁹. KKA yöntemi, kolay uygulanmasıyla ön plana çıkmakla birlikte, moleküler yöntemlere kıyasla daha az oranda kesin sonuçlar vermektedir^{19,20}. KKA besiyerinin içerisindeki sükröz, glukan üretimini saptarken, Kongo kırmızısı da bakterinin oluşturduğu ekzopolisakaritleri boyamakta ve siyah renkli koloniler biyofilm oluşturan izolatlar olarak yorumlanmaktadır¹³. Ancak kolonilerde renk geçişi her zaman çok net olmamakta ve yöntem kantitatif değil, kromojenik değerlendirmeye dayandığı için kalitatif ve subjektif olarak kabul edilmektedir²¹. Bu nedenle KKA üzerine ekim yaparken tek koloni ekimi ve damlatma gibi farklı yöntemler denenmiş, tek koloni ekiminde aynı izolatın birden fazla

renkte koloniler oluşturabilmesine karşılık, damlatmada tek renkte görünüm izlenmesinden dolayı değerlendirmenin daha kolay olduğu sonucuna varılmıştır²¹. Çalışmamızda her iki ekim yöntemi de kullanılmış, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, damlatma yönteminde karar vermek daha kolay olmuştur.

Stafilokokkal biyofilm oluşumu çok sayıda düzenleyici proteine bağlı olmakla birlikte, esas olarak *ica* lokusunda bulunan *icaADBC* genlerinin ürünü olan ve hücrelerin birbirine yapışmasına aracılık eden PIA ekspresyonu ile düzenlenmektedir. Hayvan modellerinde PIA-negatif mutantların, PIA-pozitif olanlara göre kateter ilişkili enfeksiyonlara belirgin oranda daha az yol açtığı gösterilmiştir²².

Biyofilm oluşturan *S.epidermidis* izolatlarının faz varyasyonuna gidebildiği ve biyofilm oluşturan bir koloninin pasajından sonra PIA üretiminin kaybına bağlı biyofilm negatif koloniler izlenebildiği ortaya konulmuştur¹⁰. Ziebuhr ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında IS256'nın *ica* gen kümesinin farklı yerlerine girip çıkmasına bağlı olarak faz varyasyonu olabileceği gösterilmiş, KKA yöntemi; siyah kolonilerin üzerinde pembe çıkıntılar şeklinde izlenen faz varyasyonunu da gösterdiğinden uygun bir yöntem olarak tanımlanmıştır¹⁰. Çalışmamızda KKA besiyerine damlatma ve tek koloni ekimi yöntemlerinde izlenen farklılıkların ve tek koloni yöntemini değerlendirmede yaşanan zorlukların faz varyasyonlarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Biyofilmin, fenotipik ekspresyonunun in vitro koşullardan etkilenmesi nedeniyle, genotipik olarak pozitif, fenotipik olarak negatif izolatların tespit edilmesi için farklı yöntemlerin birlikte kullanılmasını öneren birçok araştırmacı bulunmaktadır^{1,14,17}. Çalışmamızda KKA yöntemi ile elde edilen biyofilm pozitifliği, moleküler yöntemler ile de desteklenmiş, izolatların birbirleriyle karşılaştırılmasında her iki yöntem ayrı ayrı değerlendirilmiştir. KNS ve *S.aureus* izolatlarının KKA'da biyofilm oluşturma oranları arasında anlamlı fark saptanırken (sırasıyla %40.3; %85.8, $p < 0.001$), PCR ile *S.aureus* izolatlarının araştırılan her üç geni taşıma oranları KNS'lere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (sırasıyla %78.8; %11.9, $p < 0.001$). Bu durum *S.aureus*'un virülans özellikleri ile açıklanabileceği gibi çalışmamızda *S.aureus* izolatlarında tekli gen pozitifliklerinin KNS'lere göre daha az olduğu görülmüş, bu da KNS'lerde biyofilm oluşumunda bu genlerin dışında diğer faktörler ve bu çalışmada araştırılmayan diğer genlerin varlığının etkisini düşündürmüştür.

Stafilokokların biyofilm oluşturma kapasiteleri antimikrobiyal ilaç direncinde artış ile ilişkilendirilmektedir²³. Çalışmamızda kullanılan izolatlar metisilin dirençlerine göre değerlendirildiğinde *S.aureus*'larda metisilin dirençli olan izolatların hem KKA yöntemiyle biyofilm oluşturma, hem de PCR ile *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerini birlikte taşıma oranlarının metisilin duyarlı olanlara göre fazla olması istatistiksel olarak da anlamlı saptanmıştır ($p < 0.001$). Her üç geni taşımasına rağmen, üç izolatta (bir MRSA ve iki MSSA) fenotipik olarak biyofilm üretimi gözlenmemesi, fenotipik yöntemin sınırlılığına ya da bu izolatlarda ekspresyonun olmamasına bağlanmıştır. Buna karşılık, KNS izolatlarında metisilin direnci ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki kurulamamıştır ($p = 0.094$).

KNS'ler içerisinde *S.epidermidis* izolatlarının KKA besiyerinde biyofilm oluşturma oranları (%60) diğer KNS'lere göre (%31.9) istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Biyofilm oluşturan *S.epidermidis* izolatlarının, oluşturmayanlara göre daha virülan olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır¹⁰. Gad ve arkadaşları, üriner kateteri olan hastaların kateter segmentlerinden izole edilen ve biyofilm oluşumu gösteren bütün izolatların *icaA* ve *icaD* pozitif olduğunu, buna karşılık idrarlarından izole edilen ve biyofilm oluşturmeyen izolatlarda her iki genin de negatif olduğunu bulmuştur¹⁶. Bu sonuçlar damar içi kateterlerden izole edilen ve biyofilm oluşturan tüm *S.aureus* ve *S.epidermidis* izolatlarında *icaA* ve *icaD* genlerini pozitif olarak bulan Arciola ve arkadaşlarının¹ çalışmasıyla da uyumludur. Bu çalışmalarda *ica* genlerinin biyofilm oluşumundaki rollerine ve stafilokok enfeksiyonlarında virülans belirteci olarak değerlendirilebileceğine dikkat çekilmiştir. Bir başka çalışmada da IS256'nın invaziv örneklerde daha sık bulunduğu ve invaziv izolatları kommensal olanlardan ayırt edici bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır²⁴. Çalışmamızda, bu bulguları destekleyecek şekilde, kan ve burun izolatlarında *icaA* pozitifliği ($p < 0.001$); KİKDE etkenleri ile kan ve burun izolatlarında *icaD* pozitifliği ($p < 0.001$); anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar invaziv etkenlerde *ica* genlerinin rolüne dikkat çekmenin yanı sıra burunda da stafilokokların biyofilm oluşturabilme kapasitelerinin olduğunu göstermiştir. Stafilokokların burunda kolonizasyonları ve taşıyıcılıkları halinde bulaşa neden olabileceklerinin akılda tutulması gerekmektedir.

Çalışmamızda invaziv izolatların invaziv olmayanlara göre hem KKA yönteminde biyofilm oluşturma hem de araştırılan her üç geni de birlikte taşıma oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). İnvaziv örneklerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin yüksekliğinin tedavisi güç enfeksiyonlara yol açabileceği, taşıyıcılığın ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesi açısından da bu izolatların yayılımının önüne geçilmesi gerektiği ve biyofilm geliştirme potansiyelleri açısından taranmalarının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2151-6.
2. Götz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43(6): 1367-78.
3. Ishak MA, Gröschel DH, Mandell GL, Wenzel RP. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. J Clin Microbiol 1985; 22(6): 1025-9.
4. Asai K, Yamada K, Yagi T, Baba H, Kawamura I, Ohta M. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms J Infect Chemother 2015; 21(1): 55-61.
5. Cramton SE, Gerke C. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun 1999; 67(10): 5427-33.
6. Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol 2009; 47(4): 1172-80.
7. De Allori MC, Jure MA, Romero C, de Castillo ME. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* strains. Biol Pharm Bull 2006; 29(8): 1592-6.
8. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, 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.

9. Arciola CR, Collomati S, Donati E, Montanoro L. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10(2): 130-7.
10. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999; 32(2): 345-56.
11. Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, et al. Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res Perspect* 2013; 4(5): 225-32.
12. Harris LG, Murray S, Pascoe B, et al. Biofilm morphotypes and population structure among *Staphylococcus epidermidis* from commensal and clinical samples. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151240
13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42(8): 872-4.
14. 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.
15. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(3): 813-8.
16. 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 Dec Ctries* 2009; 3(5): 342-51.
17. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol* 2005; 107(3-4): 295-9.
18. Christensen GD, Bisno AL, Simpsons WA, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37(1): 318-26.
19. Oliveira A, Cunha Mde L. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 2010; 14(3): 260.
20. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara P. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1973-6.
21. Kaiser TD, Pereira EM, Dos santos KR, Maciel EL, Schuenck RP, Nunes AP. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75(3): 235-9.
22. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* 1999; 67(5): 2656-9.
23. De Oliveira A, Cataneli Pereira V, Pinheiro L, Moraes Riboli DF, Benini Martins K, Ribeiro de Souza da Cunha Mde L. Antimicrobial resistance profile of planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. *Int J Mol Sci* 2016;1;17(9) pii: E1423.
24. Gu J, Li H, Li M, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 2005; 61(4): 342-8.