Investigate Nasal Colonize Staphylococcus Species Biofilm Produced

Nazal Kolonize Stafilokok Türlerinde Biyofilm Üretiminin Araştırılması

Nazal Kolonize Stafilokok Türleri / Nasal Colonize Staphylococcus Species

Cemil Demir[1], Betül Battaloğlu İnanç[2]
[1]Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu, [2]Sağlık Yüksekokulu, Mardin Artuklu Üniversitesi, Mardin, Türkiye

Özet

Amaç: Hastaların, burunlarından izole edilen, 127 S. aureus ve 65 KNS (koagulaz negatif stafilokok) suşunun, biyofilm oluşturma yeteneği üç farklı yöntem kullanılarak araştırıldı. Biyofilm pozitif ve negatif stafilokokların, farklı antibiyotiklere karşı olan dirençlilikleri değerlendirildi. Gereç ve Yöntem: Alınan eküvyon örnekleri, % 7'lik kanlı agara ekildi. Staphylococcus aureus ve KNS izolatları, biyofilm üretme yetenekleri, Congo Red Agar (CRA), Mikroplak (MP) ve Standart Tüp (ST) yöntemleri kullanılarak araştırıldı. Ayrıca, stafilokok suşlarının, çeşitli antibiyotiklere karşı olan dirençlilikleri, agar disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. Bulgular: İncelenen stafilokok suşlarının, CRA, MP ve ST testleri ile biyofilm üretimi sırasıyla, %72,4, %67,7 ve %62,9 oranında pozitif bulundu. CRA, MP ve ST testleri arasında, istatistiksel olarak, anlamlı farklılık saptanmadı (p>0,05). Biyofilm pozitif (BP) stafilokok suşlarında, penisilin G, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, enrofloksasine olan direnç oranları sırasıyla %71,7, %69,7, %6,2, %20 ,7, %21,4, %1,4, %0,7 , Biyofilm negatif (BN) stafilokok suşlarında ise, %42,6, %23,4, %4,3, % 14,9, %19,1, %0,0, 0,0% olarak tespit edildi. İncelenen tüm stafilokoklar ise, vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulundu. Antibiyotiklere dirençlilik oranları, BP suşlarda BN suşlara göre daha yüksek bulunmakla birlikte, dirençlilik oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p>0,05). Tartışma: Stafilokok suşlarında, biyofilm üretiminin belirlenmesinde CRA testinin daha pratik ve spesifik olduğu, antibiyotiklere direnç gelişiminde de, biyofilm üretiminin önemli rol oynadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler

Biyofilm; Koagülaz; Antibiyotik Direnci; Staphylococcus Aureus

Abstract

Aim: 127 S.aureus and 65 CoNS strains were isolated from patients noses'. To produce a biofilm ability was investigated using three different methods. Slime-positive and negative staphylococcies' resistance were evaluated against different antibiotics. Material and Method: Swap samples puted 7% blood agar. Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolates biofilm produced ability were investigated using Congo Red Agar (CRA), microplates (MP) and Standard Tube (ST) methods. In addition to that, presence of antibiotic resistance of the staphylococcal isolates are determined agar disc diffusion method. Results: The rate of biofilm producing Staphylococcus spp strains was found to be 72.4%, 67.7%, and 62.9%, respectively with CRA, MP, and ST tests. There was no significant relationship among the tests (p>0.05). In addition, antibiotic resistance of Staphylococcus spp. against various antibiotics was also determined by the agar disk diffusion method. Resistance rates of biofilm positive (BP) Staphylococcus spp for penicilin G, ampicilin, amocycilin/clavulanic acid, tetracyclin, eritromycin, gentamycin, and enrofloxacin 71.7%, 69.7%, 6.2%, 20.7%, 21.4%, 1.4%, and 0.7%, respectively. Resistance rates of biofilm negative (BN) spp for 42.6%, 23.4%, 4.3%, 14.9%, 19.1%, 0.0%, 0.0% respectively. All Staphylococcus isolates were found to be susceptible to vancomycin and teicaplonin. Although BP strains antibiotic resistance rates were observed higher than BN strains. But resistance rates were not found statistically significant (p>0.05). Discussion: CRA is the reliablity and specifity method to determine Staphylococcus spp. biofilm produce ability.

Keywords

Biofilm; Coagulase; Antibiotic Resistance; Staphylococcus Aureus

DOI: 10.4328/JCAM.2082 Received: 03.10.2013 Accepted: 23.10.2013 Printed: 01.07.2015 J Clin Anal Med 2015;6(4): 450-454
Corresponding Author: Cemil Demir, Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu Mardin, Türkiye.
T: +90 4822121395 GSM: +905352047030 F: +90 4822126947 E-Mail: cemildemir@ymail.com

Giriş

Stafilokoklar, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. S. aureus insanlarda, toksinlere ve invazyon yeteneğine bağlı, nozokomiyal enfeksiyonlara, deri ve yumuşak doku, cerrahi yara, santral sinir sistemi, solunum sistemi, üriner sistem, kardiyovasküler sistem, kas ve iskelet sistemi enfeksiyonlarına yol açmaktadır. KNS'lar ise insanlarda, endokardit, osteomyelit, oküler operasyonlar sonrası endoftalmit, üriner sistem enfeksiyonları, nozokomiyal ve toplum kaynaklı gelişen enfeksiyonlara, immün suprese bireylerde bakteriyemi ve vücuda uygulanan protez implantlarını takiben, gelişen enfeksiyonlara yol açmaktadır [1]. Stafilokoklar, deri ve mukoz membranların normal florasında bulunan mikroorganizmalardır. Vücut savunma mekanizmalarının bozulması, iç ve dış stres faktörleri, stafilokokların hastalık oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. Stafilokokların, in vivo, katı yüzeylere yapışma ve hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluşturma özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Oluşan biyofilm, damar içi kateter veya protez uygulamalarında, enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu yapışkan, glikokaliks yapılı, maddeyi salgılayarak, sıvısal ve hücresel aracılı immün sistemin etkilerine ve antibiyotiklere dirençli hale gelmektedirler. Bu yapışkan tabaka, "slime (biyofilm)" olarak adlandırılır ve bakterilerin yüzeylere tutunmasını sağlar [2]. Slime faktörü, mikroorganizmanın plastik ve metal yüzeylere yapışmasını arttıran ve fagositozunu önleyen bir faktördür. Slime üretimi, stafilokoklarda virulansı etkileyen faktörlerden biridir. Bu nedenle, enfeksiyonlara neden olan patojenlerin tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, sadece tedavi açısından değil, dirençli izolatların, yayılımının izlenmesi açısından da önem arz etmektedir [3].

Gereç ve Yöntem

Bakteri Suşları

Mardin ili merkezinde, sağlık ocağına başvuran hastaların burunlarından, Cary-Blair transport besiyeri içeren eküvyonlarla, toplamda 300 tane nazal sürüntü örneği gönüllülük esasına dayanılarak alındı. Stafilokok izolatlarının izolasyonu ve tanımlama çalışmalarında, %5 koyun kanı ile zenginleştirilmiş kanlı, Staphylococcus Medium 110 besiyerleri kullanıldı. 24 saat inkübasyondan sonra üreyen koloniler, morfolojik ve hemoliz özelliklerine göre değerlendirildi. Gram boyama yöntemiyle tanımlandı. Ayrıca stafilokokların streptokoklardan ve mikrokoklardan ayrımı için, katalaz ve modifiye oksidaz testleriyle de 127'si Staphylococcus aureus ve 65'i KNS olmak üzere toplam 192 stafilokok suşu izole edildi. Çalışma için gerekli izinler Mardin İl Sağlık Müdürlüğünden ve etik onayımız Mardin Artuklu Üniversite'sinden alındı.

Antibiyotik Diskleri

Penisilin G (Oxoid, 10 µg), amoksisilin/klavulanik asid (Oxoid, 30 µg/20 µg), eritromisin (Oxoid, 15 µg), tetrasiklin (Oxoid, 30 µg), gentamisin (Oxoid, 10 µg), ampisilin (Oxoid, 10 µg), enrofloksasin (Oxoid, 5 µg), vankomisin (Oxoid, 30 µg) ve teikoplanin (Oxoid, 30 µg) antibiyotik diskleri kullanıldı.

Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

İzolatların biyofilm üretme yetenekleri, üç farklı yöntem ile araştırıldı.

Congo Red Agar (CRA) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Freeman ve ark. tarafından bildirilen metoda göre hazırlandı [4]. Congo Red konsantre solusyon olarak hazırlandıktan sonra, 121 oC'de 15 dakika ayrı olarak otoklavda sterilize edildi. Besiyeri, 55 oC'ye kadar soğutulduktan sonra, Congo Red ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra steril plastik petrilere döküldü Bakteri suşları, CRA'a ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi.

Mikroplak (MP) Yöntemi İle Biyofilm Üretimin Saptanması

Stafilokok suşlarının, kantitatif olarak biyofilm üretimlerinin belirlenmesi, Christensen ve ark. [5] tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntem ile yapıldı. TSB'da (Tryptic Soy Broth) 37 °C'de, 18 saat süreyle üretilen stafilokok suşları % 2 oranında glukoz içeren TSB ile 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra, steril düz tabanlı mikroplağın (Biofilm) her bir gözüne 0.2 ml konularak, 37 °C'de 18 saat aerobik olarak inkübe edildi. Sürenin sonunda, mikroplağın her bir gözündeki sıvı aspire edilerek, PBS [Fosfat Tamponlu Tuz (saline)] ile dört kez yıkandı ve her bir göze 200 µl Hucker crystal violete boyası ilave edilerek oda sıcaklığında 45dakika süre ile boyandı. Daha sonra kuyucuklar, 3 kez distile su ile yıkandı ve mikroplak kurutma kağıdı üzerinde, ters çevrilerek kurutuldu. Mikroplak kurutulduktan sonra, 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (VersaMax ELISA Reader, Amerika) optik dansiteleri belirlendi. Her suş için, üç kez yapılarak okunan optik dansite değerlerinin aritmetik ortalamaları alındı. Steril TSB, negatif kontrol olarak kullanıldı. Optik dansite değerleri 0.240'tan büyük olan suşlar kuvvetli adheran, 0.120-0.240 olan suşlar adheran, 0.120 ve altında olan suşlar ise adheran negatif olarak değerlendirildi.

Standard Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanması

Christensen ve ark. tarafından bildirilen yönteme göre, test edilecek stafilokok suşlarının, kanlı agar'da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml %0,25 glukoz içeren TSB besiyerine inokule edilerek, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılarak, %1'lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletildi [5]. Boya dökülerek, tüpler steril PBS ile iki defa yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++), (+++) veya (-) olarak değerlendirildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Agar disk difüzyon testi, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006) tarafından belirtilen kriterlere göre yapıldı ve değerlendirildi. Bu amaçla, test edilecek bakteri suşunun fizyolojik tuzlu su içinde, mcfarland 0.5 yoğunluğunda süspansiyonu yapıldı [6]. Bakteri süspansiyonundan eküvyon yardımıyla, Mueller-Hinton Agara, ekim yapılarak antibiyotik diskleri steril bir şekilde yerleştirilerek, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Antibiyotik disklerin çevresindeki inhibisyon zonları, milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek değerlendirildi.

Çalışmada elde edilen değerlerin, istatistiksel analizleri SPSS 14.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanıldı. Biyofilm pozitif ve negatif suşların, antibiyotiklere olan

dirençlilikleri ile biyofilm üretme yeteneklerini belirlemede kullanılan yöntemler arasındaki farklılıkların, önem derecesini belirlemede Pearson ki-kare, Yates düzeltmeli ki-kare ve Fisher'in kesin Ki-kare testleri kullanıldı. Çalışmada bulunan p<0,05 olasılık değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

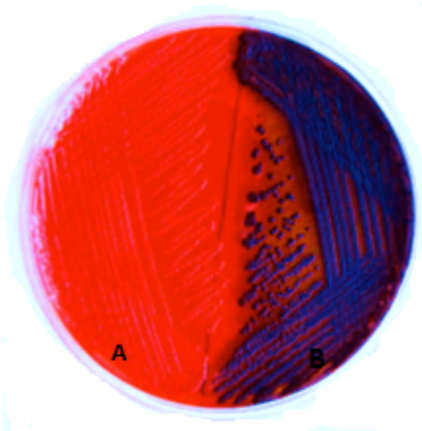
Bulgular

Biyofilm Üretimi

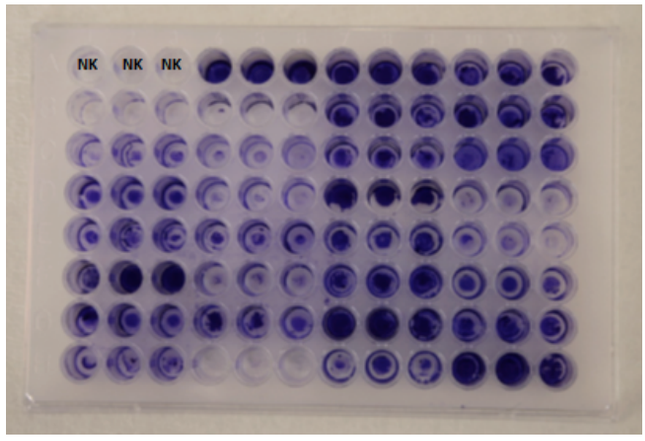
Stafilokok suşlarının CRA, MP ve ST yöntemleri ile biyofilm üretme yetenekleri Tablo 1'de sunulmuştur. İncelenen 127 S.aureus suşunun CRA, MP ve ST testleri ile sırasıyla %72,4'ü (n=92), %67,7'si (n=86) ve %62,9'u (n=80) 65 KNS suşunun ise %81,5'u (n=53), %75,4'ü (n=49) ve %72,3'ü (n=47) biyofilm üretimi yönünden pozitif bulundu (Şekil 1-3). Suşların, biyofilm üretimini belirlemede kullanılan üç yöntem arasında, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,226; p=0,350; p=0,258).

Tablo 1. Stafilokok suşlarının farklı fenotipik yöntemlerle saptanan biyofilm üretme yetenekleri (Congo Red Agar: CRA, Mikropleyt: MP ve Standart Tüp: ST)

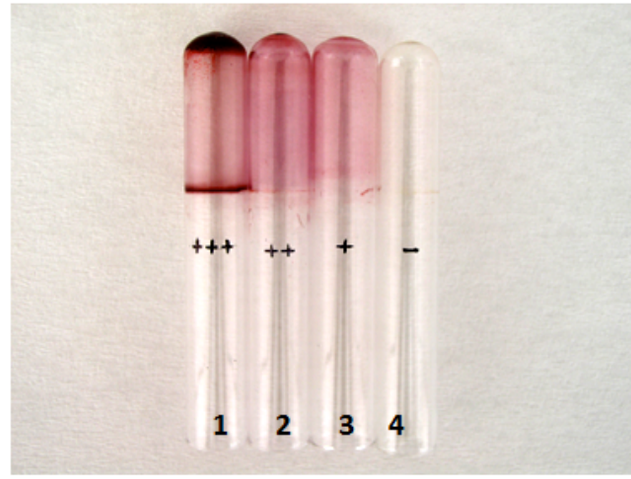
Test	S. aureus (=127)				KNS (=65)				
	Biyofilm Pozitif		Biyofilm Negatif		Biyofilm Pozitif		Biyofilm Negatif		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
CRA	92	72,4	35	27,6	53	81,5	12	18,5	0,226
MP	86	67,7	41	32,3	49	75,4	16	24,6	0,350
ST	80	62,9	47	37,0	47	72,3	18	27,7	0,258



Şekil 1. CRA'da biyofilm pozitif ve negatif suşların görünümü (A-biyofilm negatif, B-biyofilm pozitif)



Şekil 2. Biyofilm üretiminin MP(Mikroplak) yöntemi ile belirlenmesi



Şekil 3. Standart Tüp yöntemi suşların biyofilm üretimi yönünden değerlendirilmesi 1-Kuvvetli pozitif (+++), 2-Pozitif (++), 3-Pozitif (+), 4-Negatif (-)

MP yöntemi ile S. aureus suşlarının 39'u (%30,7) negatif, 48'i (%37,8) orta derecede adheran ve 40'ı (%31,5) kuvvetli adheran, KNS suşlarının ise 13'ü (%20) negatif, 44'ü (%67,7) orta derecede adheran ve 8'i (%12,3) kuvvetli adheran bulundu (Tablo 2). Antibiyotik Duyarlılıkları ve Biyofilm Oluşumu İlişkisi

Tablo 2. Mikropleyt yöntemi saptanan optik dansitelerine göre adherans değerleri.

	Negatif		Orta Derecede Adheran		Kuvvetli Adheran	
	n	%	n	%	n	%
S. aureus (n: 127)	39	30,7	48	37,8	40	31,5
KNS (n: 65)	13	20,0	44	67,7	8	12,3
Toplam (n: 192)	52	27,1	92	47,9	48	25,0

Biyofilm pozitif (BP) ve Biyofilm negatif (BN) stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 3'de sunulmuştur. BP ve BN stafilokok suşlarının tamamı, vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulundu. BP 145 stafilokok suşunun, 104'ü (%71,7) penisiline, 101'i (%69,7) ampisiline, 9'u (%6,2) amoksisilin-klavulanik aside, 30'u(%20,7) tetrasikline, 31'i (%21,4) eritromisine, 2'si (%1,4) gentamisine ve 1'i (%0,7)de enrofloksasine dirençli bulundu. 47 BN stafilokok suşunun ise 20'si (%42,6) penisiline, 11'i (%23,4) ampisiline, 2'si (%4,3) amoksisilin-klavulanik aside, 7'si (%14,9) tetrasikline ve 9'u (%19,1) eritromisine dirençli bulunurken, tamamı gentamisin ve enrofloksasine duyarlı bulundu. BP suşlarda penisilin, ampisilin, tetrasiklin ve eritromisine karşı saptanan direnç oranları, BN suşlara göre yüksek bulunmuş, ancak bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p>0.05).

Tartışma

Stafilokokların, sahip oldukları ekzotoksinler ve yüzey proteinleri yanında, biyofilm üretiminin, artan oranda önemli bir virulans faktörü olduğu vurgulanmakta, immun sistemin, savunma mekanizmalarından kurtulmasına ve sıklıkla kalıcı enfeksiyonlar oluşturmasına katkıda bulunmaktadır[7-9].

Çalışmamızda, CRA, MP ve ST yöntemleri ile S.aureus suşlarında saptanan %72,4, %67,7 ve %63,0 oranındaki biyofilm pozitifliği Türkyılmaz ve ark. ile Vasudevan ve ark. tarafından bildiri-

Tablo 3. SP ve SN stafilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.

Antibiyotik	Biyofilm Pozitif S. aureus (=92)	Biyofilm Negatif S. aureus (=35)	Biyofilm Pozitif KNS (=53)	Biyofilm Negatif KNS (=12)	BP (=145) Toplam Dirençli İzolat Sayısı	BN (=47) Toplam Dirençli İzolat Sayısı	p
Penisilin	61 (%66,3)	16 (%45,7)	43 (%81.1)	4 (%33,3)	104 (% 71,7)	20 (%42,6)	0,121
Ampisilin	57 (%61,9)	8 (%22,9)	44 (%83,0)	3 (%25,0)	101 (%69,7)	11 (%23,4)	0,352
Amok-Klav. Asid	9 (%9,8)	2 (%5,71)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	9 (%6,2)	2 (%4,3)	_
Tetrasiklin	17 (%18,5)	5 (%14,3)	13 (%24,5)	2 (%16,6)	30 (%20,7)	7 (%14,9)	0,676
Eritromisin	18 (%19,6)	7 (%20,0)	13 (%24,5)	2 (%16,6)	31 (%21,4)	9 (%19,1)	0,440
Gentamisin	1 (%1,1)	0 (%0,0)	1 (%1,9)	0 (%0,0)	2 (%1,4)	0 (%0,0)	_
Enrofloksasin	1 (%1,1)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	1 (%0,7)	0 (%0,0)	_
Vankomisin	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	_
Teikoplanin	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	_

len bulgulardan düşük, diğer araştırıcıların bildirimlerinden yüksek, KNS suşlarında saptanan %81,5, % 75,4 ve %72,3 oranındaki biyofilm pozitifliğinden yüksek bulunmuştur. Stafilokoklarda, biyofilm üretiminin tespit edilmesinde, CRA yönteminin çok daha spesifik olduğu bildirilmiştir [9,10].

Vasudevan ve ark. icaA ve icaD genleri yönünden pozitif olan, 35 S. aureus suşunun 32'sinde CRA yöntemi ile pozitiflik saptarken, MP yöntemi ile 24'ünde pozitiflik saptamışlardır [9]. Oliveira ve ark. 16 S. aureus suşunu, biyofilm üretimi yönünden CRA, ST ve FISH (fluorescent in situ hybridization) yöntemleri ile araştırmışlar ve MP ile %18,75'ini, %37,5'ini ise hem CRA yöntemi, hem de FISH yöntemi ile pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Araştırıcılar, FISH ve CRA yöntemleri arasında yüksek uyum olduğunu (Kappa=1) belirtmişlerdir [11].

Çalışmamızda, CRA yöntemi ile S. aureus suşlarının, biyofilm oluşturma yetenekleri %72,4 (n=92) ve KNS suşlarının ise %81,5 olarak bulundu. Ancak, stafilokokların biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemede kullanılan metodlar arasında, istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmadı.

Çalışmamızda, MP ve CRA yöntemleri ile karşılaştırıldığında, ST yöntemi ile düşük pozitiflik saptandı. Bu durum, zayıf biyofilm üreten suşların, ST ile değerlendirilmesinin zor olmasına ve bu tekniğe aşina olmayan araştırıcılar tarafından sonuçlarının yorumlanmasındaki güçlüğe bağlanabilir [5].

Biyofilm formasyonunun, fenotipik ekspresyonu in vitro koşullara oldukça duyarlıdır. Vasudevan ve ark, CRA veya MP yönteminde, biyofilm formasyonunun in vitro koşullara duyarlı olabileceğini, farklı fenotipik yöntemlerin ve genotipik metodların birlikte kullanılması gerekliliğini vurgulamışlardır [9]. Bu nedenle, araştırıcılar, biyofilm formasyonu yönünden genotipik pozitif , fakat fenotipik negatif suşların, doğru bir şekilde tespit edilmesi için farklı metodların birlikte kullanılmasını önermişlerdir [7,9,12].

Biyofilm içinde üreyen bakterilerin, in vitro antimikrobiyal ajanlara, aynı suşun planktonik formlarına göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Bilinen direnç mekanizmaları dışında gerçekleşen bu tarz direnç, antibiyotiklerin biyofilm içine difüzyonunun azalması, bakterilerin yavaş üreme hızları ve biyofilm içindeki değişen çevresel koşullara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu durum, tedavi sonrası tekrarlayan enfeksiyonların görülmesine ve etkenin vücut içinde yayılmasına neden olmaktadır [8,13-15].

Türkyılmaz ve ark. inceledikleri stafilokok suşlarında en yüksek direnç oranını penisilin (BP: %49, BN: %42,6), metisilin (BP: %24,5, BN: %15,7) ampisilin (BP: %23,6, BN: %14,2) ve gentamisine (BP: %13,6, BN: %12,9) karşı saptarken, tüm izolatları vankomisine duyarlı bulmuşlardır. Araştırıcılar, çalışmada kullanılan antibiyotiklere BP suşların daha yüksek direnç gösterdiğini saptamışlardır [10].

Güçlü biyofilm oluşturan bakteri üzerine vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinopristin ve dalfopristin-quinopristine olan minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ve biyofilm oluşturmuş suşlar üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırıcılar, biyofilm bakterilerinin, planktonik bakterilere oranla 8-12 kat daha fazla dirençli olduğunu, biyofilm oluşturmuş bakterilerin inhibisyon ve eradikasyonunun güç olduğunu ve antibiyotiklerin MİK değerlerinin çok daha üstünde dozlarda kullanılması gerekliliğini vurgulamışlardır [16].

Kongo kırmızısı, makro-tüp ve mikroplak yöntemleri ile yapılan araştırmada, sırayla, % 84,4, %75,6 ve %75,6 oranlarında biyofilm üretimi saptandı. Bu üç yöntem arasında duyarlılık ve özgüllük açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Genel olarak değerlendirildiğinde, biyofilm pozitif suşların, test edilen antibiyotiklere, biyofilm negatif suşlardan daha dirençli oldukları gözlendi [17].

Türkyılmaz ve ark. çeşitli hayvansal klinik örneklerden izole edilen, 180 stafilokok (90 KPS ve 90 KNS) suşunun, koagülaz pozitif ve negatif genlerinin biyofilm üretim oranları ve CRA, MP ve ST testleri ile pozitif ölçülmesi sonuçları sırasıyla, %77,7, %74,4 ve %66,6; %44,4 , %36,6 ve % 34,4; %61,1 , %55,5 ve %50,5'dir [10]. Kongo red agar metodu ile biyofilm oluşturma yeteneği değerlendirimiş olup, 104 izolat biyofilm pozitif gen üzerinden, 61'inin fenotipik olarak biyofilm üretikleri tespit edilmiştir. S. epidermidis ve S. aureus izolatlarının biyofilm üretiminden sorumlu genlerin oranı sırasıyla %58,3(48/28) ve %59,9 (56/33) olarak tespit edilmiştir [18].

Tüm stafilokok türlerinin, koagülaz pozitif ve negatif genlerinin biyofilm üretim oranları ve CRA, MP ve ST testleri ile pozitif ölçülmesi sonuçları sırasıyla, %77,7,%74,4 ve %66,6; %44,4 ,%36,6 ve %34,4; %61,1 ,%55,5 ve %50,5'dir [10].

Yapılan diğer bir çalışmada da, ön blefaritli olgularda, hem çalışma grubunda, hem de kontrol grubunda izole edilen tek mikroorganizma koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak bulundu. Çalışma grubunda, kontrol grubuna göre, kültürde üreme sıklığı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek görülerek, çalışma grubunun %53'ünde üreyen KNS üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olarak bulundu [19].

Çalışmamız, BP suşlarda daha yüksek antibiyotik direnci saptanması ve BP suşlara karşı saptanan direnç oranının, BN suşlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark buluna-

maması ile Yıldırım ve ark.'nın [17], çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Biyofilmin derinlerinde yer alan mikroorganizmalar, metabolik olarak inaktif veya uyku halinin çeşitli evrelerindedir ve konak savunma sistemlerinden korunurlar. Bu tür organizmalar tipik olarak antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek dirence sahiptirler [20]. Staphylococcus aureus en sık hastane enfeksiyonu oluşturan patojen olup, bakteriyel tutunmayı ve biyofilm oluşmasına mediatörlük eden ekzopolisakkaritler sentezleyerek dirençli ve zor tedavi edilebilir enfeksiyonlar oluştururlar [21]. Görülmektedir ki, biyofilm üretimi, oluşan enfeksiyonlarda bir virulans ve kolonizasyon faktörüdür. Bu durum, her türlü invaziv girişimin arttığı çağımızda önem arz etmektedir. Sağlık çalışanlarının, enfeksiyon kontrol önlemlerine azami dikkat etmesi, enfeksiyonları önlemede ve tedavisinde önemli bir yer tutacaktır.

Çeşitli kliniklere, yara yeri enfeksiyonu ile başvuran hastaların, burunlarından izole edilen stafilokok suşlarının, yüksek oranda biyofilm ürettiği, biyofilm oluşumunun da stafilokok enfeksiyonlarında, önemli bir virulans faktörü olduğu, CRA yönteminin, biyofilm oluşturan stafilokok suşlarını saptamada pratik, güvenilir ve ucuz maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan stafilokok suşlarının, neden olduğu yara vakalarının tedavisinde, antibiyogramla birlikte CRA yönteminin kombine kullanımı, direnç gelişim mekanizmasını engelleyebilecek olan bir adım gibi gözükmektedir.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Bilgehan H, editör. Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. Gram olumlu koklar. İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi; 2000.s.239-68.
2. Veenstra GJ, Cremers FF, van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organisation and regulation of a biomaterial adhesion of staphylococcus epidermidis. J Bacteriol 1996:178(2);537-41.
3. Güler L, Ok U, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci 2005;88(9):3149-54.
4. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42(1):872- 4.
5. Christensen GD, Simpson WA, Younger JA, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985;22(6):996-06.
6. Clinical and Laboratory Standards Instute (CLSI) . Performance standarts for antimicrobial susceptibity testing: Fifteenth informational supplement. M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA, 2007.
7. Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton CT. Fomites and reservoirs of staphylococcus aureus causing intramammary infections as determineed by phage typing; the effect of milking time hygiene practices. Cornell Vet 1991;81(2):183-93.
8. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006;53(7):326-32.
9. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanaraynan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of staphylococcus aureus for biofilm formation. Vet Microbiol 2003;92(1-2):179-85.
10. Turkyılmaz S, Eskiizmirliler S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in staphylococcus strains isolated from various animal clinical samples. Turk J Vet Anim Sci 2006;30(1):201-6.
11. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F et al. Biofilm-forming ability profiling of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis mastitis isolates. Vet Microbiol 2006;118(1-2):133-40.
12. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L . Presence of ica A and ica D genes and slime production in collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001;39(6):2151-6.
13. Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M. Antibiotic susceptibility assay for staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. J Antimirob Chem 1999;44(1):43-55.
14. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: New techonology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999:37(6);1771-6.
15. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 2002;66(2):86-92.
16. El Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/ dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biyofilms of staphylococci. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2005;4(1):2.
17. Yıldırım N, Sezen IY, Ardıc N, Ileri C. Investigation of slime factor production and susceptibility to some antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from different clinical specimens. Turkish Journal of Infection 2008;22(4):209-14.
18. Duran N, Dogramaci Y, Ozer B, Demir C, Kalaci A. Detection of adhesin genes and slime production among staphylococci in orthopaedic surgical wounds. African Journal of Microbiology Research 2010:4(9);708-15.
19. Ozer Altıaylık P, Ortaarık Senocak Z, Ozek D, Tuncer CS. Results of conjunctival culture and antibiograms in cases with anterior blepharitis in Aksaray. Turkiye Klinikleri J Ophthalmol 2012;21(1):17-22.
20. Gül HC, Artuk C, Yıldız C. Protez enfeksiyonlarının tanı, tedavi ve yönetimi. J Clin Med 2013;4(4):332-9.
21. Yücel O. Küçük deney hayvanlarından rat. İçinde: Erşen Ö, Bilgiç S, editörler. Ratlarda osteomiyelit modeli. 1. Baskı. Ankara: Derman Tıbbi Yayıncılık; 2010.s.137-8.

How to cite this article:
Demir C, İnanç BB. Investigate Nasal Colonize Staphylococcus Species Biofilm Produced. J Clin Anal Med 2015;6(4): 414-8.