

## Bazı Antibiyotiklerin Biyofilm Oluşturan Stafilokok İzolatları Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ<sup>1\*</sup>, Selahattin KONAK<sup>2</sup>

**ÖZET:** Stafilokoklar çeşitli virülans faktörlere sahip olan patojen mikroorganizmalardır. Bu virülans faktörlerden birisi biyofilm üretimidir. Bazı stafilokoklar, biyofilm üreterek antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmektedir ve enfeksiyonların tedavisi zorlaşmaktadır. Bu çalışmanın amacı, daha önce bir çalışmada mastitisli inek sütlerinden izole edilmiş olan stafilokok izolatlarının planktonik ve biyofilm oluşturan formlarının üzerine vankomisin, eritromisin, oksasilin antibiyotiklerinin etkisini belirlemektir. Antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), biyofilm minimum inhibitör konsantrasyonu (MBİK) ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) değerleri belirlenmiştir. Antibiyotiklerin MİK, MBİK ve MBEK değerleri karşılaştırıldığında; en yüksek MİK değeri (32-64 µg ml<sup>-1</sup>) eritromisin için olduğu belirlenmiştir. MBİK ve MBEK değerleri ise tüm antibiyotikler için benzerlik göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda, stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturarak antibiyotiklere karşı daha dirençli hale geldikleri ve serbest yaşayan formlarına göre daha yüksek dozda antibiyotiklerden etkilendikleri saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik direnci, biyofilm, stafilokok

### Evaluation of the Effects of Some Antibiotics on Biofilm Forming Staphylococci Isolates

**ABSTRACT:** Staphylococci are pathogenic microorganisms that have various virulence factors. One of the most important of these virulence factors is biofilm production. Some staphylococci become resistant to antibiotics by producing biofilms and treatment of infections becomes more difficult. The aim of this study was to determine the effect of vancomycin, erythromycin, oxacillin antibiotics on planktonic and biofilm forming forms of staphylococci isolates which were isolated from mastitis cow's milk in a previous study. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), minimum biofilm eradication concentration (MBEC) values of antibiotics were determined. When the MIC, MBIC and MBEC values of antibiotics were compared; the highest range of MIC values was determined for erythromycin (32-64 µg ml<sup>-1</sup>). MBIC and MBEC values were similar for all test antibiotics. As a result of this study, staphylococci isolates were found to be more resistant to antibiotics by producing biofilm and were affected by higher doses of antibiotics than their free-living forms.

**Keywords:** Antibiotic resistance, biofilm, staphylococci

<sup>1</sup> Sevim Feyza ERDOĞMUŞ (Orcid ID: 0000-0002-4319-7558), Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şuhut SHMYO, Tıbbi Teknikler ve Hizmetler Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

<sup>2</sup> Selahattin KONAK (Orcid ID: 0000-0003-2551-7017), Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bayat M.Y.O. Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, e-mail: sfeyza@aku.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 04-09-2019

Kabul tarihi / Accepted: 14-12-2019

## GİRİŞ

Mastitis sağmal hayvanlarda değişik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, meme kanalları, alveoller ve interstisyel dokunun yangısı ile karakterize bir meme hastalığıdır. Mastitisler birçok patojen mikroorganizma tarafından oluşturulmakla beraber, mastitis vakalarından *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. ve Koliform grubu bakteriler sıklıkla izole edilmektedir (İkiz ve ark., 2013). Bakteriyel etkenler arasında *Staphylococcus aureus* ve diğer *Staphylococcus spp.*'ler en sık izole edilen mikroorganizmalardır (Akan ve ark., 2001; Aslantaş ve Demir, 2016). Klinik ve subklinik karakterde, akut ve kronik seyirli olabilen mastitisler süt sığıru yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara yol açtığı için tüm dünyada önemli bir sorun oluşturmaktadır (Zecconi and Scali, 2013; Pitkala et al., 2014). Türkiye'de son yıllarda yüksek verimli kültür ırklarının süt sığırcılığında kullanımının artması, beraberinde süt üretiminde artış görülmesine rağmen hayvanlarda görülen mastitis, özellikle subklinik mastitis nedeniyle önemli derecede ekonomik kayıplar oluşmaktadır (Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006).

Micrococcaceae familyasından olan *Staphylococcus spp.*'ler gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz, katalaz pozitif olan bakterilerdir (Akan ve Kınık, 2014). İnsanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojen olan stafilocoklar çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *Staphylococcus aureus*'un insanlarda çeşitli enfeksiyonlara (follikülit, fronkülit, impetigo, tonsilit, stafilocok anjinleri, pnömoni, sepsis, endokardit, tromboflebit, otitis media, menenjit, perinefritik abse vb.) sebep olduğu bilinmektedir (Smeltzer 2000, Grinholc et al., 2007, Victoria et al., 2013). Hayvanlarda ise en yaygın görülen hastalık sığırlarda meme bezlerinde oluşan mastitistir (Lange et al., 2015; Bardiaua et al., 2016). Stafilocokların sebep oldukları enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklerden yararlanılmaktadır. Ancak hastalıkların tedavisinde uygun olmayan antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç oluşturmalarına sebep olmaktadır. Günümüzde tedavide kullanılmakta olan birçok antibiyotik etkisiz kalmış ve bakteriler etki spektrumları içinde buldukları antibiyotiklerden etkilenmez hale gelmişlerdir (Çiftci ve Aksoy, 2015). Bugüne kadar yapılmış olan pek çok çalışmada, stafilocokların antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Kuyucuoğlu ve Uçar, 2002; Uçan ve Aslan, 2002; Saidi et al., 2015; Haaber et al., 2017).

Stafilocokların virülans faktörlerinden birisi olan biyofilm tabakası oluşturmaları, bu mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme yeteneklerini artırmaktadır (Percival et al., 2015; Melchior et al., 2006; Miao et al., 2017; Erdoğan ve Konak, 2019). Bu durum stafilocokların öncelikli patojenler arasında yer almasına neden olmaktadır. Biyofilm, bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. Bu sayede mikroorganizmaların çevre şartlarından etkilenmemesini sağlayan korunaklı bir yapı oluşmuş olur. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları bağışıklık sistemi tarafından tanınmalarını engeller ve fagosite edilmeleri güçleşir. Yapılan çalışmalar; biyofilm oluşturabilen bakterilerin, antibiyotiklere karşı planktonik (serbest) formlarına göre 100-100000 kat daha dirençli olabileceklerini göstermiştir. Mikrobiyal direncin gelişmesinde, biyofilm içerisindeki oksijen yoğunluğu önemlidir. Oksijen, biyofilmin yüzey katmanlarında tüketilir ve dip kısımlarda oksijensiz ortam oluşur. Bu sebeple, bazı antibiyotiklerin etkinliği azalır ve antimikrobiyal direnç gelişebilmektedir. Ayrıca, bakteri metabolizması sonucunda biyofilm içerisinde oluşan asidik atık maddelerden dolayı pH değişir ve bu değişim bazı antibiyotikler üzerinde antagonistik etkilere sebep olmaktadır (Mah and O'Toole, 2001; Altun ve Şener, 2008). Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençli hâle gelmesinde, antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarım kolaylığının olması önemli rol oynamaktadır (Savage et al., 2013). Bu bakteriler biyofilmden

ayrıldıklarında ise yine duyarlı hale gelebilirler (Yüksekdağ ve Baltacı, 2013; Szczuka and Kaznowski, 2014).

Bu çalışmanın amacı, daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmadan izole edilmiş ve biyofilm oluşturdukları saptanmış olan stafilokok izolatları üzerine vankomisin, eritromisin, oksasilin antibiyotiklerinin etkisini ortaya çıkarmaktır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan stafilokok izolatları daha önce yapılan bir çalışmada Dr. Öğr. Üyesi Selahattin KONAK tarafından mastitisli ineklerin sütlerinden izole edilerek klasik yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Ayrıca biyofilm oluşturma yetenekleri AKÜ 17. KARİYER. 91 no'lu proje çalışmasında belirlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır. İzolatlar, %2 (w/v) glikoz içeren TSA (Tryptone Soy Agar) besiyeri hazırlanarak bakterilerin ekimleri yapılarak üremeleri için 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları CLSI standartlarına göre test edilmiştir (CLSI, 2016). Stafilokok izolatları 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kullanılarak vankomisin (Sigma-Aldrich V0045000), eritromisin (E5389 Sigma), oksasilin (28221 Sigma) antibiyotiklerinin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri belirlenmiştir. Çalışılan antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri, besiyeri olarak 25 mg L<sup>-1</sup> kalsiyum ve 12.5 mg L<sup>-1</sup> magnezyum ilaveli Mueller Hinton buyyon (MHB) kullanılarak standart mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde; antibiyotiklerin 0.125-1 024 µg ml<sup>-1</sup> arasında ikişer kat artan konsantrasyonlarının 100 µl'lik miktarı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına dağıtılmıştır. İzolatların taze kültürleri 0.5 McFarland yoğunluğunda ve 1x10<sup>6</sup> kob ml<sup>-1</sup> mikroorganizma içerecek şekilde MHB içerisinde seyreltilmiştir. Her bir bakteri kültüründen 100 µl alınarak içerisinde artan konsantrasyonlarda (0.125-1 024 µg ml<sup>-1</sup>) antibiyotikler bulunan 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına aktarılmıştır. Mikrotitrasyon plaklarının 37°C'de 18-20 saat inkübasyonu sonrasında bulanıklığın görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturmaları sağlandıktan sonra antibiyotiklerin etkisi de araştırılmıştır. Bunun için taze kanlı agarda 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra üretilen bakteriler TSB içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanmıştır. Bunlar 1x10<sup>6</sup> kob ml<sup>-1</sup> mikroorganizma içerecek şekilde TSB içerisinde seyreltilmiştir. Buradan 200'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağına aktarılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, süpernatant aspire edilmiştir ve mikrotitrasyon plağı iki defa distile su ile yıkanmıştır. Çalışılan antibiyotikler distile suda çözdürüldükten sonra ikişer kat artan 0.125-64 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda ve 640-1 280 µg ml<sup>-1</sup> değerlerinde yüksek konsantrasyonlarda olacak şekilde TSB içerisinde sulandırılarak 200 µl'si kuyucuklara eklenmiştir. Mikrotitrasyon plakları 37°C'de 20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda biyofilm minimum inhibitör konsantrasyon (MBİK) değerleri belirlenmiştir. Üremenin gözle görülmediği en düşük konsantrasyon MBİK olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca inkübasyon sonunda mikrotitrasyon plağı iki kez distile su ile yıkanarak antibiyotikler uzaklaştırılmıştır. Tüm kuyucuklara 200'er µl taze TSB konularak 6 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuk içeriğinin 10 µl'si alınarak kanlı agara ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra üreyen koloniler sayılarak minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyon (MBEK) değerleri bulunmuştur. MBEK, biyofilmdeki bakterilerin %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır (Sümerkan ve Gökahmetoğlu, 1998). Negatif kontrol olarak ekim yapılmamış TSB içeren kuyucuk kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Micrococcaceae familyası üyesi olan stafilokoklar, toprakta, suda, havada ve bitkilerde yaygın olarak bulunan ayrıca bunların dışında insan ve hayvanların derileri üzerinde doğal florayı oluşturan mikroorganizmalardır. Patojen olan stafilokoklar hem insan hem de hayvan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir (Kloos and Bannerman, 2005). Mastitis etkeni olan stafilokoklar, çeşitli enfeksiyöz hastalıklara yol açmakla beraber insanlarda menenjit, septisemi, artrit, dermatit, endokardit ve eklem romatizmalarına neden olmaktadır. Mastitis, süt veriminde azalma, artan tedavi giderleri, yüksek oranda hayvanların kesime sevk edilmesi ve ölümlere sebebiyet vermeleri nedeniyle süt sığırı yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir meme dokusu hastalığıdır. Yapılan çalışmalar; stafilokokların gıda üretiminin herhangi bir aşamasında gıdaları kolaylıkla kontamine edebildiğini göstermiştir. Genellikle gıda zehirlenmelerinin birincil sebebidirler (Bendahou et al., 2008; Gündoğan ve Ataol, 2002). Gıda işletmelerinde sanitasyon basamaklarında meydana gelen bazı eksik uygulamalar nedeniyle herhangi bir yüzeyde kolaylıkla biyofilm tabakası meydana gelebilir. Bu konuyla ilgili pek çok araştırmalar yapılmıştır, özellikle biyofilm oluşumunun engellenmesiyle ilgili yeni araştırmaların yapılması oldukça önem arz etmektedir (Akan ve Kınık, 2014).

**Çizelge 1.** Test antibiyotiklerinin Stafilokok izolatları üzerindeki MİK, MBİK ve MBEK değerleri ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

İzolat numaraları	Vankomisin			Eritromisin			Oksasilin		
	MİK	MBİK	MBEK	MİK	MBİK	MBEK	MİK	MBİK	MBEK
Kontrol	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S1	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S2	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S3	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S4	16	640	>1 280	32	640	>1 280	8	640	>1 280
S5	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S7	32	640	>1280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S8	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S11	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S12	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S14	16	640	>1280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S15	32	640	>1280	64	640	>1 280	8	640	>1 280
S16	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S20	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S21	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	320	>1 280
S22	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S23	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S24	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S25	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S26	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S28	16	640	>1 280	32	640	>1 280	16	640	>1 280
S29	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S30	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S32	32	640	>1280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S33	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S34	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	320	>1 280
S36	16	640	>1 280	64	640	>1 280	8	640	>1 280
S38	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S42	32	640	>1280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S43	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S44	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S46	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S47	32	640	>1 280	32	640	>1 280	16	640	>1 280
S48	32	640	>1 280	64	640	>1 280	8	640	>1 280
S49	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S50	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S51	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S52	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S53	32	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280
S54	16	640	>1 280	64	640	>1 280	16	640	>1 280

Bu çalışmada, stafilokok izolatları üzerine vankomisin, eritromisin, oksasilin antibiyotiklerinin etkisini belirleyebilmek için MİK, MBİK ve MBEK değerleri saptanmıştır. Stafilokok izolatları için farklı antibiyotiklerin MİK, MBİK ve MBEK değerleri karşılaştırıldığında; en yüksek MİK değeri

aralığının 32-64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  değeri ile eritromisin için olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). En düşük MİK değeri aralığı ise 8-16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  değeri ile oksasilin için saptanmıştır. Stafilokok izolatlarında vankomisin için MBİK değeri, en düşük MİK değerinin 40 katı olarak ve MBEK değeri MİK değerinin 80 katı olarak belirlenmiştir. Eritromisin için MBİK değeri, en düşük MİK değerinin 20 katı ve MBEK değeri, en düşük MİK değerinin 40 katından fazla olduğu saptanmıştır. Oksasilin için MBİK değeri en düşük MİK değerinin 80 ve MBEK değeri MİK değerinin 160 katından fazla olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasında en az 3 mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Moleküler filtre mekanizmasının özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesinde en önemli mekanizma olduğu belirtilmiştir. Antibiyotiklerle maruz kalmış olan biyofilmlerin kenar kısımlarında bakteriler üzerinde bakterisidal etki belirlenirken, daha derin olan iç kısımlarda yaşayan bakterilerin hayatta kaldıkları saptanmıştır. Bu bakterilerin yeniden enfeksiyon gelişiminde bir nidus oluşturdukları belirtilmiştir. Biyofilmin iç tabakası strese karşı bakterileri korumaktadır (Post et al., 2014; Mathur et al., 2005). Biyofilm içerisinde yaşayan bakterilerin, planktonik bakterilerle karşılaştırıldıkları zaman farklı gen ekspresyon ifadelerinin olduğu saptanmıştır (Resch et al., 2005; Kaya, 2016). Bu durum, planktonik benzerlerinden fenotipik olarak farklı özelliklere sahip bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Biyofilmlerin birden fazla hücre türünden oluşabilmeleri biyofilm içerisinde yaşayan bakterilerin hayatta kalma şanslarını artmaktadır (Post et al., 2014). Biyofilm oluşumu için gerekli pH, CO<sub>2</sub>, divalent katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, primidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir. Biyofilm oluşumunu kolaylaştıran bu mikroçevre değişkenleri özellikle aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolidlerin antibakteriyal etkisini negatif yönde etkileyerek antibiyotik direncini oluşturmaktadır (Jefferson, 2014). Biyofilm oluşumunun erken aşamalarında; henüz hücre birikimi ve polisakkarit madde üretimi gerçekleşmeden planktonik ve bağlı hücrelerin fizyolojileri arasındaki farklar çalışmalarda gösterilmiştir (Mah and Toole, 2001; Stewart, 2002). Tutunmuş bakterilerin planktonik bakterilere göre, metabolizmasındaki azalma, membran potansiyellerinde belirgin bir düşüşle gösterilmiştir. Özellikle beta-laktam ve glikopeptid direncinde tutunmuş bakterilerin üremelerindeki azalma ve filtre mekanizması etkili olmaktadır. Bakterilerin büyüme oranlarındaki değişiklikler antibiyotik cevaplarını da değiştirmektedir. Biyofilm oluşturabilen bakterilerin büyüme hızlarının planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. *S.aureus*'ların biyofilm oluşturma süresi ile antibiyotik direncinde artış olduğu gösterilmiştir. Beslenmesi zayıflatılarak büyüme oranları düşürülen *S.aureus*'lara hiçbir antibiyotiğin yeteri kadar etkili olamadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bulgular biyofilmin bakteri beslenme ve büyümesini etkileyerek antibiyotiklere karşı direnç gelişimini sağladığını göstermektedir (Post et al., 2014).

Bazı çalışmalarda biyofilmin kendisinin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir (Rachid et al., 2000; Cunha, 2005). Wilcox ve ark. (2001) intravasküler kateterlerin içerisine vankomisin ve linezolid infüzyonu yaparak, oluşmuş biyofilm içerisindeki antibiyotik konsantrasyonunu değerlendirmişlerdir. Vankomisin biyofilm içerisindeki konsantrasyonunun linezolid oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Wilcox et al., 2001). Bunun nedeninin glikokaliks yapısının glikopeptidleri bağlaması olarak açıklamışlardır. El-Azizi ve ark. (2005) sağlam ve dağılmış biyofilm oluşumundaki üç klinik stafilokok izolatının linezolid, vankomisin, dalfopristine/quinupristine duyarlılıklarını MİK değerleriyle karşılaştırmışlardır. Biyofilm bakterilerinin planktoniklere ve dağılmış biyofilm oluşumundakilere oranla antibiyotiklere karşı çok daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Dalfopristin/quinupristinin biyofilm oluşumundaki bakterileri öldürme etkisi doza bağımlı görülmemiştir. Buna karşın vankomisin doza bağımlı olarak yüksek konsantrasyonlarda (500-1000  $\mu\text{g/ml}$ ), biyofilm oluşumundaki bakterilere, daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışma

sonuçlarımız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Diğer bir çalışmada Nishimura ve ark. (2006), artroplasti vakalarından izole edilen altı stafilokok suşunda yapılan vankomisin denenmiş ve biyofilmdeki bakteriler ile planktoniklerin MBK değerleri karşılaştırıldığında belirgin fark bulmuşlardır. Planktoniklerin MBK değerleri 0.5-1 µg ml<sup>-1</sup> iken, biyofilmdeki bakterilerin MBEK değerleri bir izolatta 512 µg ml<sup>-1</sup>, diğerlerinde ise 1 024 µg ml<sup>-1</sup>'nin üzerinde bildirilmiştir (Nishimura et al., 2006).

Pitkala ve ark. (2004), Finlandiya'da izole edilen bazı mastitis patojenlerinin çeşitli antimikrobiyal maddelere in vitro duyarlıklarının tespitine yönelik yaptıkları diğer bir araştırmada, *S. aureus* suşuna yönelik MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin; sefalotin için 0.25-0.5 µg ml<sup>-1</sup>, eritromisin için 0.5-0.5 µg ml<sup>-1</sup> ve oksasilin için 1.0-2.0 µg ml<sup>-1</sup>, oksitetrasiklin için 1.0-1.0 µg ml<sup>-1</sup> olarak bulunduğu ve incelenen suşların %52.1'inin penisiline, %5.12'inin oksitetrasikline %1.5'inin eritromisine ve %4.1'inin de oksasiline dirençli olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada Tetik vd. (2010), metisiline dirençli, biyofilm oluşturabilen stafilokoklar üzerinde çeşitli antibiyotiklerin etkisini araştırmışlardır. Test bakterilerinin tamamı vankomisine, teikoplanine ve linezolide duyarlı bulunmuştur. Siprofloksasin, ofloksasin, eritromisin, sefazolin, gentamisin, klindamisin, tetrasiklin ve rifampisin direnci biyofilm oluşturan stafilokok izolatlarında, biyofilm oluşturmaya göre daha yüksek oranda saptanmıştır.

## SONUÇ

Patojen mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilm tabakası onları antibiyotiklere karşı daha dirençli hale getirmektedir. Bu durum mikrobiyal hastalıkların tedavisini zorlaştırmaktadır. Biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmaların tespit edilmesi ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi hastalıkların tedavisi bakımından oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada; daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmadan izole edilmiş ve biyofilm oluşturdıkları saptanmış olan stafilokok izolatları üzerine vankomisin, eritromisin, oksasilin antibiyotiklerinin etkisi ortaya çıkarılmıştır. Sonuç çalışmada kullanılan stafilokok izolatlarının serbest yaşayan formlarına göre biyofilm oluşturan formlarının antibiyotiklerin daha yüksek konsantrasyonlarından (20-160 kat daha yüksek) etkilenebildikleri saptanmıştır. Bu durum, stafilokokların biyofilm oluşturarak test edilen antibiyotiklere karşı direnç kazandıklarının bir göstergesidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, AKÜ BAP 17. KARİYER. 91 no'lu proje tarafından desteklemiştir.

## KAYNAKLAR

- Akan E, Kımık Ö, 2014. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 14: 42-51.
- Altun HU, Şener B, 2008. Biyofilm İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Hacettepe Tıp Dergisi, 39: 82-88.
- Aslantaş Ö, Demir C, 2016. Investigation of the Antibiotic Resistance and Biofilm-Forming Ability of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Bovine Mastitis Cases. Journal of Dairy Science, 99 (11): 8607-8613.
- Bardiaua M, Caplinb J, Detilleuix J, Graberd H, Moronie P, Taminioug B, Mainila JG, 2016. Existence of Two Groups of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis Based on Biofilm Formation, Intracellular Survival, Capsular Profile and Agr-typing, Veterinary Microbiology, 185: 1-6.
- Belbase A, Pant ND, Nepal K, Neupane B, Baidhya R, Baidya R, Lekhak B, 2017. Antibiotic Resistance and Biofilm Production Among the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Pus/Wound Swab Samples in a Tertiary Care Hospital in Nepal, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, Doi: 10.1186/s12941-017-0194-0.
- Bendahou A, Lebbadi M, Ennane L, Essadqui FZ, Abid M, 2008. Characterization of *Staphylococcus* Species Isolated from Raw Milk and Milk Products in North Morocco, Journal of Infection in Developing Countries, 2(3): 225-218.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26 th Edition, CLSI Supplement M100S, Wayne, PA.
- Cucarella C, Tormo MA, Beda CU, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR, 2004. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*, *Infection and Immunity*, 72: 2177-2185.
- Cunha BA, 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Clinical Manifestations and Antimicrobial Therapy, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1: 33-42.
- Çiftci A, Aksoy A, 2015. Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 1(2): 1-10.
- El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N, 2005. In Vitro Activity of Vancomycin, Quinupristin/Dalfopristin and Linezolid Against Intact and Disrupted Biofilms of Staphylococci. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Doi:10.1186/1476-0711-4-2.
- Erdoğan SF, Konak S, 2019. Determination of the Biofilm Production Capabilities of *Staphylococcus* spp. and the Effects of Some Antibiotics on These Isolates. *Fresenius Environmental Bulletin*, 7: 5253-5259.
- Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J, 2007. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50: 375-379.
- Gündoğan N, Ataol Ö, 2012. Et Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif Stafilocok'ların Biyofilm Üretimi ve DNaz Aktivitelerinin Belirlenmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3): 135-142.
- Haaber J, Penades JR, Ingmer H, 2017. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 25(11): 893-905.
- İkiz S, Başaran B, Bingöl EB, Çetin Ö, Kaşıkçı G, Özgür NY, Uçmak M, Yılmaz Ö, Gündüz MC, Sabuncu A, 2013. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37 (5):569-574.
- Jefferson KK, 2004. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236: 163-173.
- Kloos WE, Bannerman TL, 2005. Update on Clinical Significance of Coagulase Negative *Staphylococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 117-140.
- Kaya F, 2016. Süt İşletmelerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında *icaA* ve *icaD* Genleri ve Biyofilm Üretiminin Tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kuyucuoğlu Y, Uçar M, 2002. Afyon Bölgesi Süt İneklerinde Subklinik ve Klinik Mastitislerin Görülme Oranları ve Etkili Antibiyotiklerin Tespiti. *Veteriner Hekimler Mikrobiyoloji Dergisi*, 1: 19-24.
- Lange CC, Brito MAVP, Reis DRL, Machado MA, Guimaraes AS, Azevedo ALS, Salles EB, Alvim MCT, Silva FS, Meurer IR, 2015. Species Level Identification of Staphylococci Isolated From Bovine Mastitis in Brazil Using Partial 16S rRNA Sequencing, *Veterinary Microbiology*, 176: 382-388.
- Mah TFC, O'Toole GA, 2001. Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends in Microbiology*, 9:34-39.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A, 2005. Adverse Effect of Staphylococci Slime on in Vitro Activity of Glycopeptides, *Japanese Journal of Infection Disease*, 58: 353-357.
- Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W, 2006. Comparative Assessment of the Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Biofilm Versus Planktonic Culture. *Journal of Veterinary Medicine B*, 53: 326-332.
- Miao J, Liang Y, Chen L, Wang W, Wang J, Li B, Li L, Chen D, Xu Z, 2017. Formation and Development of *Staphylococcus* Biofilm: with Focus on Food Safety. *Journal of Food Safety*, Doi: 10.1111/jfs.12358.
- Nishimura S, Tsurumoto T, Yonekura A, Adachi K, Shindo H, 2006. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Isolated From Infected Total Hip Arthroplasty Cases, *Journal of Orthopaedic Science*, 11: 46-50.
- Osman KM, Amer AM, Badr JM, Helmy NM, Elhelw RA, Orabi A, Bakry M, Saad ASA, 2016. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation and *mecA* Characterization of Methicillin Susceptible *S. aureus* and non-*S. aureus* of Beef Meat Origin in Egypt. *Frontiers in Microbiology*, Doi:10.3389/fmicb.2016.00222.
- Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G, 2015. Healthcare-Associated Infections, Medical Devices and Biofilms: Risk, Tolerance and Control. *Journal of Medical Microbiology*, 64: 323-334.

- Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T, 2004. Bovine Mastitis in Finland 2001-Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 87: 2433-2441.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD, 2004. The Role of Biofilms in Otolaryngologic Infections, *Current Opinion of Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 12: 185-190.
- Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W, 2000. Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesion Expression in Biofilm Forming *Staphylococcus epidermidis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3357-3363.
- Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Gotz F, 2005. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated Under Biofilm and Planktonic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2663-2676.
- Sabuncuoğlu N, Çoban Ö, 2006. Mastitis Ekonomisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(1-2):1-5.
- Saidi R, Cantekin Z, Khelef D, Ergün Y, Solmaz H, Kaidi R, 2015. Antibiotic Susceptibility and Molecular Identification of Antibiotic Resistance Genes of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Algeria. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21 (4): 513-520.
- Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ, 2013. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 1968-1970.
- Smeltzer MS, Gillaspay AF, 2000. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poultry Science*, 79: 1042-9.
- Stewart PS, 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292:107-113.
- Sümerkan B, Gökahmetoğlu S, 1998. MIC, MBC Testleri, Rutindeki Önemi ve Uygulamaları. *Flora*, 3(2): 91-95.
- Szczuka E, Kaznowski A, 2014. Antimicrobial Activity of Tigecycline Alone or In Combination With Rifampin Against *Staphylococcus epidermidis* in Biofilm, *Folia Microbiologica (Praha)*, 59: 283-288.
- Şahin R, 2007. *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale.
- Tetik T, Eryılmaz M, Akın A, 2010. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilocok Suşlarında Slime Oluşumu ve Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin Araştırılması. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39 (3): 187-194.
- Uçan SU, Aslan E, 2002. Penicillin Resistance and Antimicrobial Susceptibilities of Coagulase Positive Staphylococci Isolated from Bovine Mastitic Milk Samples. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 18 (3): 19-22.
- Victoria J, Savage IC, O'Neill AJ, 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4): 1968-1970.
- Wilcox MH, Kite P, Mills K, Sugden, S, 2001. In Situ Measurement of Linezolid and Vancomycin Concentrations in Intravascular Catheter-Associated Biofilm, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 171-175.
- Yüksekdağ ZN, Baltacı N, 2013. *Staphylococcus aureus* Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43(3): 77-83.
- Zecconi A, Scali F, 2013. *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Evasion from Innate Immune Defenses in Human and Animal Diseases. *Immunology Letters*, 150: 12-22.