

Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler

Zehra Nur YÜKSEKDAĞ, Nurnehir BALTACI

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Staphylococcus aureus hastalık etkeni olan önemli bir mikroorganizmadır ve biyofilm yapımı gibi birçok önemli virülans faktörü oluşturmaktadır. Hastalarda kronik enfeksiyonların kalıcılığıyla ilgili olduğu düşünülen biyofilm üretimi, son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir konudur. Biyofilm, serbest yaşayan organizmaların uygun bir yüzeye tutunup kümeleşerek ürettikleri matris ile oluşturdukları tabakadır. Bu tabaka, *S. aureus*'ların antibiyotiklere karşı dirençli olmasını sağladığı ve konak tarafından fagositozuna engel olduğu için, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır. *S. aureus* türünde biyofilm tabakasının oluşumundan *icaADBC* lokusu ve bazı proteinler sorumlu tutulmaktadır. Bu derlemede, *S. aureus* türü bakterilerde biyofilm oluşumundan sorumlu olan *icaA*, *icaD* ve *bap* genlerinin birbirleri ve fenotipik ifadeleri arasındaki ilişkinin özetlenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, biyofilm, *icaADBC*

SUMMARY

Biofilm Formation in Staphylococcus aureus and the Genetic Factors Responsible for Biofilm Formation

Staphylococcus aureus which is an important pathogen, is known to have several virulence factors including biofilm formation. Biofilm formation is usually associated with chronic infections and has become a subject of interest in a wide area of research. Biofilm is an adherent structure formed by bacteria encased within a matrix produced on natural body surfaces or medical devices. Since biofilm producing *S. aureus* are more resistant to antibiotics and biofilms prevent phagocytosis, the treatment of biofilm positive *S. aureus* infections is difficult. The *icaADBC* locus and some proteins have been shown to be responsible for the formation of *S. aureus* type biofilm strata. The objective of this study was to summarize the relationships among *icaA*, *icaD* and *bap* genes and between phenotype expressions which are responsible for the formation of biofilm in *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, *icaADBC*

GİRİŞ

Eubacteria âlemi, *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* takımı, *Staphylococcaceae* ailesi içerisinde yer alan *Staphylococcus* cinsi bakteriler, önemli bir enfeksiyon etmenidir. *Staphylococcus* genusunda 30'dan fazla tür bulunmaktadır^(1,2). Genel karakter olarak stafilkoklar yuvarlak, 0.5-1.5 µm çapında, çoğu kez düzensiz kümeler, bazen tetrat, ikiyeşerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülen Gram pozitif bakterilerdir. Stafilkoklar hareketsiz, fakültatif aerobik, yüksek konsantrasyonda tuz içeren besiyerlerinde (%10 NaCl) ve 18-40 °C aralığında üreyebilmektedir. Her ne kadar hareketsiz,

sporsuz, kapsülsüz olarak bilinseler de, bazı *S. aureus* suşları organizmadan ilk izole edildiklerinde kapsüllü olabilmektedir^(3,4). Stafilkokların, kapsül, protein A, peptidoglikan tabakası, teikoik asit gibi hücre duvarında bulunan yapılar, oluşturdukları koagülaz, hemolizinler, deoksiribonükleaz (DNaz), hyaluronidaz, fosfataz ve virülansla ilgili olduğu bilinmektedir^(1,2,4-6).

Stafilkoklar tıp tarihinde ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1881 yılında Alexander Ogston tarafından, farelerde hastalık yaptığı gösterilmiştir. 1940 yılında penisilin klinik kullanımına girmesiyle, tıp tarihinde önemli enfeksiyon etmeni olarak bilinen stafilo-

Alındığı tarih: 16.05.2014

Kabul tarihi: 28.11.2014

Yazışma adresi: Zehra Nur Yüksekdağ, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

e-posta: zehranur@gazi.edu.tr

kokların neden oldukları enfeksiyonların tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır⁽⁷⁾. Geleneksel antibiyotik kullanımlarına bağlı olarak stafilkoklarda gelişen metisilin ve çoklu antibiyotik direnci, stafilkok enfeksiyonlarının tedavilerini zorlaştırmaktadır⁽⁸⁾. Bu nedenle yeni nesil araştırmalar, stafilkokların enfeksiyona neden olan genlerinin ve enfeksiyon mekanizmalarının araştırılması üzerine yoğunlaşmaktadır.

Stafilkoklar insanlar ve hayvanlar üzerinde çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Staphylococcus aureus* insanlarda genel enfeksiyonlara (follikülit, fronkülit, Ritter hastalığı, impetigo, tonsilit, stafilkok anjinleri, pnömoni, sepsis, endokardit, tromboflebit, otitis media, menenjit, perinefritik abse vb.), ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarına, osteomyelit gibi rahatsızlıklara neden olmaktadır⁽⁹⁻¹¹⁾. Stafilkokal bakteri örneklerinin insan kökenli izolasyonları daha çok introvasküler kataterlerden, endotrakeal ve trakeotomi borularından, periton diyaliz borularından, kontak lenslerden, protezlerden ve biyomateryallerden gerçekleştirilmektedir⁽¹⁰⁻¹³⁾. Hayvanlar üzerinde neden oldukları en önemli hastalık ise sığırlarda meme bezlerinde kronik ya da enfeksiyona bağlı olarak oluşan “mastit”dir⁽¹⁴⁾. Pek çok hayvan hastalığı arasında sığır mastiti, mandıra hayvanlarında tedavisi oldukça pahalı olan bir hastalıktır⁽¹⁵⁾.

S. aureus türü bakteriler ortam şartlarına oldukça dayanıklı ve çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. Özellikle bu bakterilerin patojenite özellikleri, fagositoza karşı direnç sağlayan biyofilm tabakası ile kombine olduğunda virülansı oldukça yükselmektedir^(16,17). Bu nedenle de öncelikli patojenler arasında yer almaktadır^(18,19).

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri

dönüşümsüz olarak tutunmuş hâlde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur^(20,21). Biyofilm tabakası, içindeki bakterilerin çevre şartlarından etkilenmemesini sağlayan korunaklı bir yapıdır⁽²²⁾. Bir biyofilm tabakasının oluşmasında protein ve ekzopolisakkaritten oluşan hücre dışı matriks ve tutunma yüzeyi önemli yer tutar⁽²³⁾. Bu bileşenlerden biri eksik olduğunda biyofilm oluşmamaktadır⁽²⁴⁾. Biyofilm yapısında %97 su olmak üzere, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır^(25,26). Yapılan genomik ve proteomik çalışmalar, biyofilm gelişimi ile ilgili birçok genin bulunmasına neden olmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adhezyon, yoğunluğa bağlı algılama (quorum sensing), hücre duvar yapımı, metabolizma, stres yanıtı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları rapor edilmektedir⁽²⁷⁻²⁹⁾.

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir⁽²²⁾. Antimikrobiyal ajanlara herhangi bir direnci bulunmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hâlde, biyofilmden ayrıldığında ise yine duyarlı hâlde dönüşebilmektedir⁽²⁶⁾. Biyofilm içerisindeki oksijen yoğunluğu mikrobiyal direncin gelişmesinde önemlidir. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda anaerobik ortam oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin etkinliği azalmakta ve antimikrobiyal direnç gelişebilmektedir. Ayrıca biyofilm içerisinde bakteri metabolizması sonucu oluşan asidik atık maddelerden dolayı pH'nın değişmesi ve bu değişimin bazı antibiyotikler üzerinde antagonistik etkileri bulunmaktadır^(30,31). Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli hâlde gelmesinde, biyofilmin antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarım kolaylığı sağlaması önemli rol oynamaktadır⁽³²⁾.

Biyofilm üretiminden sorumlu genler ve bu genlerin fenotipik olarak ifadesi

Stafilokoklarda biyofilm oluşumu çeşitli mekanizmaları içeren dinamik bir süreçtir^(21,33). Biyofilm tabakası iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada bakteriler, konak doku ligandları, katı yüzeyler gibi uygun yüzeylere, mikrobiyal yapıştırıcı matriks molekülleri olarak tanınan (microbial surface components recognizing adhezive matrix molecules, MSCRAMM) değişik yüzey proteinleri ile tutunmayı gerçekleştirmektedir^(17,22,34,35). İkinci aşamada ise, bakteriler diğer bakterilere tutunarak çok tabakalı (multilayer) biyofilmi oluşturmaktadır⁽¹¹⁾.

S. aureus'lar da bir operon olan, *icaADBC* gen kümesi bulunmaktadır. poli-N-süksinil-β-1-6 glikozamin (PIA-PNSG) polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden, *icaADBC* operonu sorumlu tutulmaktadır. *icaADBC* tarafından üretilen bu maktriğin ikinci aşamada hücrelerin birbirine yapışmasını sağlamakta etkili olduğu varsayılmaktadır^(13,36,37). Bu nedenle *icaADBC* gen kümesini barındıran *S. aureus* suşlarının, potansiyel biyofilm üreticisi olduğu düşünülmektedir⁽¹⁴⁾.

Yapılan çalışmalarda *ica* operonunda yer alan *icaA* geninin, UDP-N-asetilglukozaminden N-asetilglukozamin oligomerlerinin sentezinde yer alan N-asetilglukozamil transferaz üretiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir^(22,38-40). N-asetilglukozamin biyofilm tabakasının ana maddesini oluşturmaktadır. N-asetilglukozamin, hücreler arası agregasyonu sağlayan polisakkarit yapıda olan interselüler adhesin (PIA) oluşumundan sorumludur⁽⁴¹⁻⁴³⁾. *icaD* geni ise kapsüller polisakkaritin fenotipik ifadesinde önemli olan N-asetilglukozamiltransferaz'ın maksimum ekspresyonunda rol oynar⁽³⁸⁾. Yapılan çalışmalarda, *icaA* geni ile *icaD* geni arasında bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, *icaA* ve *icaD* genlerinin birlikte N-asetilglukozamini substrat

olarak kullanarak şeker oligomerlerinin sentezine aracılık ettikleri gösterilmiştir^(13,44). Ayrıca, *icaA* geninin tek başına düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gösterirken, *icaD* geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gözlemlenmiştir⁽³⁹⁾. Benzer olarak *icaC*'nin polisakkarit interselüler adhesini (PIA) ifade ettiği düşünülürken, *icaB* geninin tam olarak işlevi bilinmemektedir⁽⁴⁵⁾.

Özellikle mastit hastalığının, *S. aureus* ve diğer stafilokok türlerinin ürettikleri biyofilm tabakası nedeniyle olduğu, pek çok yazar tarafından kabul edilmektedir^(14,46-48). Bu nedenle mastitli sığırlardan izole edilen *S. aureus* suşları, *ica* lokusunu içermeleri ve *ica* lokusunun fenotipik ifadesinin in vitro koşullarda incelenmesi araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda değişik orijinlerden izole edilen *S. aureus* suşlarının biyofilm üretimleri ve *ica* gen bölgesi arasında birtakım tutarsızlıklar tespit edilmiştir. Vasudevan ve ark.⁽⁴⁴⁾, çalışmalarında klinik donörlerden veya hayvanlarda izole ettikleri ve biyofilm oluşturabildiği belirlenen *S. aureus*'larda *ica* genlerinden bazılarında ya da hiçbirine rastlamazken, biyofilm üretimi gözlenmeyen suşların *icaADBC* lokusu taşıdıklarını rapor etmişlerdir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada mastitli ineklerden izole edilen biyofilm oluşturabilen 99 *S. aureus* suşunun 74'ünde *ica* lokusu olmadığı bildirilmiştir⁽⁴⁹⁾. Benzer olarak Hindistan'daki başka bir araştırma da ise biyofilm üreticisi 102 *S. aureus* suşundan yalnızca 36'sında *icaA* ve *icaD* genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir⁽¹⁵⁾. Bu sonuçların aksine bazı araştırmalarda, izole edilen tüm *S. aureus* suşlarının biyofilm üreticisi ve *ica* gen kümesi sahibi oldukları gösterilmiştir^(50,51). Brezilya'da yapılan bir araştırmada izole edilen 94 *S. aureus* suşunun, 93'ünün biyofilm pozitif olduğu fenotipik yöntemlerle belirlenirken, 90 suşun *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduğu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiştir⁽⁵²⁾.

Polonya'daki mastitli ineklerden izole edilen 132 *S. aureus* suşunun hepsinde *icaA* ve *icaD* geni tespit edilmesine rağmen, fenotipik ifadeye dayalı deneyler sonucunda 76'sı biyofilm üretimi pozitif olarak bildirilmiştir⁽¹⁴⁾. Türkiye'de klinik örneklerden izole edilen 152 *S. aureus* suşu ile yapılan çalışmada, 136'sın da *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinin de bulunduğu, 74'ünün fenotipik olarak biyofilm pozitif olduğu rapor edilmiştir⁽²⁹⁾.

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, *ica* operonunun bulunması ve biyofilm üretiminin fenotipik olarak gözlemlenmesi arasında net bir pozitif korelasyon varlığından söz edilmemektedir. *icaADBC* operonunun ekspresyonu, faz varyasyonları ve genom düzenlemeleri tarafından modülasyon ile yüksek çeşitlilik göstermektedir^(15,53). Ayrıca, *ica* lokusunda meydana gelen nokta mutasyonları, PIA oluşumunu negatif regüle eden veya biyofilm oluşumuna etki eden ve nedeni henüz bilinmeyen faktörler^(13,44) *ica* lokusunun kapsüler polisakarit adhezyon genleri (PS/A) gibi çeşitli ürünleri, in vitro ortamdan çok in vivo ortamda yüksek oranda ifade etmesi^(44,54) ve in vitro ortamda oluşabilecek stres^(55,56) gibi faktörler biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Biyofilm oluşumundaki çeşitliliğe bakterinin bulunduğu üretim şartlarındaki farklılıklar da katkıda bulunmaktadır. İn vitro ortam şartlarının, konak dokusundaki şartlardan çok farklı olması, in vitro deneylerde besiyeri kompozisyonu^(15,57), glukoz varlığı ve konsantrasyonu, pH ve hidrojen peroksit gibi birtakım faktörlerin, biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilmektedir⁽²¹⁾.

Biyofilm tabakasının oluşumunda bazı yüzey proteinlerinin önemli katkısı olduğu bilinmektedir. *S. aureus* türünde çeşitli MSCRAMM'ler ile diğer önemli yüzey bileşenleri (PIA ve *bap*) bir arada bulunmaktadır. *S. aureus* suşlarından izole edilen bir protein olan "biofilm associated protein" (*bap*), biyofilm oluşumu için gerekli yapı-

lardan birisi olarak bildirilmiştir⁽¹⁷⁾. *Bap*, bakteri yüzeyinde yerleşmiş, yüksek molekül ağırlıklı, ardi ardına yineleyen C-domainlerini içeren, bakterilere yüksek biyofilm oluşturma kapasitesi sağlayan ve enfeksiyon sürecinde önemli rol oynayan 2276 aminoasitlik bir proteindir. Yapılan çalışmalarla, abiyotik yüzeylere yapışma ve intersellüler adezyon basamaklarının her ikisinde de görev yaptığı gösterilmiştir^(29,58). *Bap* geni bulunduran *S. aureus* suşlarının diğer biyofilm pozitif suşlara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu ifade edilmektedir^(17,34,47).

S. aureus suşlarındaki *bap* ile ilgili yapılan çalışmalar, *bap* geninin bulunma frekansının düşüklüğünden dolayı oldukça kısıtlıdır. *Bap* genine ağırlıklı olarak kronik sığır mastitlerinde rastlanılmıştır^(59,60). Cucarella ve ark.'nın⁽¹⁷⁾ yaptıkları çalışmada, mastitli sığırlardan izole edilen 350 *S. aureus* suşunun yalnızca %5'inde *bap* geni tespit ederlerken, insanlardan izole edilen 75 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *bap* genine rastlanmamıştır. Vautor ve ark.'nın⁽⁶¹⁾ 262 *S. aureus* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların hiçbirinde *bap* geni bulunmamıştır. İtalya'da yapılan bir araştırmada, mastitli ineklerden izole edilen 122 *S. aureus* suşunun yalnızca 5'inde *bap* geni tespit edilmiştir⁽⁶²⁾. Başka bir çalışmada ise, 40 *S. aureus* suşundan yalnızca birinin *bap* genine sahip olduğu bildirilmiştir⁽⁶³⁾. Kuvvetli biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan *bap* genine, hayvanlardan izole edilen suşlarda çok ender rastlanılırken, insan kaynaklı izolatlarda henüz tespit edilememiştir^(58,64). Bu nedenle bazı bilim insanları, konağa bağlı olan özel patojenik faktörlerin insan ve ruminantlarda birbirinden bağımsız olarak evrimleşmiş olabileceğini düşünmektedirler^(65,66). Vautor ve ark.⁽⁶¹⁾ ise, *bap* geninin insan ve hayvan orijinli *S. aureus* izolatları arasında henüz yeteri kadar yaygın olmadığı için prevalansının düşük olduğunu öne sürmektedir.

Sonuç

Önemli bir patojen olan *S. aureus* bakterisi konak olarak bulunduğu organizmada çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde uygun olmayan antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı, bakterilerin kısa sürede birden çok ilaca direnç geliştirmesini sağlamaktadır. Özellikle biyofilm tabakası oluşturan türlerin neden oldukları enfeksiyonlarda, biyofilm tabakasının antimikrobiyal ajanlardan korunma da bakterilere sağladığı avantajlar yüzünden, tedavileri daha zor ve daha uzun sürede olmaktadır. Bu nedenle *S. aureus* bakterilerinin oluşturdukları biyofilm mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Biyofilm mekanizmasında yer alan genlerin ve enzimlerin anlaşılması ile *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni nesil mekanizma bloke edici ilaçların üretilmesine ışık tutulabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes [electronic resource]. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3th ed. New York: Springer-Verlag, 2007.
2. De Vos P, Garrity G, Jones D, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Volume 3. New York: Springer, 2009.
3. Alen S, Koneman E, Janda W, et al. The Gram-positive cocci. Part 1: *Staphylococci* and related organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2006;539-76.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, with student consult Online Access. 7: Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences, 2012;174-87.
5. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003;384-404.
6. Winn WC, Allen SD, Janda WM, et al. Gram-Positive cocci. Part 1: *Staphylococci* and related Gram-positive organisms. In: Darcy P, eds. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins, 2006;623-71.
7. Haznedaroğlu T. Metisilin Dirençli *S. aureus* (MRSA), Korunma ve Kontrol. GATA Enfeksiyon Kontrol Komitesi, 2007 [http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf].
8. Doğan Ö, Yalınay Çırak M, Engin D, Türet S. Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda metisilin direnç ve çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Ankem Derg* 2005; 19:39-42.
9. Smeltzer MS, Gillaspay AF. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poultry Sci* 2000; 79: 1042-9. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/79.7.1042>
10. Jarraud S, Mougel Ch Thioulouse J, Lina G, et al. Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002; 70:631-41. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002>
11. Grinholt M, Wegrzyn G, Kurlenda J. 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 Immunol Med Microbiol* 2007; 50:375-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00262.x>
12. Robinson DL, Fowler VG, Sexton DJ, Corey RG, Conlon PJ. Bacterial endocarditis in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1997; 30:521-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(97\)90311-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(97)90311-5)
13. Cramton S, Gerke C, Schnell NF, Nicholson WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67:5427-33.
14. Szweđa P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland. *Pol J Microbiol* 2012; 61:65-9.
15. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production, in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 2010; 34:81-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-009-9326-0>
16. Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:598-603. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00028-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00028-4)
17. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183:2888-96. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>
18. Sudağından M, Aydın A. Lizozim ve nisinin gıda kaynaklı *Staphylococcus aureus* suşlarında gelişim ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri. *J Fac Vet Med Istanbul Univ* 2013; 39:254-63.
19. Cassat James E, Smeltzer MS, Lee CY. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* 2014; 1085:195-211. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1_12
20. Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Dendis M. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia Microbiol (Praha)* 2008; 53: 500-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-008-0078-y>
21. Nostro A, Cellini L, Ginestra G, et al. Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant. *APMIS*

- 2014; 122:648-53.
<http://dx.doi.org/10.1111/apm.12210>
22. **Szczuka E, Kaznowski A.** Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiol (Praha)* 2014; 59:283-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0296-9>
 23. **Laitman I, Natan M, Banin E, Margel S.** Synthesis and characterization of fluoro-modified polypropylene films for inhibition of biofilm formation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;115: 8-14.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.027>
 24. **Donlan RM.** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:881-90.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid0809.020063>
 25. **Simões M, Simões LC, Vieira MJ.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci Technol* 2010; 43:573-83.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
 26. **Çeçe EN.** *Staphylococcus epidermidis* biyofilmlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyofajların izolasyonu ve karakterizasyonu. [Yüksek lisans tezi], Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2011;16-23.
 27. **Davey ME, O'toole GA.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:847-67.
<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
 28. **Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD.** The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12:185-90.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.moo.0000124936.46948.6a>
 29. **Şahin R.** *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. [Tıpta uzmanlık tezi]. Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 2007; 14-23.
 30. **Mah TFC, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
 31. **Altun HU, Şener B.** Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2008; 39:82-8.
 32. **Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ.** *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:1968-70.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02008-12>
 33. **Agarwal A, Singh KP, Jain A.** Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 58:147-60.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00601.x>
 34. **Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F.** Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 2004; 103:241-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.002>
 35. **Pozzi C, Waters EM, Rudkin J, et al.** Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002626.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002626>
 36. **Kiedrowski MR, Horswill A.** New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1241:104-21.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x>
 37. **Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A.** Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol (Praha)* 2013; 58:47-52.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12223-012-0175-9>
 38. **Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM.** Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3:352-51.
 39. **Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L.** Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2151-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001>
 40. **Costa AR, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J.** The role of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in *Staphylococcus epidermidis* adhesion to host tissues and subsequent antibiotic tolerance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:623-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0684-2>
 41. **Götz F.** Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; 43:1367-78.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x>
 42. **Low DP, Waldvogel FA.** Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364:369-79.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5)
 43. **Öztuna V.** Osteomyelit patofizyolojisi ve tedavi prensipleri. *TOTBİD Derg* 2005; 4:63-71.
 44. **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; 92:179-85.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)
 45. **Vuong C, Otto M.** *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect* 2002; 4:481-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0)
 46. **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; 53:326-32.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00962.x>
 47. **Seixas R, Santos JP, Bexiga R, Vilela CL, Oliveira M.** Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. *J Dairy Sci* 2014; 97:340-4.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7130>
 48. **González-Ortiz G, Quarles Van Ufford HC, Halkes SB, et al.** New properties of wheat bran: anti-biofilm activity and interference with bacteria quorum-sensing systems. *Environ Microbiol* 2014; 16:1346-53.
<http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12441>
 49. **Melchior MB, van Osch MH, Graat RM, et al.** Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agrtype II strains. *Vet Microbiol* 2009; 137:83-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.004>
 50. **Fowler VG Jr, Fey PD, Reller LB, Chamis AL,**

- Corey GR, Rupp ME.** The intercellular adhesion (ica) locus is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* 2001; 189:127-31.
<http://dx.doi.org/10.1007/s430-001-8018-5>
- 51. Rohde H, Knobloch JKM, Horstkotte MA, Mack D.** Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4595-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.12.4595-4596.2001>
- 52. de Castro Melo P, Ferreira LM, Filho AN, Zafalon LF, Vicente HI, de Souza V.** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 119-24.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013005000031>
- 53. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W.** Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3357-63.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.12.3357-3363.2000>
- 54. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, et al.** Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 1999; 284: 1523-7.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5419.1523>
- 55. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT.** Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol* 2005; 107:295-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.005>
- 56. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, et al.** Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 2006; 118:133-40.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.008>
- 57. Atshan SS, Shamsudin MN.** Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Ann Microbiol* 2011; 61:825-31.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13213-011-0201-1>
- 58. Lasa I, Penadés JR.** Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 2006; 157:99-107.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>
- 59. Tormo MA, Ubeda C, Martí M, et al.** Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 2007; 153:1702-10.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/005744-0>
- 60. Babra C, Tiwari JG, Pier G, et al.** The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol (Praha)* 2013; 58:469-74.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0232-z>
- 61. Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R.** Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol* 2008; 127:407-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.018>
- 62. Snel GGM, Silva RKP, Malvisi M, Bonura C, Piccinini R.** Bap-positive *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in Italy. 5th Congress of European Microbiologists 2013; VET/05 [<http://hdl.handle.net/2434/226997>].
- 63. Darwish SF, Asfour HA.** Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Scientific World Journal* 2013; 2013:378492.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/378492>
- 64. O'Gara JP.** ica and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 270: 179-88.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- 65. Herron LL, Chakravarty R, Dwan C, et al.** Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2002; 70:3978-81.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.7.3978-3981.2002>
- 66. Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penades R.** Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 2005; 151:2465-75.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>