

Staphylococcus aureus İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Karşılaştırılması

Demet GÜR VURAL ¹, İlknur BIYIK ¹, Elif Gülsüm TORUN ²,
Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI ¹, Kemal BİLGİN ¹, Asuman BİRİNCİ ¹

ÖZ

Amaç: *Staphylococcus aureus*, hastane kaynaklı ve toplum kökenli enfeksiyonların önemli bir nedenidir. *S. aureus*'un tıbbi implantlara ve konak dokuya tutunması ve olgun bir biyofilmin oluşması, kronik enfeksiyonların kalıcılığında önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmamızın amacı, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarının biyofilm oluşturma potansiyelini belirlemek ve aralarındaki farkı gözlemlemektir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamıza Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 200 *S. aureus* suşu (100 MRSA ve 100 MSSA) dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması Vitek MS (BioMerieux, Fransa) cihazı ile antibiyotik duyarlılıkları Vitek2 Kompakt (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile belirlendi. Biyofilm üretimi, Mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak çalışıldı. MSSA ve MRSA suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği istatistiksel olarak incelendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen tüm *S.aureus* suşları arasında %51 oranında biyofilm oluşumu saptadık. MSSA suşlarının %34 ünde, MRSA suşlarının %68 inde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. MRSA ve MSSA grupları arasında biyofilm oluşturma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda MRSA suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin MSSA'lara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. MRSA ve MSSA suşlarının oluşturduğu biyofilm, bu suşların hastane ortamında kalıcı olma kabiliyetinin yüksek olduğunu ve hastanede yatan hastalarda tedaviye başarısızlık olasılığını artırdığını gösterir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*; antimikrobiyal direnç; biyofilm.

Comparison of Biofilm Forming Properties of *Staphylococcus aureus* Isolates

ABSTRACT

Aim: *Staphylococcus aureus* is a major cause of nosocomial and community-acquired infections. *S. aureus* attachment to medical implants and host tissue, and the establishment of a mature biofilm, play an important role in the persistence of chronic infections. The aim of our study was to determine the biofilm forming potential of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates and to observe the difference between them.

Material and Methods: A total of 200 *S. aureus* strains (100 MRSA, 100 MSSA) obtained from various clinical samples sent to the Microbiology laboratory were included in our study. Identification of isolates was determined by Vitek MS (BioMerieux, France) device and antibiotic susceptibility was determined by Vitek2 Compact (BioMerieux, France) automated system.). Biofilm production was studied using the Microtitration plate method. The biofilm forming ability of MSSA and MRSA strains was statistically examined. Statistical significance level was taken as $p<0.05$.

Results: We found 51% biofilm formation among all *S.aureus* strains included in the study. Biofilm formation was observed in 34% of MSSA strains and 68% of MRSA strains. There was a statistically significant difference in biofilm formation between MRSA and MSSA groups ($p<0.05$).

Conclusion: We determined that the biofilm forming ability of MRSA strains was significantly higher than MSSA, in our study. MRSA and MSSA strains indicates that these strains have a high ability to persist in the hospital setting and increase the risk of disease development in hospitalized patients.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; antimicrobial resistance; biofilm.

1 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye
2 Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji, Kahramanmaraş, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Demet GÜR VURAL, e-mail: demet-gur@yandex.com
Geliş Tarihi / Received: 01.12.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 12.04.2023

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, sağlıklı bireylerde cilt, burun boşluğu, boğaz ve bağırsak gibi vücudun bazı kısımlarında kolonize olarak yaygın şekilde görülür. Birincil kolonizasyon bölgelerinden, doğal savunma bariyerlerinin (cilt ve mukoza) travma veya cerrahi işlemlerle riske girdiği durumlarda; diğer alanlara ulaşarak enfeksiyona neden olabilirler (1). Hastaneden ve toplumdaki edinilmiş enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan *S.aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteoartiküler enfeksiyonlar, pnömoni, endokardit ve bakteriyemi gibi klinik tablolara neden olmaktadır. MRSA sebep olduğu enfeksiyonlar, tedavi başarısızlıklarına, uzun yatış süreleri ile yüksek morbidite ve mortaliteyle sonuçlanabilen klinik durumlara yol açabilmektedir (2).

S.aureus izolatlarının virulansı; aderans, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstraselüler faktörler gibi özellikler ile birlikte biyofilm oluşumuna da bağlıdır (1). Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri ekstraselüler polimerik yapılar (EPS), proteinler, çevresel organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır. Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaları opsonizasyon, fagositoz ve antibiyotiklerden koruyarak, sepsis ve kronik enfeksiyonların oluşumuna neden olabilir (3,4). Ciddi kronik enfeksiyonlardan sorumlu anahtar virülans faktörü olarak kabul edilmiştir (4,5).

Biyofilm ile ilişkili *S. aureus* enfeksiyonları, konağın doğal savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal tedaviye direnç gösterir (6). Ayrıca biyofilm fenotipi antimikrobiyal direnç kazanımından etkilenebileceğinden; biyofilm oluşumu ve antimikrobiyal direnç fonksiyonel olarak bağlantılıdır (5,6).

Çalışmamızda farklı klinik örneklerden izole edilmiş MSSA ve MRSA suşlarının biyofilm oluşturma potansiyelini ve bu açıdan aralarındaki farkı gözlemlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamıza Eylül 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen numunelerden izole edilen 100 MRSA ve 100 MSSA dan oluşan toplam 200 *S. aureus* suşu dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması Vitek MS (BioMerieux, Fransa) otomatize sistem ile, antimikrobiyal duyarlılık testleri ise Vitek2 Kompakt (BioMerieux, Fransa) sistemi ile çalışıldı. Metisilin direncini belirlemek için sefoksitin disk difüzyon testi kullanılmıştır. Duyarlılık sonuçları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (7). Çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 08.12.2021; sayı no: 2021/573).

Biyofilm Varlığının Araştırılması

S.aureus suşlarında meydana gelen biyofilm varlığı mikrotitrasyon plak yöntemi ile araştırıldı. Kanlı agar besiyerinde saflaştırılan suşlar %0,25 glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (BD,Fransa) besiyerine ekilerek 36°C'de 24 saat inkübe edildi. Tek düşen kolonilerden 1/20 dilüsyon hazırlanarak; 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrotitrasyon plağında her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde pipetlenerek 36 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyerleri

aspire edildi ve kuyucuklar üç kez distile su ile pipetlenerek yıkandı ve ters çevrilip kurutuldu. Sonrasında kuyucuklara %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100'er µl pipetlendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyucuklar üç kez distile su ile pipetlenerek yıkandı ve plak ters çevrilerek kurutuldu. Boyayı çözmek için 200'er µl etanol/aseton (80:20) solüsyonundan dağıtılarak 10 dakika boyunca çözülmesi sağlandı. Ardından plaklar ELISA (ChroMate, Amerika) okuyucuda 492 nm dalga boyunda okutuldu (8,9). Çalışmaya dahil edilen her izolat üç kez çalışıldı. Negatif kontrol suşu olarak steril serum fizyolojik kullanılırken; pozitif kontrol olarak da *A. baumannii* ATCC 19606 suşu kullanıldı. Sonuçlar izolatların optik dansite değerlerine göre daha önceki çalışmalardaki gibi yapışma olmayan, zayıf, orta ve güçlü biyofilm üretme yeteneğine göre sınıflandırılarak değerlendirildi (9,10,11).

İstatistiksel Analiz

MSSA ve MRSA iki bağımsız grup olarak alındı. Biyofilm dereceleri ve antibiyotik direnç dağılımlarını karşılaştırmak için Mann Whitney U Testi kullanıldı. Önem düzeyi p<0,05 olarak alındı. Analizler, IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistics 20.0 programından yararlanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen örneklerin gönderildiği kliniklerin dağılımına bakıldığında; MSSA suşlarında yoğun bakım 12 (%12), hematoloji 11(%11), MRSA suşlarında ise yoğun bakım 21(%21) ve ortopedi 11(%11)'nin ilk iki sırada olduğu görülmektedir. Örneklerin gönderildiği servis dağılımları MRSA ve MSSA için Tablo 1'de toplu olarak verilmiştir.

Örnek türlerinin dağılımına göre en sık izole edilenler: MSSA suşlarında yara 37 (%37), kan 24 (%24); MRSA suşlarında idrar 27(%27) ve kan 26(%26) olduğu belirlenmiştir. En çok biyofilm oluşturan suşların dağılımına göre: MSSA suşlarında kan dokuz (%9), yara dokuz (%9); MRSA suşlarında kan 17(%17), idrar 12(%12) olduğu saptanmıştır. Orta ve kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlar her iki örnek grubunda da kan izolatları idi (Tablo 2).

Çalışmaya dahil edilen tüm *S.aureus* suşları arasında %51 oranında biyofilm oluşumu saptadık. MSSA suşlarının %34 ünde, MRSA suşlarının %68 inde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. MRSA ve MSSA grupları arasında biyofilm oluşturma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p<0,05). MSSA suşlarının sekizinde (%8) zayıf, 22'sinde (%22) orta, dördünde (%4) güçlü derecede biyofilm oluşumu gözlenirken, MRSA suşlarının 34'ünde (%34) zayıf, 20'sinde (%20) orta, dördünde (%4) güçlü derecede biyofilm oluşumu saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 3'te gösterildiği gibi biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmayan *S. aureus* suşlarının antimikrobiyal direnç dağılım oranlarını karşılaştırdığımızda: penisilin (%94,5'e karşı %90,7, p=0,427), trimetoprim-sulfametoksazol (%6,5'ye karşı %8,3, p=0.029), siprofloksasin (%17,3'a karşı %17,5, p=0.026), klindamisin (%17,3'ye karşı %18,5, p=0,315), gentamisin (%6,5'ye karşı %5,5, p=0,002), tetrasiklin (%22,8'a karşı %21,2, p=0,237) olarak görülmüştür. Tüm izolatlar teikoplanin, vankomisine ve linozolide duyarlı olarak saptanmıştır.

Tablo 1. MRSA ve MSSA suşlarının kliniklere göre dağılımı

MSSA Klinik	n (%)	MRSA Klinik	n (%)
Acil ve İlk Yardım	7 (7)	Acil ve İlk Yardım	6 (6)
Beyin Cerrahi	3 (3)	Beyin Cerrahi	2 (2)
Çocuk Acil	1 (1)	Çocuk Acil	2 (2)
Çocuk Gastroenteroloji	1 (1)	Çocuk Enfeksiyon	3 (3)
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	2 (2)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	3 (3)
Dahiliye	6 (6)	Dahiliye	7 (7)
Dermatoloji	4 (4)	Dermatoloji	5 (5)
Endokrinoloji	1 (1)	Enfeksiyon Hastalıkları	1 (1)
Enfeksiyon Hastalıkları	5 (5)	Genel Cerrahi	6 (6)
Genel Cerrahi	3 (3)	Göğüs Cerrahi	2 (2)
Göğüs Cerrahi	5 (5)	Göğüs Hastalıkları	3 (3)
Göğüs Hastalıkları	2 (2)	Hematoloji	5 (5)
Göz Hastalıkları	1 (1)	Kardiyoloji	3 (3)
Hematoloji	11 (11)	Nefroloji	9 (9)
Hemodiyaliz ve Onkoloji Merkezi	1 (1)	Nöroloji	3 (3)
Kadın Hastalıkları ve Doğum	2 (2)	Onkoloji	3 (3)
Kalp Damar Cerrahi	1 (1)	Ortopedi ve Travmatoloji	11 (11)
Kardiyoloji	5 (5)	Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik	1 (1)
Nefroloji	5 (5)	Üroloji	4 (4)
Nöroloji	2 (2)	Yoğun Bakım	21 (21)
Onkoloji	7 (7)		
Ortopedi ve Travmatoloji	2 (2)		
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	8 (8)		
Romatoloji	1 (1)		
Üroloji	2 (2)		
Yoğun Bakım	12 (12)		

Tablo 2. MSSA ve MRSA suşlarında biyofilm oluşturma derecelerine göre örnek türü dağılımı

MSSA Örnek türü	*Biyofilm oluşturma derecesi				Toplam	MRSA Örnek türü	*Biyofilm oluşturma derecesi				Toplam
	0	1	2	3			0	1	2	3	
Ameliyat Materyali	4	1	2		7	Ameliyat Materyali	1	4	1	1	7
Asit sıvısı	1				1	Balgam	3	1		1	5
Bronkoalveolar Lavaj (BAL)		1			1	İdrar	15	8	4		27
Balgam	2		2		4	Kateter ucu	1	1	1		3
Beyin omurilik sıvısı (BOS)	1	1			2	Konjunktiva	1	1			2
Kan	15		7	2	24	Kulak sürüntüsü		1			1
Kateter ucu	3			1	4	Mayi	1	1	1		3
Kist Sıvısı			1		1	Safra	1				1
Kulak sürüntüsü			1		1	Kan	9	10	6	1	26
drar	5		1		6	Trakeal Aspirat	4	3	4	1	12
Trakeal Aspirat	6	1	3		10	Yara Sürüntüsü	6	4	3		13
Vücut sıvısı	1	1			2	Toplam	42	34	20	4	100
Yara Sürüntüsü	28	3	5	1	37						
Toplam	66	8	22	4	100						

*1: Zayıf, 2: Orta, 3: Güçlü

Tablo 3. Biyofilm oluşturma özelliklerine göre antibiyotik direnç oranları

Antibiyotikler	Biyofilm Oluşturan Suşlar (n=108) (n/%)	Biyofilm Oluşturmayan Suşlar (n=92) (n/%)	p Değerleri
Sefoksitin	58 (63)	42 (38,8)	0,017
Penisilin	87 (94,5)	98 (90,7)	0,796
Gentamisin	6 (6,5)	6 (5,5)	0,782
Klindamisin	16 (17,3)	20 (18,5)	0,739
Siprofloksasin	16 (17,3)	19 (17,5)	0,866
Tetrasiklin	21 (22,8)	23 (21,2)	0,763
Trimethoprim-Sulfamethoxazol	6 (6,5)	9 (8,3)	0,796

TARTIŞMA

S. aureus tarafından biyofilm üretimi, bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere karşı koruma sağlayan önemli bir virulans faktörü olarak tanımlanmıştır ve kronik veya kalıcı enfeksiyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (12). Biofilm oluşturan *S. aureus* septisemi, endokardit, osteomyelit gibi birçok hastalığa neden olur ve *S. aureus*'un neden olduğu hastane enfeksiyonlarında ciddi bir sorundur (13,14).

Piechota ve arkadaşları MRSA ve MSSA suşlarında biyofilm üretimini araştırdıkları çalışmalarında suşların %99,2'sinin biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır (11). Neopa ve arkadaşları yara örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında %69,8 oranında biyofilm oluşumu saptamışlardır (15). Kan örneklerinden üreyen *S. aureus* suşlarında biyofilm varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada izolatların %66,7'sinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir (16). Biyofilm oluşumunun prevalansındaki farklılıklar, %50 ile %70 arasında değişen verilerle rapor edilmiştir (17,18,19). Çalışmamızda *S. aureus* suşlarında %51 oranında biyofilm oluşumu saptadık ve literatür ile uyumlu olarak değerlendirdik.

S. aureus'un yapışma özelliğinin belirlenmesi, biyofilm oluşumu ile patojenite derecesi arasında ilişkiler göstermiştir, organizmanın virulans özelliğinin yüzeye yapışma yeteneği ile değiştiği gösterilmiştir (20). Bu nedenle, biyofilm üreticilerinin yapışma özelliği; zayıf, orta ve kuvvetli olarak derecelendirilmiştir (11). Rasim ve Kaleli çalışmalarında *S. aureus* suşlarının 112'sinde (%64,0) orta derece biyofilm üretimi ve 29'unda (%16,6) güçlü biyofilm üretimi belirlenmiştir (21). Çeşitli klinik örneklerden elde edilen MRSA ve MSSA suşlarında biyofilm oluşununun araştırıldığı bir çalışmada; 73 MRSA suşunun %47,9'unda orta düzeyde biyofilm oluşunu gözlenirken, suşların %39,7'sinde güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır (11). Bizim çalışmamızda tüm *S. aureus* suşları arasında güçlü ve orta derecede biyofilm oluşturanlar %25 oranında iken; MSSA lar arasında bu oran % 26, MRSA suşları arasında ise %24 idi.

S. aureus normal flora elemanı olarak nazofarenks, deri, göz, barsak ve ürogenital sistemde bulunur (22). Yara veya cerrahi insizyon yoluyla cilt bariyerlerini aşabilir ve enfeksiyona neden olabilir. Bu nedenle deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en yaygın ajanı olarak gösterilen fırsatçı bir patojendir (12). Ayrıca dokulara veya kalıcı tıbbi cihazlara yapışma ve biyofilm oluşturma özelliğine sahiptir (23). Çalışmamızda biyofilm oluşturan örnek türü dağılımına baktığımızda tüm *S. aureus* suşları arasında kan ve idrar örneklerinin en fazla biyofilm oluşturduğunu belirledik. 2018 yılında yapılan bir çalışmada

mikrotitrasyon plak yöntemi ile yara örneklerinin %77,4'ünde biyofilm üretimi saptanmıştır (15). Piechota ve arkadaşları güçlü biyofilm oluşumunu balgam ve trakeostomiden (%66,7) izole edilen suşlar arasında gözlemlemiştir (11). Bizim çalışmamızda MRSA suşlarında güçlü ve orta derecede biyofilm oluşturan örnek kan ve yara iken, MSSA suşlarında kan ve trakeal aspirat örnekleri idi.

Biyofilm oluşturma yeteneğinin antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmesi *S. aureus* suşlarındaki antibiyotik direnci ile mücadelede önemlidir. Çalışmamızda penisilin direnci biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S. aureus* suşlarında yüksek oranda bulundu. Abdelraouf ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmalarında benzer şekilde biyofilm araştırdıkları *S. aureus* izolatlarında yüksek düzeyde penisilin direnci saptamışlardır (24). Biyofilm oluşturan izolatlarda gentamisin direnç yüksek oranda bulunurken, trimetoprim- sulfametoksazole direnç biyofilm oluşturmaya izolatlarda yüksek oranda bulundu. Bu durum özellikle toplumdan kazanılan *S. aureus* enfeksiyonlarında trimetoprim- sulfametoksazolün sık kullanılmasından kaynaklanabilir. Çalışmamızdaki tüm suşlar teikoplanin, vankomisin ve linozolide duyarlı idi. Bu ilaçların hastanede tedavi gören belirli hasta gruplarında kullanılması bunda etken olabilir.

Çalışmamızda MRSA suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin MSSA'lara göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Biyofilm ile ilişkili gen bölgelerinin moleküler yöntemlerle de saptanması bakterilerin virulansı hakkında daha fazla bilgi verebilir. Çalışmamızdaki ana kısıtlılıklardan biri bütçeden kaynaklı biyofilm oluşumunu olarak sadece konvansiyonel yöntemlerle saptamış olmaktır. MRSA ve MSSA suşlarının biyofilm oluşturma kapasitesi, bu suşların hastane ortamında kalıcı olma ve hastanede yatan hastalarda hastalık geliştirme riskinin yüksek olma kabiliyetine işaret eder. Bu nedenle hastanelerde bu izolatların yayılımının önüne geçilmesi ve biyofilm geliştirme potansiyelleri açısından taranmalarının önemli olduğu düşünülmektedir.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: D.G.V.; Tasarım: D.G.V., Y.T.Ç.; Veri Toplama ve/veya İşleme: İ.B., K.B., E.G.T.; Analiz ve/veya Yorum: D.G.V., A.B.; Literatür Taraması: E.G.T, İ.B.; Makale Yazımı: D.G.V., İ.B. Eleştirel İnceleme: A.B., Y.T.Ç., K.B.

KAYNAKLAR

1. Santana GS, Lenzi-almeida KC, Lopes V, Alves FA. Biofilm formation in catheter-related infections by Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *International Microbiology*. 2016; 19(4): 199-207.
2. Arıcı N, Aksaray S. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Derg*. 2019; 33(2): 70-6.
3. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
4. Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999; 44(1): 43-55.
5. 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.
6. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. *JJID*. 2005; 58: 353-7.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0. 2019. <http://eucast.org>.
8. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, 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. Milletli Sezgin F. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonunda araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Uzmanlık Tezi. 2012;33-37.
10. Us, D. Serolojik Tanı Yöntemleri. 1. Baskı, Ankara, Hacettepe üniversitesi yayınları. 2006;39.
11. Piechota M, Kot B, Maciejewska AF, Gruhewska A, Kosek AW. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *BioMed Research International Volume*, 2018; Article ID 4657396, 7 pages.
12. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001; 358(9276): 135-8.
13. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. 2002; 43(6): 1367-78.
14. Kim JH, Kim CH, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, Cho SH. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008; 18(1): 28-34.
15. Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. (2018). In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International journal of general medicine*. 2018; 11: 25.
16. Poudel P, Adhikari N, Shah PK. Multi-drug resistant bacterial isolates associated with blood stream infection. *ASRJETS*. 2015; 14(2): 23-52.
17. Samie A, Shivambu N. Biofilm production and antibiotic susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province, South Africa. *Afr J Biotechnol*. 2011; 10(65): 14625-36.
18. Khan F, Shukla I, Rizvi M, Mansoor T, Sharma SC. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. *Trends Med Res*. 2011; 6(2): 116-23.
19. Cha JO, Yoo JI, Yoo JS, Chung HS, Park SH, Kim HS, 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.
20. Baddour LM, Christensen GD, Hester MG, Bisno AL. Production of experimental endocarditis by coagulase-negative staphylococci: variability in species virulence. *J Infect Dis*. 1984; 150(5): 721-7.
21. Şahin R, Kaleli İ. *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2018; 52(2): 111-22.
22. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(3): 603-61.
23. Götz F. *S. aureus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 2002; 43: 1367-78.
24. Elmanama AA, Al-Aydi IM, Al-Reefi MR. Biofilm formation and methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *The International arabic Journal of antimicrobial agents*. 2020; 10: 1-3.