

Kateter ile İlişkili Hastane Enfeksiyonlarından İzole Edilen Metisiline Dirençli Stafilokoklarda Biyofilm ile İlişkili Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması*

Investigation of Biofilm-Associated Antibiotic Susceptibilities of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Catheter-Related Nosocomial Infections

Fulya BAYINDIR BİLMAN¹, Füsün CAN², Melek KAYA³, Ayşe Canan YAZICI⁴

¹ Diyarbakır Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır.

¹ Diyarbakır Regional Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Diyarbakır, Turkey.

² Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Koc University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

³ Sincan Dr. Nafiz Körez Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Sincan Dr. Nafiz Körez State Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁴ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

⁴ Baskent University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 12.02.2009 tarih ve KA09/08 proje numarasıyla onaylanan ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenen tez çalışmasıdır.

Geliş Tarihi (Received): 13.01.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.06.2013

ÖZET

Hastanede yatış sürecinde yaygın olarak kullanılan kateterlerin en önemli komplikasyonu, hastalarda katetere bağlı lokal ve/veya sistemik enfeksiyonların gelişme riskidir. Bu çalışmada, kateterlerden izole edilen metisiline dirençli stafilokokların planktonik ve biyofilm sesil hücrelerinin antibiyotik duyarlılığının araştırılması, karşılaştırılması ve antibiyotiklerin tek başına ve kombinasyonlar halinde gösterdiği antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2006-2009 yılları arasında çeşitli servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatarak tedavi gören hastaların kateter kültürlerinden izole edilen 15 metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve 15 metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) olmak üzere toplam 30 suş dahil edilmiştir. Tüm suşların, planktonik hücre aşamasında ve in vitro koşullarda biyofilm oluşturduktan sonra sesil hücrelerinde çeşitli antibiyotiklere (vankomisin, siprofloksasin, rifampisin, gentamisin, meropenem, tigesiklin, linezolid, seftazidim, sefazolin) karşı duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmış; minimum inhibitör kon-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Fulya Bayındır Bilman, Diyarbakır Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 412 258 0060, **E-posta (E-mail):** f_bilman@hotmail.com

santrasyonu (MLK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Tüm antibiyotiklerin hem planktonik hem de biyofilmdeki etkinlikleri önce tek başlarına, ardından ikili ve üçlü antibiyotik kombinasyonları oluşturularak çoklu kombinasyonlu bakterisidal test (ÇKBT) yöntemiyle MLK ve MBK şeklinde saptanmıştır. Her bir antibiyotikle planktonik ve biyofilm hücrelerinde elde edilen veri seti istatistiksel olarak iki oran z testiyle analiz edilmiştir. Çalışmada, planktonik hücreler ve biyofilm arasında genel olarak duyarlılıklarda anlamlı azalmalar belirlenmiştir ($p < 0.01$). Hem ikili hem de üçlü kombinasyonlarla yapılan çalışmaların sonucunda da planktonik form ile biyofilm arasında kombinasyonların çoğunda duyarlılıkta anlamlı azalma olduğu görülmüştür ($p < 0.01$). Kombinasyonlar arasında suşların %90'ından fazlasını inhibe edebilenler karşılaştırıldığında, ikili ve üçlü kombinasyonlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Vankomisin ve tigesiklin, tüm izolatlar için planktonik hücreler ve biyofilm sesil hücrelerinde en etkin olan antibiyotikler olarak izlenmiş; gerek ikili gerekse üçlü kombinasyonlarda vankomisin ve rifampisin içerenler biyofilm ortamında en iyi aktiviteyi göstermişlerdir. Bu araştırmanın verileri, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda kombine antibiyotik tedavisi tercihinin, özellikle de ikili kombinasyonlarla tedavinin akılcı yaklaşım olacağını düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Kateter; hastane enfeksiyonu; planktonik hücre; biyofilm; duyarlılık, metisiline dirençli stafilokok.

ABSTRACT

Risks for development of local and/or systemic infections are the most important complications of catheters that are widely used during hospitalization process. The aims of this study were to investigate and compare the antibiotic susceptibilities of methicillin-resistant staphylococci isolated from catheters, in planktonic and biofilm forms, and to evaluate the antimicrobial effects of antibiotics on those forms alone and in combinations. A total of 30 strains [15 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 15 methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MR-CNS)] isolated from catheter cultures of patients hospitalized in different clinics and intensive care units in Baskent University Medical School Hospital between 2006-2009, were included in the study. The antibiotic sensitivities of MRSA and MR-CNS isolates were investigated in vitro in planktonic phase and on sessile cells after biofilm was formed. Vancomycin, ciprofloxacin, rifampicin, gentamicin, meropenem, tigecycline, linezolid, ceftazidime and cephazolin were used for antibiotic susceptibility testing. The sensitivity of planktonic cells to antibiotics was primarily investigated, so that minimal inhibitor concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values were determined by broth microdilution method. Afterwards, each strain was transformed to sessile cell in a biofilm environment, and MIC and MBC values were also determined for sessile cells. Double and triple antibiotic combinations were prepared, the effectiveness of combinations were studied on both planktonic and biofilm cells with multiple-combination bactericidal testing (MCBT) method. The data set obtained from planktonic and biofilm cells for each antibiotic analyzed via two proportion z test. Statistically significant decreases were found in the sensitivities of sessile cells when compared to planktonic cells ($p < 0.01$). The tests performed with the use of double and triple antibiotic combinations also showed the susceptibility decrease between planktonic and biofilm forms to be significant in most of the combinations ($p < 0.01$). The comparison of double and triple antibiotic combinations against planktonic and sessile cells as determined by the inhibition of more than 90% of the strains, revealed no significant difference. Vancomycin and tigecycline were the most effective antibiotics for all isolates in planktonic and sessile cells. Combinations containing vancomycin and rifampicin showed the best activity both double and triple antibiotic combinations against biofilm. In conclusion, our data indicated that combination therapy, especially double combinations of antibiotics seem to be a rational approach for biofilm-related infections.

Key words: Catheter; nosocomial infection; planktonic cell; biofilm; susceptibility; methicillin-resistant staphylococci.

GİRİŞ

Hastanede, özellikle de yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nde yatan hastalarda tanı ve tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılan kateterler, tıbbi yararlarının yanı sıra enfeksiyon başta olmak üzere birçok sorunun kaynağıdır. Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KİKDE) insidansı, epidemiyolojisi, maliyeti ve mortalite oranları araştırılmış ve ülkeler arasında farklılıklar olmak üzere; 1.12-4.2 KİKDE/1000 kateter günü, 8400-14400 KİKDE epizodu/yıl, 1000-1584 ölüm/yıl, 35.9-163.9 milyon Euro maliyet yükü oranları tespit edilmiştir¹. YBÜ'de ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının çoğu kan dolaşımı enfeksiyonu olup, gram-pozitif ve gram-negatif etkenlerin eşit sıklıkta izole edildiği vurgulanmaktadır^{2,3}. Bu ünitelerde kolonize olan mikroorganizmaların çeşitli yüzeylerde biyofilm yapabilme eğilimi, bu etkenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır⁴. Biyofilm içindeki bakterilerin (sesil), serbest (planktonik) bakterilere göre daha yavaş ürettiği ve daha farklı davranışta saptanmış; biyofilm bakterileri arasında özel bir iletişim olduğu (Quorum Sensing; QS) ve bu iletişim sisteminin kateterle ilişkili enfeksiyonlar (KİE) için önemli bir virülans faktörü olduğu belirlenmiştir^{5,6}. Biyofilm direncinde konvansiyonel antibiyotik direncinden farklı mekanizmalar rol oynamaktadır^{7,8}. Biyofilm içine antibiyotiğin düşük orandaki penetrasyonu, burada bulunan besin maddelerinin sınırlı olması, yavaş üreme ve adaptif baskı yanıtının oluşu, bakterinin çok aşamalı savunmasını oluşturmaktadır. Biyofilm direnci; biyofilm popülasyonu içindeki fenotipik varyantların ortaya çıkması, genel baskı yanıtının uyarılması, atım pompalarının ve QS sistemlerinin etkin hale gelmesini kapsamaktadır⁷.

Deri florasının baskın üyeleri olan KNS'ler, sıklıkla yabancı cisimlere bağlanmayı da sağlayan glikokaliks (slime) oluşturabilmeleri nedeniyle KİE'de *Staphylococcus aureus* ile birlikte en sık karşılaşılan etkenlerdir. *Slime* üretimine bağlı olarak KNS suşlarının antibiyotik direncinde de önemli artış saptanmaktadır^{9,10}. Bu çalışmanın amacı kateterlerden izole edilen metisiline dirençli stafilokoklarda planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm sesil hücrelerinde antibiyotik duyarlılığındaki değişimin tek başına ve kombinasyonlar oluşturularak incelenmesidir. Tek başına iken dirençli olduğu bilinen ancak kombinasyonlarda, biyofilm sesil hücreleri üzerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla beta-laktam antibiyotikler de kombinasyonlara eklenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2006-2009 yılları arasında çeşitli servislerde ve YBÜ'lerde yatarak tedavi gören hastaların kateterlerinde üremiş 15 metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve 15 metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) çalışmaya dahil edildi. İzolatlar konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı.

Çalışmada antibiyotik olarak; vankomisin (Sigma, V2002), linezolid (Pfizer, Amerika), siprofloksasin (Fako, 3585), rifampisin (Sigma, R3501), gentamisin (Sigma, G3632) ve tigesiklin (Wyeth Research, ABD) kullanıldı. Kombinasyonlarda, biyofilm sesil hücreleri

üzerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla beta-laktam antibiyotiklerden seftazidim (Sigma, C3809), sefazolin (Sigma, C5020) ve meropenem (Astra Zeneca, İngiltere) de ikili ve üçlü kombinasyonlara eklendi. Tigesiklin hariç diğer antibiyotikler "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"ün¹¹ önerdiği direnç sınır değerleri dikkate alınarak hazırlanıp, kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı (Tablo I). Tigesiklin her çalışmada taze olarak hazırlandı.

Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Planktonik hücrelerin antibiyotik duyarlılığı CLSI önerileri doğrultusunda standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılarak minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlendi. Daha sonra her bir suş ile biyofilm oluşturulup sesil hücrelerde aynı antibiyotikler için yine MİK ve MBK değerleri tespit edildi. Ardından ikili ve üçlü antibiyotik kombinasyonları oluşturulup çoklu kombinasyonlu bakterisidal test (ÇKBT) yöntemiyle hem planktonik hücrelerde hem de biyofilmde etkinlikleri belirlendi.

Planktonik Hücrelerde MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi

Antibiyotik dilüsyonları gentamisin ve vankomisin için ilk kuyucukta 64 mg/L; rifampisin, siprofloksasin, tigesiklin ve linezolid için ilk kuyucukta 32 mg/L olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri olarak %2 oranında NaCl içeren katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB; BBL, Fransa) kullanıldı. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu polistren plaklara (Nunc, Danimarka) 100'er µl MHB dağıtıldı; ardından hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından plakların ilk sütunundaki kuyucuklara 100'er µl eklenerek seri dilüsyonları yapıldı ve 12. sütun üreme kontrol olarak bırakıldı. Bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığına göre bakteri süspansiyonu hazırlanıp, son inokulum konsantrasyonu 5 x

Tablo I. MRSA/MRKNS için Antibiyotik MİK Sınır Değerleri¹¹ (mg/L)

Antibiyotik	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Gentamisin	≤ 4	8	≥ 16
Siprofloksasin	≤ 1	2	≥ 4
Vankomisin*	≤ 4	8-16	≥ 32
Rifampisin	≤ 1	2	≥ 4
Linezolid	≤ 4		
Tigesiklin	≤ 0.5		
Sefazolin	≤ 8		≥ 32
Seftazidim	≤ 8		≥ 32
Vankomisin**	≤ 2	4-8	≥ 16

* Koagülaz-negatif stafilokoklar için.

** *Staphylococcus aureus* için.

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

10⁵ cfu/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırıldı ve 100'er µl tüm kuyucuklara dağıtıldı. Tüm plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek ertesi gün sonuçlar hem gözle değerlendirildi hem de optik okuyucuda (ELx800, Universal Microplate Reader, Bio-Tek) 530 nm dalga boyunda okutuldu. Her iki sonuç birlikte değerlendirilerek, üremenin inhibe olduğu en son kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu MKK değeri olarak belirlendi. Hiç üreme görülmeyen kuyucuklardan 10'ar µl alınarak triptik soy agar (BD, Fransa) yüzeyine damla ekimi yapıldı. Plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek, üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MBK değeri olarak kabul edildi. Tüm testler iki kez çalışıldı ve *S.aureus* ATCC 25923 suşu kalite kontrol olarak kullanıldı.

Biyofilmde MKK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi

Biyofilm deneyleri iğneli kapaklı polistren plaklarda (Nunc, Danimarka) uygulandı. Tüm suşların taze pasajlarından MHB-II (BBL, Fransa) ile 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. Plaklara 100'er µl dağıtılıp, üzerine polistren yapıda iğneli kapaklar kapatılarak 18-24 saat 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Sesil hücreler ile çalışmada antibiyotik dilüsyonları planktonikten farklı olarak iki dilüsyon üstünden başlayacak şekilde hazırlandı. Yeni plaklara önce 100'er µl MHB-II dağıtılıp, birinci sıra kuyucuklara 100'er µl antibiyotik eklenerek seri dilüsyon yapıldı. Daha sonra önceden biyofilmin oluşturulduğu iğneli kapaklar bu yeni plaklara kapatıldı. Plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün optik okuyucuda 530 nm dalga boyunda ve gözle okunarak üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon biyofilm inhibitör konsantrasyon (BK) değeri olarak belirlendi. Biyofilm bakterisidal konsantrasyon (BBK) değerlerinin belirlenmesi amacıyla, steril 96 kuyucuklu U tabanlı yeni plaklara MHB-II besiyerinden 100'er µl dağıtılıp, BK değerleri belirlenen iğneli kapak transfer edildi. Sonikatörde beş dakika kuvvetle çalkalanıp tekrar 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün optik okuyucuda (530 nm) ve gözle okunarak üremenin görülmeyen en düşük konsantrasyon BBK olarak belirlendi.

Planktonik Hücrelerde Çoklu Kombinasyonlu Bakterisidal Test (ÇKBT)

MRSA ve MRKNS izolatları için iki farklı çalışma düzeneği oluşturuldu. Bu izolatların dirençli olduğu kabul edilen meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren 20 ikili, 44 üçlü kombinasyon ve diğer antibiyotiklerle de 15 ikili ve 15 üçlü antibiyotik kombinasyonu seçildi. Böylece toplam 94 farklı kombinasyon hazırlandı. Önce mikropak üzerinde tüm kombinasyonların yerleştirildiği bir şablon hazırlandı (Tablo II). Antibiyotikler hazırlanırken, CLSI'nın¹¹ önerdiği direnç sınır değerleri dikkate alındı. Buna göre gentamisin ve meropenem 16 mg/L, siprofloksasin ve rifampisin 4 mg/L, linezolid 8 mg/L, seftazidim, sefazolin 32 mg/L, tigesiklin 0.5 mg/L ve vankomisin *S.aureus* için 16 mg/L, KNS'ler için 32 mg/L direnç sınırı olarak kabul edildi ve her bir antibiyotik ÇKBT için 10 kat konsantre edilerek hazırlandı. Antibiyotikler önceden planlanan şablona uygun olacak şekilde kuyucuklara 10'ar µl dağıtıldı. Üçlü ve ikili kombinasyonlarda her bir antibiyotikten 10'ar µl koyularak, 10 µl de %2 NaCl içeren MHB-II eklendi. Bakterilerin taze pasajlarından 0.5 McFarland bulanıklığına göre bakteri süspansiyonu hazırlanıp son inokulum konsantrasyonu 5 x 10⁵ cfu/ml olacak şekilde, 1/100 oranın-

Tablo II. MRSA ve MRKNS İçin Antibiyotik Kombinasyon Şablonu

ÇKBT Kombinasyonları												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LV	LM	LG	LC	LT	LR	LS1	LS2	TRS1	RS2	RS1	TRS2
B	RS1S2	LVS1	LVS2	LMG	LMC	LMT	LMR	LMS1	LMS2	LGC	LGT	LGR
C	LGS1	LGS2	LCT	LCR	LCS1	LCS2	LTR	LTS1	LTS2	LRS1	LRS2	LS1S2
D	VM	VG	VC	VT	VR	VS1	VS2	VMG	VMC	VMT	VMR	VMS1
E	VMS2	VGC	VGT	VGR	VGS1	VGS2	VCT	VCR	VCS1	VCS2	VTR	VTs1
F	VTS2	VRS1	VRS2	VS1S2	MG	MC	MT	MR	MS1	MS2	MGC	MGT
G	MGR	MGS1	MGS2	GC	GT	GR	GS1	GS2	GCT	GCR	GCS1	GCS2
H	CT	CR	CS1	CS2	CTR	CTS1	CTS2	TR	TS1	TS2		K

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok; C: Siprofloksasin; G: Gentamisin; M: Meropenem; L: Linezolid; R: Rifampisin; S1: Sefazolin; S2: Seftazidim; T: Tigesiklin; V: Van-komisin; K: Üreme/sterilite kontrolü.

da sulandırıldı. Antibiyotikler dağıtıldıktan sonra tüm kuyucuklara hazırlanan bu bakteri süspansiyonlarından 70'er µl ilave edildi; böylece tüm kuyucuklarda toplam hacim 100 µl'ye tamamlandı. Mikroplaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra üremenin inhibisyonu gözle ve optik okuyucuda (530 nm) değerlendirildi. Üreme olmayan kuyucuklardan 10'ar µl alınarak triptik soy agar yüzeyine damla ekimi yapıldı; 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi ve ertesi gün üreme olmayan kuyucuklarda bakterisidal etki araştırıldı.

Biyofilmde ÇKBT

Biyofilm deneyleri yine iğneli kapaklı polistren plaklarda çalışıldı. Tüm suşların taze pasajlarından 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyon hazırlandı. Plaklara 100'er µl dağıtılıp, üzerine iğneli kapaklar kapatılarak 18-24 saat 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Antibiyotiklerin ikili ve üçlü olacak şekilde kombinasyonları yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlandı. Yeni bir U tabanlı mikroplağa antibiyotik kombinasyonları şablondaki gibi dağıtılıp üzerine 70'er µl MHB-II eklendi; biyofilm oluşturulmuş iğneli kapaklar, antibiyotik kombinasyonlarını içeren bu yeni mikroplağa aktarıldı ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Üremenin biyofilmde inhibisyonu, gözle ve optik okuyucuda (530 nm) okutulularak değerlendirildi. Biyofilmde bakterisidal konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla steril U tabanlı yeni plaklara MHB-II besiyeri 100'er µl dağıtılıp, iğneli kapak bu plağa transfer edildi. Sonikatörde beş dakika kuvvetle çalkalanıp 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi ve ertesi gün optik okuyucuda (530 nm) ve gözle okunarak üremenin görülmediği kuyucukta bakterisidal etki varlığı belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Veri seti iki oran z testiyle analiz edildi. Sonuçlar gözlem sayısı (n) ve oran (%) olarak ifade edildi; $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler MINITAB 15.0 istatistik yazılımıyla gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmada MRSA izolatlarında, tüm antimikrobiklerin biyofilm ortamında duyarlılıklarının azaldığı izlenmiştir (Tablo III). Gentamisin (GEN) için planktonik hücrede duyarlılık oranı %6.6 olarak bulunmuşken biyofilm hücrelerinin tamamında direnç tespit edilmiştir. MRSA izolatlarında biyofilm ortamında en yüksek duyarlılık tigesiklin (%86.6) ile elde edilmiştir. MRSA izolatlarının tamamı planktonik iken vankomisin (VAN), tigesiklin (TIG) ve linezolid (LIN)'e duyarlı bulunmuş; ancak biyofilmde bu antibiyotiklere duyarlılık sırasıyla %86.6, %33.3 ve %26.6 olarak saptanmıştır. LIN ve VAN etkinliğinin biyofilm hücrelerine anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p < 0.01$). MRSA izolatları siprofloksasin (CIP) ve rifampisin (RIF)'e hem planktonik formda hem de biyofilmde %100 dirençli bulunmuştur. Diğer tüm antibiyotiklerde planktonik hücredeki MBK değerleri genellikle biyofilmlere göre daha düşük gözlenirken, TIG'da ise MBK değerlerinin biyofilmde 2-4 kat daha düşük olduğu dikkati çekmiştir.

MRKNS izolatları değerlendirildiğinde; hem planktonik (%100) hem de biyofilm ortamındaki (%33.3) hücrelerin VAN'a duyarlılığının MRSA ile benzer olduğu gözlenmiştir (Tablo IV). Ayrıca RIF (sırasıyla %66.6 ve %66.6) ve CIP'in (sırasıyla %26.6 ve %20) planktonik ve biyofilm ortamında benzer duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. MRKNS izolatlarında elde edilen sonuçlara göre, planktonik formda suşların tamamı VAN, TIG ve LIN'a duyarlı iken, GEN'e %40, CIP'a %26.6 ve RIF'a %66.6'sı duyarlı bulunmuştur. Biyofilm ortamında rifampisine suşların duyarlılığı planktonik hücreler ile aynı oranda saptanırken, GEN, VAN, LIN ve TIG duyarlılıklarında azalma ($p < 0.01$) gözlenmiştir.

MRSA izolatlarında planktonik hücreler GEN + CIP, GEN + RIF ve CIP + RIF kombinasyonları haricinde diğer kombinasyonlara %90'ın üzerinde duyarlı bulunmuştur (Tablo V). CIP + RIF kombinasyonuna tüm suşlar dirençli olarak saptanmıştır. VAN içermeyen ikili kombinasyonların çoğunda, biyofilm ortamında planktonik hücrelerde elde edilen etkinlik düzeyine ulaşamamıştır. Biyofilm ortamında en iyi aktivite VAN ile olan ikili kombinasyonlarda görülmüş; özellikle VAN + RIF, hem MRSA hem de MRKNS izolatlarında planktonik hücrelerde ve biyofilmde en etkin olan kombinasyon olarak izlenmiştir.

MRKNS izolatlarında beta-laktamlı kombinasyonlardan VAN + sefazolin (CEZ) ve meropenem (MER) + TIG ile hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde %100 duyarlılık saptanırken, VAN + seftazidim (CTZ) ve TIG + CEZ kombinasyonunda planktonik hücrelerde %100, biyofilmde ise %93 oranında duyarlılık bulunmuştur. MRKNS izolatlarında da planktonik hücrelerde ikili kombinasyonlara suşların %47-100'ü duyarlı bulunmuş; biyofilm ortamında ise beta-laktam içermeyen tüm antibiyotik kombinasyonlarında duyarlılıklarda azalma görülmüştür ($p < 0.01$). MRKNS suşlarının planktonik ve biyofilm hücrelerine LIN + MER (%87), VAN + CEZ ve MER + TIG (%100) kombinasyonları eşit etkinlik göstermiştir. Gerek planktonik gerekse sesil hücrelere en etkin kombinasyon VAN + RIF olarak belirlenmiştir.

Üçlü kombinasyonlarda MRSA izolatlarında GEN + CIP + RIF kombinasyonunun, bu antibiyotiklerin ikili kombinasyonlarında gözlemlendiği şekilde planktonik ve biyofilmde et-

Tablo III. MRSA İzolatlarında Planktonik Hücreler ve Biyofilmde Antibiyotiklerin MİK ve MBK Değerleri (mg/L)

İzolat no	Gentamisin				Siprofloksasin				Vankomisin			
	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
1	32	> 512	512	> 512	> 32	> 512	256	256	1	32	8	64
2	8	> 512	8	> 512	32	> 512	512	> 512	1	128	4	128
3	0.06	8	8	64	32	> 512	256	> 512	1	8	8	128
4	8	> 512	8	64	32	> 512	512	512	1	32	4	256
5	16	> 512	8	128	32	> 512	512	512	1	16	4	256
6	8	128	8	128	32	> 512	512	> 512	1	32	4	256
7	16	> 512	8	128	32	> 512	512	> 512	1	512	4	256
8	16	> 512	8	64	16	> 512	64	512	1	32	16	256
9	16	> 512	512	> 512	32	> 512	128	> 512	0.5	8	4	64
10	16	> 512	512	> 512	32	> 512	512	> 512	1	32	2	128
11	16	> 512	512	> 512	32	> 512	512	512	1	32	2	128
12	16	> 512	512	> 512	32	> 512	64	512	1	16	16	128
13	16	> 512	512	> 512	32	> 512	128	> 512	1	> 512	2	128
14	16	> 512	512	> 512	32	> 512	128	> 512	1	16	2	128
15	16	> 512	512	> 512	32	> 512	128	> 512	0.5	32	2	128
Duyar- lılık %	6.6		0		0		0		100		33.3	

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; P: Planktonik hücreler; B: Biyofilm; MİK: Minimum inhibitör

kinlikleri düşük bulunmuştur (Tablo VI). Diğer tüm kombinasyonların etkinliği planktonik hücrelerde %73'ün üzerindedir. Ancak biyofilmde VAN hariç tüm kombinasyonların etkinliğinde düşüş gözlenmiş, VAN + CIP + RIF kombinasyonunda ise biyofilm ortamında planktonik hücrelere göre anlamlı olmayan hafif bir artış izlenmiştir. Üçlü kombinasyonların MRKNS izolatlarına etkinliği incelendiğinde planktonik ve biyofilm hücreleri üzerinde belirgin bir aktivite azalması görülmemiştir. VAN + GEN + CIP ve VAN + CIP + TIG kombinasyonlarında biyofilm hücrelerine etkinliğin planktonik hücrelere göre anlamlı olmayan hafif bir artış, VAN + CIP + RIF kombinasyonunda ise belirgin bir artış gözlenmiştir.

MRSA izolatlarında üçlü kombinasyonlarda izolatların %90'ından fazlasını inhibe etme yönünden, planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). MRSA izolatlarında hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinin %90'ından fazlasını inhibe eden ikili kombinasyonlar ile üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Üçlü kombinasyonların MRKNS izolatları üzerindeki etkinliğine bakıldığında, hem planktonik hem de biyofilmde suşların %60-90'ını inhibe eden oran yüksek bulunmuştur. Üçlü kombinasyonlarda izolatların %90'ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik

Tablo III. (Devamı)

Rifampisin				Linezolid				Tigesiklin			
P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	8	1	128	0.5	8	1	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	2	8	128	0.125	8	0.5	8
> 32	> 512	> 512	> 512	0.125	32	16	128	0.125	8	0.125	4
> 32	> 512	> 512	> 512	1	32	64	128	0.06	8	0.25	2
> 32	> 512	> 512	> 512	0.5	8	64	128	0.125	8	0.25	2
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	4	32	64	0.125	8	0.125	4
> 32	> 512	> 512	> 512	1	16	64	128	0.125	4	0.125	2
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	8	4	128	0.125	8	0.125	4
> 32	> 512	> 512	> 512	1	8	4	128	0.25	8	16	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	8	128	128	0.125	8	0.5	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	8	128	128	0.125	8	0.25	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.5	8	128	128	0.125	8	0.25	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	32	128	> 128	0.06	8	0.25	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	16	4	128	0.06	8	0.5	4
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	8	32	128	0.06	16	0.5	2
0		0		100		26.6		100		86.6	

konsantrasyonu; MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon.

ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p > 0.01$) saptanamamıştır. MRKNS izolatlarında planktonik hücrelerin %90'ından fazlasını inhibe eden ikili kombinasyonlar ile üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel yönden üçlü kombinasyonlar lehine anlamlı fark ($p < 0.01$) tespit edilmiştir. Ancak biyofilm hücrelerinde aynı analiz yapıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Beta-laktam antibiyotikleri içeren kombinasyon sonuçları değerlendirildiğinde; MRSA suşlarından farklı olarak, MRKNS'de biyofilmde elde edilen sonuçlar daha başarılı bulunmuştur. Beta-laktam içeren ikili kombinasyonlarda; MRSA suşlarında VAN'lı kombinasyonların dışındaki duyarlılık yüzdeleri planktonik hücrelerde yüksek iken biyofilmde düşük çıkmıştır. Oysa MRKNS izolatlarında farklı olarak biyofilmde de ikili kombinasyonlarda genel olarak yüksek duyarlılık elde edilmiştir. Biyofilm duyarlılığı ikili kombinasyonlardan MER + TIG ile VAN + CEZ'e, üçlü kombinasyonlardan da VAN + MER + CIP, VAN + MER + TIG, VAN + CIP + CEZ ve VAN + CIP + CTZ'ye %100 olarak belirlenmiştir. Beta-laktam antibiyotikler ile oluşturulan bu kombinasyonların, MRKNS suşlarında, biyofilm ortamında oldukça başarılı sonuçları ilgi çekici bir bulgudur.

Bakterisidal etkinlik sonuçları değerlendirildiğinde, kombinasyonlar tüm suşlarda planktonik hücrelerde oldukça başarılı bulunmuştur. Bununla birlikte, biyofilmde MRSA

Tablo IV. MRKNS İzolatlarında Planktonik Hücreler ve Biyofilmde Antibiyotiklerin MİK ve MBK Değerleri (mg/L)

İzolat no	Gentamisin				Siprofloksasin				Vankomisin			
	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
1	32	> 64	256	> 512	32	512	256	512	1	64	16	256
2	32	> 64	512	> 512	32	512	256	512	1	64	16	> 256
3	0.06	4	64	64	8	256	16	> 512	1	> 512	8	> 256
4	8	64	512	512	32	512	64	> 512	1	64	4	128
5	32	> 64	512	> 512	0.125	4	2	16	1	128	4	128
6	0.06	4	16	16	16	256	256	> 512	1	64	8	256
7	32	> 64	512	> 512	32	512	256	> 512	1	512	16	> 256
8	2	> 64	32	256	32	> 512	256	> 512	0.5	32	4	256
9	2	> 64	64	128	32	> 512	128	512	1	64	16	128
10	1	64	64	128	4	256	512	> 512	1	> 512	8	256
11	32	64	64	128	32	512	512	> 512	2	512	4	256
12	8	> 64	32	256	0.06	8	0.5	8	1	64	64	> 256
13	32	> 64	256	512	0.03	16	0.5	64	1	256	8	256
14	32	64	512	512	0.06	0.5	0.5	16	0.125	> 512	2	256
15	0.06	16	0.5	8	4	128	16	512	1	32	8	128
Duyarlılık %	40		6.6		26.6		20		100		33.3	

MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok; P: Planktonik hücreler; B: Biyofilm; MİK: Minimum inhibitör

izolatlarında VAN + MER + TIG ve VAN + CEZ + TIG kombinasyonları %60 öldürücü (killing) etki gösterirken; aynı kombinasyonlar MRKNS izolatlarının %80'inde öldürücü etki göstermiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda, kateter gibi yabancı cisimlerin yüzeyinde oluşturdıkları *slime* faktör sayesinde, kendilerini bu biyofilm matriksinin içine saklayarak hem immün sistemden hem de antimikrobiyal maddelerden koruyabilen stafilokoklarda, artan antibiyotik direnci araştırılmış, çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının planktonik hücreler ve biyofilm sesil hücrelerindeki inhibe edici ve öldürücü etkinliği de belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre stafilokokal biyofilmlerde vankomisin tek başına düşük etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde Souli ve arkadaşları¹⁰ *slime*-pozitif KNS suşlarında, Saginur ve arkadaşları¹² ise MRSA suşlarında, biyofilm ortamında vankomisine duyarlılıkta belirgin azalma olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda, vankomisinin ancak diğer ilaçlarla kombine edildiğinde biyofilm hücreleri üzerinde güçlü etkinliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda rifampisin, Souli ve arkadaşları¹⁰ ile uyumlu olarak MRKNS izolatlarında biyofilm üzerinde planktonik hücreler ile eşit etkinlikte bulunmuştur. Bu araştırmacılar¹⁰ sip-rofloksasinin biyofilmdaki etkinliğinde %9.5 azalma saptamışlardır. MRKNS izolatlarımızda

Tablo IV. (Devamı)

Rifampisin				Linezolid				Tigesiklin			
P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
> 32	> 512	> 512	> 512	0.25	2	8	128	0.06	8	128	16
> 32	> 512	> 512	> 512	0.125	2	2	64	0.06	4	1	16
32	> 512	> 512	> 512	0.125	2	2	64	0.03	8	2	16
0.03	16	0.5	0.5	0.25	8	1	32	0.25	8	0.25	8
0.03	32	0.5	0.5	0.5	4	2	16	0.125	8	0.5	8
0.03	8	0.5	0.5	0.25	4	2	64	0.03	8	0.5	32
0.25	4	0.5	0.5	0.25	8	4	64	0.03	4	0.5	32
32	> 512	> 512	> 512	0.25	4	4	64	0.25	8	0.5	16
> 32	> 512	32	32	0.25	16	128	128	0.06	4	128	8
0.03	1	0.03	0.125	0.125	8	2	128	0.03	2	0.25	8
0.03	4	0.03	0.25	0.125	8	4	64	0.06	8	0.125	8
0.03	0.5	0.03	0.25	0.125	8	4	64	0.125	8	16	8
0.03	2	0.03	0.25	0.25	8	2	64	0.06	8	0.5	16
0.03	0.5	0.03	0.25	0.25	4	1	32	0.03	8	0.125	0.5
0.03	0.5	0.03	0.125	0.06	2	1	64	0.03	8	0.125	8
66.6		66.6		100		86.6		100		66.6	

konsantrasyonu; MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon.

siprofloksasinin planktonik hücreler üzerinde iyi bir etkinliği olmamasına rağmen, bu çalışmaya benzer şekilde biyofilm ortamında duyarlılıkta %6.6 azalma olduğu görülmüştür.

Biyofilmlerde, ÇKBT yöntemini kullanarak antibiyotik kombinasyonlarını inceleyen Saginur ve arkadaşlarının¹² verilerine göre, ikili kombinasyonlar içinde en etkili VAN + RIF bulunmuş; üçlü kombinasyonlardan da RIF + VAN + GEN ve RIF + VAN + CIP biyofilmlerde de planktonikte olduğu gibi %100 duyarlı çıkmıştır. Çalışmamızda da üçlü kombinasyonlar arasında en etkin olanlardan birisi VAN + CIP + RIF kombinasyonudur. MRKNS suşları için biyofilm ortamında Saginur ve arkadaşlarının¹² bulgularını destekler şekilde bu kombinasyonun aktivitesi daha da yüksek bulunmuştur. Ancak bu araştırmacıların¹² çalışmasından farklı olarak çalışmamızda, ikili ve üçlü kombinasyonlarda planktonik hücreler ve biyofilm ortamında %90 inhibisyon açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu çalışmada MRSA izolatlarında, Molina ve arkadaşlarının¹³ bulgularından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda rifampisine hem planktonik hücrelerde hem de biyofilm ortamında tüm izolatlar dirençli bulunmuş, gentamisine ise sadece bir izolat planktonik ortamda duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda tigesiklin aktivitesi, MRSA planktonik hücreleri ve biyofilmden yakın oranlarda tespit edilmiştir (sırasıyla %100 ve %86.6). Smith ve arkadaşları¹⁴, biyofilm

Tablo V. MRSA ve MRKNS İzolatlarının ÇKBT ile İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlılık Oranları

	MRSA		MRKNS	
	P n (%)	B n (%)	P n (%)	B n (%)
LV	15 (100)	11 (73)	15 (100)	11 (73)
LG	14 (93)	2 (13)	15 (100)	10 (67)
LC	15 (100)	3 (20)	14 (93)	11 (73)
LT	15 (100)	2 (13)	15 (100)	10 (67)
LR	15 (100)	2 (13)	15 (100)	8 (53)
VG	15 (100)	9 (60)	13 (87)	11 (73)
VC	14 (93)	12 (80)	15 (100)	13 (87)
VT	15 (100)	7 (47)	15 (100)	13 (87)
VR	15(100)	13 (87)	15 (100)	14 (93)
GC	2 (13)	0	7 (47)	5 (33)
GT	14 (93)	5 (33)	14 (93)	12 (80)
GR	2 (13)	1 (7)	8 (53)	7 (47)
CT	14 (93)	0	14 (93)	3 (20)
CR	0	0	8 (53)	5 (33)
TR	15 (100)	2 (13)	15 (100)	9 (60)
LM	15 (100)	3 (20)	13 (87)	13 (87)
LS1	15 (100)	5 (33)	15 (100)	13 (87)
LS2	15 (100)	5 (33)	15 (100)	11 (73)
VM	14 (93)	12 (80)	14 (93)	11 (73)
VS1	12 (80)	10 (67)	15 (100)	15 (100)
VS2	13 (87)	10 (67)	15 (100)	14 (93)
MT	14 (93)	7 (47)	15 (100)	15 (100)
TS1	15 (100)	2 (13)	15 (100)	14 (93)
TS2	15 (100)	1 (7)	13 (87)	12 (80)

ÇKBT: Çoklu kombinasyonlu bakterisidal test; MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok; P: Planktonik hücreler; B: Biyofilm; C: Siprofloksasin; G: Gentamisin; M: Merope-nem; L: Linezolid; R: Rifampisin; S1: Sefazolin; S2: Seftazidim; T: Tigesiklin; V: Vankomisin.

hücrelerinde linezolid ve tigesiklinin MRSA planktonik hücreleri üzerinde çok etkin olmasına rağmen, biyofilm ortamında etkinliklerinin belirgin olarak azaldığını ve bu antibiyotiklerin kateterde biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde yeterli etkinlikte olamayacağını belirtmektedirler. Bizim çalışmamızda da Smith ve arkadaşlarının¹⁴ bulgularına benzer şekilde biyofilm ortamında linezolid aktivitesinde azalma saptanmıştır. MRSA izolatlarında tüm antibiyotiklerde planktonik hücreler için elde edilen MBK değerleri çoğunlukla biyofilm ortamına göre daha düşük gözlenmiş, tigesiklinde ise MBK değerlerinin biyofilimde 2-4 kat daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Tigesiklin ile elde edilen bu ilginç sonuç için; biyofilm ortamı içinde henüz tam olarak çözümleyemediğimiz bir etkenin ya

Tablo VI. MRSA ve MRKNS İzolatlarının ÇKBT ile Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlılık Oranları

	MRSA		MRKNS	
	P n (%)	B n (%)	P n (%)	B n (%)
LGC	13 (87)	6 (40)	11 (73)	11 (73)
LGT	14 (93)	4 (27)	13 (87)	9 (60)
LGR	15 (100)	1 (7)	13 (87)	8 (53)
LCT	15 (100)	5 (33)	10 (67)	9 (60)
LCR	11 (73)	5 (33)	11 (73)	9 (60)
LTR	15 (100)	6 (40)	14 (93)	11 (73)
VGC	14 (93)	12 (80)	10 (67)	13 (87)
VGT	14 (93)	8 (53)	12 (80)	12 (80)
VGR	12 (80)	11 (73)	14 (93)	12 (80)
VCT	15 (100)	10 (67)	12 (80)	14 (93)
VCR	11 (73)	12 (80)	10 (67)	14 (93)
VTR	14 (93)	8 (53)	14 (93)	13 (87)
GCT	14 (93)	3 (20)	13 (87)	12 (80)
GCR	3 (20)	0	8 (53)	7 (47)
CTR	12 (80)	3 (20)	15 (100)	10 (67)
VMC	9 (60)	11 (73)	11 (73)	15 (100)
VMT	13 (87)	10 (67)	13 (87)	15 (100)
VCS1	14 (93)	10 (67)	14 (93)	15 (100)
VCS2	10 (67)	11 (73)	12 (80)	15 (100)
LMS1	11 (73)	7 (47)	13 (87)	14 (93)
LMS2	13 (87)	7 (47)	11 (73)	13 (87)
LS1S2	14 (93)	1 (7)	15 (100)	13 (87)
VMS1	15 (100)	6 (40)	14 (93)	13 (87)
VMS2	10 (67)	12 (80)	13 (87)	13 (87)
VS1S2	14 (93)	0	12 (80)	8 (53)

ÇKBT: Çoklu kombinasyonlu bakterisidal test; MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok; P: Planktonik hücreler; B: Biyofilm; C: Siprofloksasin; G: Gentamisin; M: Merope-nem; L: Linezolid; R: Rifampisin; S1: Sefazolin; S2: Seftazidim; T: Tigesiklin; V: Vankomisin.

da koşulun, tigesiklinin bakteriler üzerindeki sidal etkisini daha düşük konsantrasyonda göstermesine neden olduğu düşünülmüştür. Bu konuda yapılmış çalışmalarda, stafilokokal biyofilmlerde tigesiklinin biyofilm kalınlığını azalttığı, biyofilmdeki bakterilerin üremesini üçüncü günde tamamen inhibe ettiği ve N-asetilsistein ile kombinasyonundaki başarısı göz önüne alındığında bu ikilinin kateter koruyucu olarak tercih edilebileceği bildirilmektedir¹⁵⁻¹⁷. Labthavikul ve arkadaşları¹⁸ tigesiklinin aderan *Staphylococcus epidermidis* hücreleri üzerinde planktonik hücrelere göre daha iyi aktivite gösterdiğini ve KİKDE tedavisinde tercih edilebileceğini belirtmişlerdir. Ancak tigesiklinin biyofilm ortamındaki

inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonlarının planktonik hücre sonuçları ile yakın olması, bu çalışmada farklı bir bulgu olarak karşımıza çıkmış ve tigesiklinin KİE’de iyi bir seçenek olabileceğini düşündürmüştür.

Meropenem, sefazolin ve seftazidime özellikle MRSA ve MRKNS suşlarında direnç görüldüğü halde, seftobiprol gibi yeni moleküllerin etkinliği üzerine yapılan yayınlarda düşük pH’da görülen yüksek duyarlılık değerlerinden dolayı bu üç antibiyotik çalışmamıza dahil edilmiştir¹⁹. Bizim çalışmamızda da bu üç antibiyotik tek başına iken MRSA ve MRKNS suşlarında tamamen etkisiz olmasına rağmen, ilginç olarak, özellikle diğer ilaçlarla kombinasyonlarda başarılı bulunmuştur. MRSA ve MRKNS izolatlarında bu antibiyotiklerin vankomisin, linezolid ve tigesiklin içeren kombinasyonlarına yüksek oranda duyarlılık gözlenmiştir. Biyofilimde MRSA suşlarında VAN + MER kombinasyonu en iyi aktiviteyi gösterirken, üçlü kombinasyonlarda en iyi etkinlik VAN + MER + CTZ kombinasyonunda belirlenmiştir. MRKNS izolatlarında MER + TIG ile VAN + CEZ’e hem planktonik hücrede hem de biyofilimde %100 duyarlılık görülmüştür. Üçlü kombinasyonlarda da vankomisinin meropenem, sefazolin ve seftazidim ile tüm kombinasyonları oldukça yüksek etkinlik göstermiştir.

Biyofilimde MRSA suşlarında vankomisin tek başına kullanıldığında elde edilen MBK değerleri 64 mg/L’nin üzerinde iken, vankomisinin meropenem, seftazidim ve tigesiklinli kombinasyonlarında suşların yarısından fazlasında bakterisidal etki görülmesi sinerjiyi düşündürmektedir. Bu sonuçlar, “Beta-laktam grubu antibiyotiklerin vankomisin ile kombinasyonu farklı mekanizmalarla direnci azaltıyor mu?” sorusunu akla getirmektedir. Bu etkinliğin, adı geçen antimikrobialerin vankomisinin biyofilm ortamına penetrasyonunu artırmasına bağlı olabileceği ya da biyofilm ortamında metabolik dengelerde yaptıkları henüz bilinmeyen değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu hipotetik yaklaşımların aydınlatılabilmesi için ileri araştırmalara gereksinim vardır. Etki mekanizmaları dikkate alındığında vankomisinin yavaş bakterisidal etki gösterdiği ve bu nedenle bakterileri özellikle yüksek inokulumda daha belirgin olarak beta-laktamlardan daha yavaş öldürdüğü bilinmektedir. Özellikle metisiline duyarlı *S.aureus* bakteriyemisi ve endokarditlerinde beta-laktam grubu antibiyotikler vankomisinden daha yüksek etkinlik göstermektedir²⁰. Rochon-Edouard ve arkadaşlarının²¹ disk difüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada, sefazolin ve imipenemin vankomisin ile kombine edildiğinde MRSA izolatlarına karşı güçlü bakterisidal etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. *Time kill* yönteminin kullanıldığı in vitro bir çalışmada, beta-laktam (seftriakson, seftazidim, sefpodoksim) grubu antibiyotiklerle vankomisin kombinasyonlarının MRSA izolatlarında benzer şekilde sinerjistik etki oluşturduğu bildirilmektedir²². Bir başka çalışmada da, sefazolinin vankomisin ile kombinasyonunda *time kill* yöntemiyle MRSA suşlarında öldürme oranlarında artış olduğu rapor edilmiştir²³.

Sonuç olarak çalışmamızın verileri, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda kombine tedavi tercihinin, özellikle de ikili kombinasyonların akılcı tedavi yaklaşımı olacağını düşündürmektedir. Bu bulgular, klinik bakımdan in vivo verilerle desteklendiği takdirde KİKDE tedavisinde daha başarılı sonuçların elde edilebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tacconelli E, Smith G, Hieke K, Lafuma A, Bastide P. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature and registry-based estimates. *J Hosp Infect* 2009; 72(2): 97-103.
2. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274(8): 639-44.
3. Yılmaz N, Köse Ş, Ağuş N, Ece G, Akkoçlu G, Kıraklı C. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar, antibiyotik duyarlılıkları ve nozokomiyal bakteriyemi etkenleri. *ANKEM Derg* 2010; 24(1): 12-9.
4. Rosenthal VD, Maki DG, Jamultrat S, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. *Am J Infect Control* 2010; 38(2): 95-104.
5. Williams P. Quorum sensing. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(2-3): 57-9.
6. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* 2012; 12(3):2519-38.
7. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 107-13.
8. Altun HU, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2008; 39(2): 82-8.
9. Kotilainen P, Nikoskelainen J, Huovinen P. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococcal blood isolates with special reference to adherent, slime-producing *Staphylococcus epidermidis* strains. *Scand J Infect Dis* 1991; 23(3): 325-32.
10. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(4): 939-41.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları. On-dokuzuncu Bilgi Eki, M100-S19, 2009. Gür D (Çeviri ed), Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul.
12. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1): 55-61.
13. Molina A, Del Campo R, Maiz L, et al. High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(5): 961-7.
14. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(4): 374-8.
15. Raad I, Hanna H, Jiang Y, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(5): 1656-60.
16. Prestler E, Lassnigg A, Eder M, Reichmann S, Hirschl AM, Graninger W. Effects of tigecycline, linezolid and vancomycin on biofilms of viridans streptococci isolates from patients with endocarditis. *Int J Artif Organs* 2007; 30(9): 798-804.
17. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4): 1556-8.
18. Labthavikul P, Petersen PJ, Bradford PA. In vitro activity of tigecycline against *Staphylococcus epidermidis* growing in an adherent-cell biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12): 3967-9.
19. Lemaire S, Glupczynski Y, Duval V, et al. Activities of ceftobiprole and other cephalosporins against extra-cellular and intracellular (THP1 macrophages and keratinocytes) forms of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6): 2289-97.
20. Taşova Y. Dirençli gram-pozitif bakteri infeksiyonlarında güncel tedavi. *Yoğun Bakım Derg* 2012; 10(3): 147-64.

21. Rochon-Edouard S, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Caron F. In vitro synergistic effects of double and triple combinations of beta-lactams, vancomycin, and netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11): 3055-60.
22. Climo MW, Patron RL, Archer GL. Combinations of vancomycin and beta-lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1747-53.
23. Hagihara M, Wiskirchen DE, Kuti JL, Nicolau DP. In vitro pharmacodynamics of vancomycin and cefazolin alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(1): 202-7.