

Vankomisin ve Daptomisin'in Koagülaz-Negatif Stafilokok İzolatlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine İn Vitro Etkisi*

In Vitro Effect of Vancomycin and Daptomycin on Biofilm Formation of Coagulase-Negative Staphylococci Strains

Duygu Nilüfer ÖCAL¹, İftar DOLAPÇI², Zeynep GENÇTÜRK³, Alper TEKELİ²

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

¹ University of Health Sciences, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri (1-3 Nisan 2016, İstanbul)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 29.03.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.06.2017

ÖZ

Koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS)'ın etken olarak ilk sıralarda yer aldığı kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) ve çoğu santral venöz kateter kullanımı ile ilişkili olan kateter ilişkili KDE (KİKDE), antibakteriyel ve destekleyici tedavilere rağmen morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Bu enfeksiyonların uygun tedavilerinin yapılması için etken mikroorganizmaların özelliklerinin belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmada, KDE ve KİKDE etkeni olan KNS türlerinin biyofilm oluşturma özelliklerinin gösterilmesi, vankomisin ve daptomisin için planktonik formlardaki duyarlılıklarının belirlenmesi için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve biyofilm oluşturan sesil formlarının duyarlılıklarının belirlenmesi için minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değerlerinin saptanması ve in vitro olarak biyofilm oluşturan izolatlarla oluşan enfeksiyonlarda bu antibiyotiklerin etkinliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan toplam 65 KNS izolatı konvansiyonel yöntemlerle birlikte BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) sistemleriyle tiplendirilmiştir. Metisilin direnci *mecA* geni varlığı PCR ile araştırılarak belirlenmiş, vankomisin ve daptomisin MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi (daptomisin için 25 ve 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren besiyerleri ile) ile saptanmıştır. Biyofilm oluşumunun ve MBEK değerlerinin tespitinde mikropalak yöntemi

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Duygu Nilüfer Öcal, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, 06110 Dışkapı, Ankara, Türkiye.

Tel (Phone): +90 312 596 2671, E-posta (E-mail): drduygunil@hotmail.com

kullanılmıştır. KNS türleri arasındaki klonal ilişki PFGE yöntemi ile araştırılmıştır. Değerlendirilen 26'sı kateter kolonizanı; 28'i KİKDE etkeni ve 11'i KDE etkeni olan toplam 65 izolatin, 33'ü *Staphylococcus epidermidis*, 16'sı *Staphylococcus haemolyticus*, 15'i *Staphylococcus hominis*, biri *Staphylococcus capitis* olarak tiplendirilmiştir. İzolatların %81.5'i metisiline dirençli olarak saptanırken, hepsi vankomisin (MİK= 0.125-4 µg/ml) ve daptomisine (25 µg/ml Ca⁺⁺ içeren besiyerinde MİK= 0.062-0.50 µg/ml; 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren besiyerinde ise MİK= 0.031-0.25 µg/ml) duyarlı bulunmuştur. Daptomisin için 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren besiyerinde MİK değerleri daha düşük saptanmıştır (p< 0.001). Daptomisinin etkinliğinin, bu antibakteriyelin yapısında konformasyonel değişikliklere neden olan Ca⁺⁺'nin fizyolojik seviyelerine bağlı olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda elde edilen bulguda daptomisinin etkinliğinin en iyi düzeyde olması için yüksek Ca⁺⁺ düzeylerine ihtiyaç olduğu yönünde yorumlanmıştır. İzolatların tamamı [(12 (%18.5)'si zayıf, 35 (%53.8)'i orta, 18 (%27.7)'i güçlü pozitif)] biyofilm oluşturmıştır. Vankomisinin MBEK ve MBEK/MİK değerleri daptomisine göre yüksek saptanmıştır (p< 0.001). Kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların MBEK ve MBEK/MİK değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (p< 0.05). Özellikle biyofilm oluşturan izolatlarla meydana gelen enfeksiyonlarda, sadece MİK değerinin saptanması planktonik formdaki bakterilerin duyarlılığını yansıttığından biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde her zaman yeterli olmamaktadır. Çalışmamızda elde edilen yüksek MBEK değerleri, MİK ve MBEK değerleri arasındaki uyumsuzluk ve MBEK/MİK, MBEK₅₀/MİK₅₀ ve MBEK₉₀/MİK₉₀ oranlarının yüksekliği bu öngörüyü desteklemektedir. Daptomisinin MBEK ve MBEK/MİK değerlerinin vankomisinin aynı değerlerine göre daha düşük saptanması, biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde vankomisine göre daha düşük dozlarda etkin olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Koagülaz-negatif stafilokoklar; biyofilm; vankomisin; daptomisin; minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK).

ABSTRACT

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are one of the primer agents of blood stream infections (BSI) and catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) which are associated mostly with the usage of central venous catheters and, important causes of morbidity and mortality despite the usage of antibacterial and supportive treatment. It is important to determine the properties of these causative microorganisms in order to make appropriate treatment of such infections. The aims of our study were to evaluate the biofilm formation of coagulase negative staphylococci (CNS) which were causative agents of bloodstream (BSI) and catheter related bloodstream infections (CR-BSI), to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of planktonic forms and minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of sessile forms for vancomycin and daptomycin and to evaluate the efficacy of these antibiotics in infections with biofilm-forming isolates in vitro. A total of 65 CoNS (n= 26 catheter colonizers, n= 28 CR-BSI, n= 11 BSI agents) were identified by conventional methods and also with BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) and Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Germany) systems. Methicillin resistance was determined by the presence of *mecA* gene with PCR. MIC values of vancomycin and daptomycin were investigated by broth microdilution, for daptomycin medium containing 25 and 50 µg/ml Ca⁺⁺ were used. Assessment of biofilm formation and detection of MBEC were determined by microplate method. The clonal relationship was investigated by the PFGE method. A total of 65 isolates; 26 catheter colonizers, 28 CR-BSI agents and 11 BSI agents were evaluated and identified as *Staphylococcus epidermidis* (n= 33), *Staphylococcus haemolyticus* (n= 16), *Staphylococcus hominis* (n= 15), and *Staphylococcus capitis* (n= 1). 81.5% of the isolates were found to be methicillin resistant and all of them were found to be sensitive to vancomycin (MIC= 0.125-4 µg/ml) and daptomycin (MIC= 0.062-0.25 µg/ml in 25 µg/ml Ca⁺⁺ and MIC= 0.031-0.50 µg/ml in 50 µg/ml Ca⁺⁺ containing medium). MIC values were lower in medium containing 50 µg/ml Ca⁺⁺ for daptomycin. As it is known that the efficacy of daptomycin depends on the physiological levels of Ca⁺⁺, which causes conformational changes in the structure of these antibacterials. Our findings also suggested that high levels of Ca⁺⁺ are needed to ensure the efficacy of daptomycin. All of the isolates produced biofilm at different strengths of positivity (n= 12/18.5% weak, n= 35/53.8 moderate, n= 18/27.7 strong). MBEC and MBEC/MIC values for vancomycin were found to be higher

than daptomycin ($p < 0.001$). Strong biofilm producers had higher MBEC and MBEC/MIC, MBEC₅₀/MIC₅₀ ve MBEC₉₀/MIC₉₀ values ($p < 0.05$). Especially in infections with biofilm forming isolates, the detection of only MIC values are not always sufficient in the treatment of biofilm-related infections as they reflect the sensitivity of planktonic bacteria. The inconsistency between the MIC and MBEC values and the high rates of MBEC/MIC found in our study supported this prediction. The lower detection of MBEC and MBEC/MIC values of daptomycin compared to the same values of vancomycin suggested that daptomycin might be effective at lower doses than vancomycin in the treatment of biofilm infections.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci; biofilm; vancomycin; daptomycin; minimal biofilm eradication concentration (MBEC).

GİRİŞ

Günümüzde nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında önemli yeri olan heterojen bir grup olan koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS), cilt yüzeylerinde kolonizasyonlarını, biyofilm oluşturmalarını, dokulara ve protez yüzeylerine adezyonlarını kolaylaştıran belirleyiciler ve immün sistemden sakınmayı içeren çeşitli virülans faktörleri içermektedir¹.

KNS'lerin etken olarak ilk sıralarda yer aldığı kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) ve kateter ilişkili enfeksiyonlar, antibakteriyel ve destekleyici tedavilere rağmen morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerindendir ve bu nedenle erken tanı ve uygun tedavilerinin yapılması önemlidir². Kateter ilişkili KDE (KİKDE)'nin çoğu santral venöz kateter (SVK) kullanımı ile ilişkilidir ve sıklıkla yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda görülmektedir. KİKDE, ateş, üşüme, titreme ve/veya hipotansiyon gibi enfeksiyon bulguları olan ve KDE'yi açıklayacak, kateter dışında bir odağı bulunmayan hastada, "kateter kültüründe (semikantitatif kültürde > 15 kob veya kantitatif kültürde $> 10^3$ kob) ve periferik kanda benzer biyotip ve antibiyotik duyarlılığına sahip mikroorganizmanın izole edilmesi" veya "aynı anda alınmış kantitatif kan kültürlerinde, kateter içi kan kültüründeki üreme oranının periferik kan kültüründekine göre en az beş kat fazla olması" veya "aynı anda alınmış kateter içi kan kültüründe, periferik kan kültüründen en az iki saat önce üreme olması" şeklinde tanımlanmaktadır^{3,4}.

Stafilokoklarda metisilin direnci ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmakta ve metisiline dirençli stafilokokların etken olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde glikopeptidler ilk sırada kullanılan ajanlar olarak yer almaktadır⁵. *Streptomyces orientalis*'ten elde edilen vankomisin, bir hücre duvarı bileşeni olan peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon basamağını inhibe ederek hücre duvar sentezini engellemektedir⁶. Daptomisin ise *Streptomyces roseosporus* tarafından üretilen doğal siklik lipopeptittir ve KNS'lerin etken olduğu bakteriyemi, endokardit ve KİKDE tedavisinde iyi bir seçenek olarak kullanılmaktadır^{5,7-9}.

Çalışmamızda KDE ve KİKDE etkeni olan KNS izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Sonrasında biyofilm oluşturan izolatlar seçilerek vankomisin ve daptomisin ile karşı karşıya bırakılmıştır. İzolatların planktonik formlardaki duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, biyofilm oluşturan sesil formlarının duyarlılıklarının belirlenmesi için ise

minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değerleri saptanmıştır. Böylece, in vitro olarak biyofilm oluşturan izolatlarla oluşan enfeksiyonlarda bu antibiyotiklerin etkinliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 21-680-12).

Bakteri İzolatları ve Tanımlanması

2012-2014 yılları arasında Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakterioloji birimine gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve biyofilm oluşturduğu saptanan KNS'ler çalışmaya dahil edildi. Çalışmamızda SVK ve periferik kan kültürlerinden üretilen ve 26 (%40)'sı kateter kolonizanı, 28 (%43.1)'i KİKDE etkeni ve 11 (%16.9)'i KDE etkeni olarak tanımlanan toplam 65 KNS değerlendirildi.

SVK'lardan bakteri izolasyonunda %5'lik koyun kanlı agar, Eosin Methylene Blue (EMB) agar ve çikolata agar besiyerleri kullanılarak, semikantitatif ve tam kantitatif kültür yöntemi uygulandı¹⁰. 24-48 saatlik inkübasyon sonunda semikantitatif yöntemde ≥ 15 kob, tam kantitatif kültür yönteminde ise $\geq 10^3$ kob bakteri üremesi pozitif üreme olarak kabul edildi. Semikantitatif veya kantitatif kültür sonucunda bakteri üremesi ve eş-zamanlı alınan periferik kan kültüründe de aynı bakterinin izole edilmesi (üreme saatleri arasında farklar gözetilerek) ve klinik olarak sepsis belirtilerinin bulunması durumunda izole edilen KNS; KİKDE etkeni olarak tanımlandı¹¹. Eşlik eden klinik semptomlar yokken, semikantitatif veya kantitatif yöntemle kateter ucu veya kateter hubundan yapılan ekimde bakteri üremesi, buna karşın periferik kan kültüründe üreme olmaması durumunda izole edilen KNS; kateter kolonizanı olarak değerlendirildi¹¹.

Kan kültürleri, BACTEC 9050 (Becton Dickinson, Maryland, ABD) otomatik kan kültürü cihazında inkübe edildi, alarm veren şişelerden hazırlanan Gram boyalı preparatlar değerlendirildikten sonra %5'lik koyun kanlı agar, EMB ve çikolata agar besiyerlerine ekim yapıldı. İki veya daha fazla sette aynı tür üreme olması durumunda, klinik olarak ateş, titreme hipotansiyon bulgularından birinin varlığıyla birlikte izole edilen mikroorganizma etken olarak kabul edildi¹².

İzolatların tiplendirilmesinde konvansiyonel yöntemler ile birlikte BD Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) otomatize sistemleri kullanıldı.

Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Metisilin direncinin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *mecA* geni varlığı araştırıldı. Bu amaçla, DNA izolasyon kiti (Fermentas, Litvanya) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ekstrakte edilen DNA'lar *mecA* (F: 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'; R: 5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3') primerleri kullanılarak, Geha ve arkadaşlarının¹³ yöntemi temel alınarak gösterildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

KNS izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), rifampisin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg), teikoplanin (30 µg) ve linezolid (30 µg) duyarlılıkları araştırıldı. Zon çapları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda değerlendirildi¹⁴.

Vankomisin ve Daptomisin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Değerlerinin Saptanması

Vankomisin (Sigma Aldrich, ABD) ve daptomisin (Sigma Aldrich, ABD) için sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK saptanması CLSI M27-A3 standartlarına göre yapıldı¹⁵. Daptomisin için son konsantrasyonları 25 ve 50 µg/ml Ca⁺⁺ olacak şekilde katyon ilave edilen iki ayrı Mueller-Hinton Buyyon (MHB) II (BBLTM, Becton Dickinson, ABD) besiyeri kullanıldı. Kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Hazırlanan mikropalaklar 35°C'de 24 saat süre ile inkübe edildi ve ertesi gün her sırada üremenin olmadığı ilk kuyucuk MİK değeri olarak belirlendi. Bu test her izolat için üç kez tekrarlandı.

Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

İzolatların biyofilm oluşturma özellikleri mikropalak yöntemi ile kantitatif olarak gösterildi. Bulanıklığı 0.5 McFarland (10⁸ kob/ml) standardında ayarlanan bakteri süspansiyonlarına, %1 glukoz ilave edildi 180 µl triptik soy buyyon içeren düz tabanlı mikropalak kuyucuklarına dağıtıldı ve 24 saat süre ile 35°C'de inkübasyona bırakıldı. ertesi gün fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkanarak tutunmayan bakteriler uzaklaştırıldı, plaklar kurutuldu ve metanol ile biyofilm oluşturan bakterilerin fiksasyonu sağlandı. Kristal viyole ile boyanan mikrokuyucuklara, %95'lik etanol konularak, absorbanları spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutuldu¹⁶. Sadece besiyeri içeren kuyucukların optik densitometrelerinin ortalaması alındı ve üç standart derivasyonu hesaplanarak cut-off (OD_c) değeri belirlendi. OD ≤ Odc: negatif, Odc < OD ≤ 2 x Odc: zayıf, 2 x Odc < OD ≤ 4 x Odc: orta ve 4 x Odc < OD: güçlü düzeyde biyofilm oluşumu şeklinde yorumlandı¹⁶.

Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyonu (MBEK)'nin Belirlenmesi

Biyofilm oluşturduğu gösterilen izolatların hepsinde vankomisin ve daptomisin MBEK değerleri belirlendi. İlk olarak izolatların 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalaklarda biyofilm oluşturmaları sağlandı, sonrasında kuyucuklara azalan konsantrasyonlarda vankomisin ve daptomisin (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 ve 0.125 µg/ml) ilave edildi. Plaklar 24. saat sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutulmuş ve optik yoğunluklarına göre değerlendirildi. Her sırada ODC değerinin altındaki değer veren ilk kuyucuktaki ilaç konsantrasyonu, o ilaç için MBEK değeri olarak belirlendi¹⁷. MBEK saptanmasında vankomisin için MHBII, daptomisin için 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren MHBII kullanıldı¹⁵.

Biyofilm oluşumu gösterilmesi ve MBEK hesaplanması deneylerinde pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol

olarak *S.aureus* ATCC 29213 standart suşları, sterilite kontrolü için sadece besiyeri içeren, bakteri ilave edilmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır.

Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

KNS türleri arasındaki klonal ilişki Mulvey ve arkadaşlarının¹⁸ geliştirdiği yöntem ile araştırıldı. Elde edilen DNA paternleri "Gene Directory Programme (Syngene, UK)" programı kullanılarak incelendi. İzolatlar arası ilişkinin değerlendirilmesinde; benzerlik indeksi "Dice" katsayısı, %1 tolerans değeri ve aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages-UPGMA) yöntemi kullanıldı¹⁹.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min-maks) olarak gösterildi.

Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemi ANOVA (varyans analizi) testi ile ortanca değerler yönünden farkın önemi Kruskal Wallis ile araştırıldı. Nominal değişkenler Pearson ki-kare veya Fisher Exact-testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma kapsamındaki 65 KNS'nin; 26 (%40)'sı kateter kolonizanı, 28 (%43.1)'i KİKDE etkeni, 11 (%16.9)'i KDE etkeni olarak izole edilmiştir. İzolatların 33 (%50.8)'ü *S.epidermidis*; 16 (%24.6)'sı *Staphylococcus haemolyticus*; 15 (%23.1)'i *Staphylococcus hominis*, 1 (%1.5)'i *Staphylococcus capitis* olarak tanımlanmıştır (Tablo I).

PCR yöntemiyle izolatların %81.5'i (%38.5 *S.epidermidis*, %24.5 *S.haemolyticus*, %18.5 *S.hominis*) *mecA* pozitif, %18.5'i (%12.4 *S.epidermidis*, %4.6 *S.hominis*, %1.5 *S.capitis*) *mecA* negatif olarak saptanmıştır. Kateter kolonizanı olarak tespit edilen KNS'lerin %76.9 (20/26)'u; KİKDE etkeni olarak saptanan KNS'lerin %78.6 (22/28)'sı; KDE etkeni olarak saptanan KNS'lerin tümünün *mecA* geni taşıdığı saptanmıştır (Tablo I).

S.epidermidis, *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.capitis* izolatlarının antibiyotik direnç oranları Tablo II'de gösterilmiştir. Çalışmadaki bütün izolatlar teikoplanin ve linezolidde karşı duyarlı olarak saptanmıştır.

Sefoksitin diski ile direnç saptanan KNS suşları amoksisilin-klavulanik asite de dirençli olarak kabul edilmiştir¹⁴.

İzolatların biyofilm oluşturma kuvvetlerinin belirlenmesinde elde edilen cut-off değeri esas alınmış (OD_{600} : 0.28) ve 12 (%18.5)'sinin zayıf, 35 (%53.8)'inin orta, 18 (%27.7)'inin güçlü pozitif biyofilm oluşturduğu bulunmuştur (Tablo III). İzolatların oluşturdukları biyofilm derecesi ile etken olarak tanımlandıkları klinik örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p > 0.05$).

Çalışmadaki izolatların tümü vankomisin ve daptomisine duyarlı bulunmuştur. Vankomisin MİK değerleri 0.125-4 $\mu\text{g/ml}$, daptomisin MİK değerleri 25 $\mu\text{g/ml}$ Ca^{++} içeren

Tablo 1. KNS Türlerinin İzole Edildikleri Örneklerle ve Metisilin Direnç Oranlarına göre Dağılımı									
İzolatlar	S.epidermidis		S.haemolyticus		S.hominis		S.capitis		Toplam
	mecA (+)	mecA (-)	mecA (+)	mecA (-)	mecA (+)	mecA (-)	mecA (+)	mecA (-)	
Metisilin direnç/duyarlılık									
Kateter kolonizasyonu (%)	9 (13.8)	4 (6.2)	4 (6.2)	-	7 (10.8)	1 (1.5)	-	1 (1.5)	26
KİKDE etkenleri (%)	10 (15.4)	4 (6.2)	8 (12.3)	-	4 (6.2)	2 (3.1)	-	-	28
KDE etkenleri (%)	6 (9.2)	-	4 (6.2)	-	1 (1.5)	-	-	-	11
Toplam (%)	25 (38.5)	8 (12.3)	16 (24.6)	-	12 (18.5)	3 (4.6)	-	-	65
	33		16		15		1		
KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu; KDE: Kan dolaşımı enfeksiyonu; KNS: Koagülaz-negatif stafilocok.									

Tablo II. KNS İzolatlarının Türlerine Göre Antibiyotik Direnç Oranları

	FOX*	CIP*	SXT*	RF*	E*	DA*	AMC*	TET*	GN*	TEC*	LIN*
<i>S.epidermidis</i>	25/33 (%75.8)	22/33 (%66.7)	13/33 (%39.4)	13/33 (%39.4)	26/33 (%78.8)	27/33 (%81.8)	25/33 (%75.8)	19/33 (%57.6)	15/33 (%45.5)	-	-
<i>S.haemolyticus</i>	16/16 (%100)	14/16 (%87.5)	13/16 (%81.3)	13/16 (%81.3)	13/16 (%81.3)	9/16 (%56.3)	16/16 (%100)	13/16 (%81.3)	11/16 (%68.8)	-	-
<i>S.hominis</i>	12/15 (%80)	12/15 (%80)	7/15 (%46.7)	6/15 (%40)	15/15 (%100)	11/15 (%73.3)	12/15 (%80)	12/15 (%80)	9/15 (%60)	-	-
<i>S.capitis</i>	-	1/1 (%100)	-	-	1/1 (%100)	1/1 (%100)	-	1/1 (%100)	-	-	-

KNS: Koagülaz-negatif stafilokok; FOX: Sefoksitin; CIP: Siprofloksasin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; RF: Rifampisin; E: Eritromisin; DA: Klindamisin; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; TET: Tetrasiklin; GN: Gentamisin; TEC: Teikoplanin; LIN: Linezolid.

Tablo III. Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesinde Kullanılacak ODC Hesaplanması

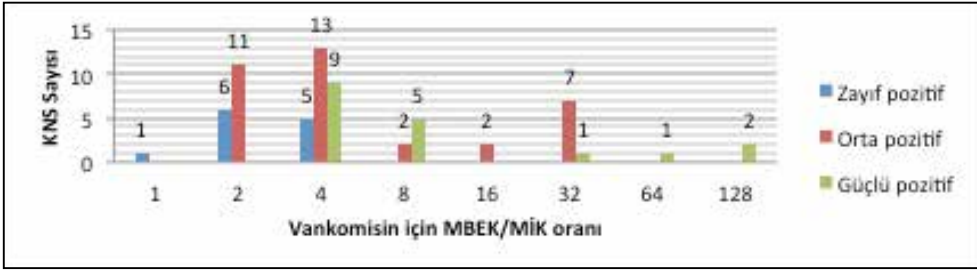
Formül	Değer	Yorum
$OD \leq ODC$	$OD \leq 0.28$	Negatif
$ODc < OD \leq 2 \times ODc$	$0.28 < OD \leq 0.56$	+
$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$	$0.56 < OD \leq 1.12$	++
$4 \times ODc < OD$	$1.12 < OD$	+++

besiyerinde 0.062-0.50 µg/ml, 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren besiyerinde ise 0.031-0.25 µg/ml arasında saptanmıştır. 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren MHBII besiyerinde daptomisin için MİK değerleri daha düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). Daptomisin MİK değerlerinin saptanmasında CLSI önerisi 50 µg/ml Ca⁺⁺ içeren MHBII besiyeri olduğundan ve sonuçlarımız daha düşük Ca⁺⁺ konsantrasyonunda MİK değerinin düştüğünü göstermediğinden, daptomisin MBK değerinin saptanmasında bu konsantrasyon ile çalışılmıştır.

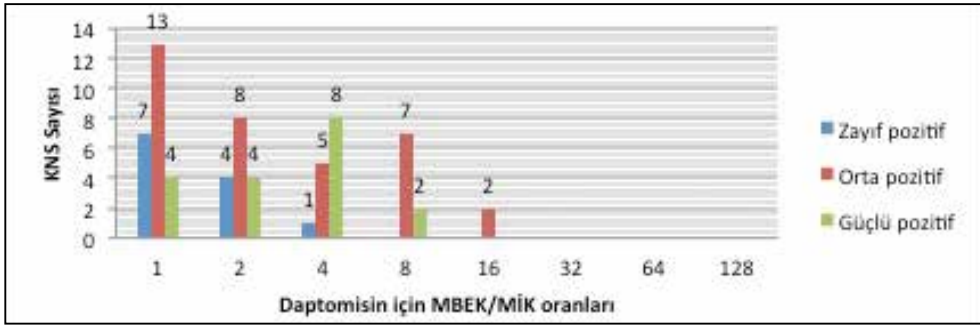
MBK değerinin saptanmasında kullanılacak ODC; her iki antibiyotik için ayrı ayrı (vankomisin için: 0.45; daptomisin için: 0.49) belirlenmiştir. İzolatların MBK değerleri; vankomisin için 2-64 µg/ml, daptomisin için 0.062-1 µg/ml arasında saptanmıştır (Tablo IV). Biyofilm oluşturma gücü yüksek olan izolatlar için her iki antimikrobiyalın da MBK

Tablo IV. Biyofilm Oluşturma Kuvvetlerine göre Daptomisin ve Vankomisin için MİK₅₀, MİK₉₀, MİK Değer Aralıkları, MBK₅₀, MBK₉₀ ve MBK Değer Aralıkları

Vankomisin						
	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	MİK aralığı (µg/ml)	MBK ₅₀ (µg/ml)	MBK ₉₀ (µg/ml)	MBK aralığı (µg/ml)
Zayıf (+)	2	2	1-2	4	4	2-8
Orta (++)	1	2	1-4	4	64	2-64
Güçlü (+++)	1	2	0.125-2	8	32	4-64
Daptomisin						
	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)	MİK aralığı (µg/ml)	MBK ₅₀ (µg/ml)	MBK ₉₀ (µg/ml)	MBK aralığı (µg/ml)
Zayıf (+)	0.062	0.062	0.031-0.062	0.062	0.062	0.031-0.125
Orta (++)	0.062	0.25	0.062-0.25	0.125	0.5	0.062-1
Güçlü (+++)	0.062	0.125	0.062-0.25	0.25	1	0.062-1



Şekil 1. Biyofilm oluşturma derecelerine göre vankomisin MBEK/MiK oranları.



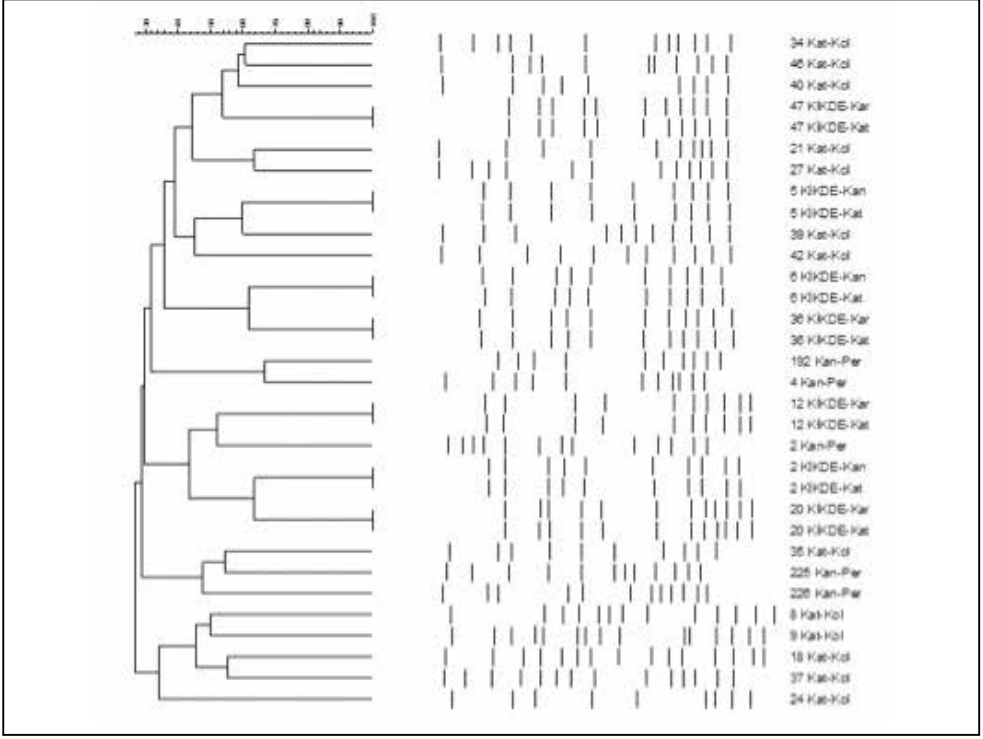
Şekil 2. Biyofilm oluşturma derecelerine göre daptomisin MBEK/MiK oranları.

değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (vankomisin için $p = 0.05$; daptomisin için $p = 0.029$).

İzolatların biyofilm oluşturan formları ile sesil formlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarındaki farklılıkları araştırmak için MBEK/MiK oranları değerlendirilmiştir. Vankomisin için MBEK/MiK değerleri 1-128; daptomisin için ise 1-16 arasında bulunmuştur (Şekil 1,2). Vankomisin MBEK/MiK değerleri, daptomisin MBEK/MiK değerlerinden yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). Zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda MBEK/MiK oranı düşükken, kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlarda bu oranın yükseldiği görülmüştür (vankomisin için $p = 0.006$; daptomisin için $p = 0.049$) (Şekil 1,2). KİKDE ve KDE etkenlerinde, kolonizan izolatlara göre her iki antimikrobiyalın da MBEK/MiK oranlarının yüksekliği anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

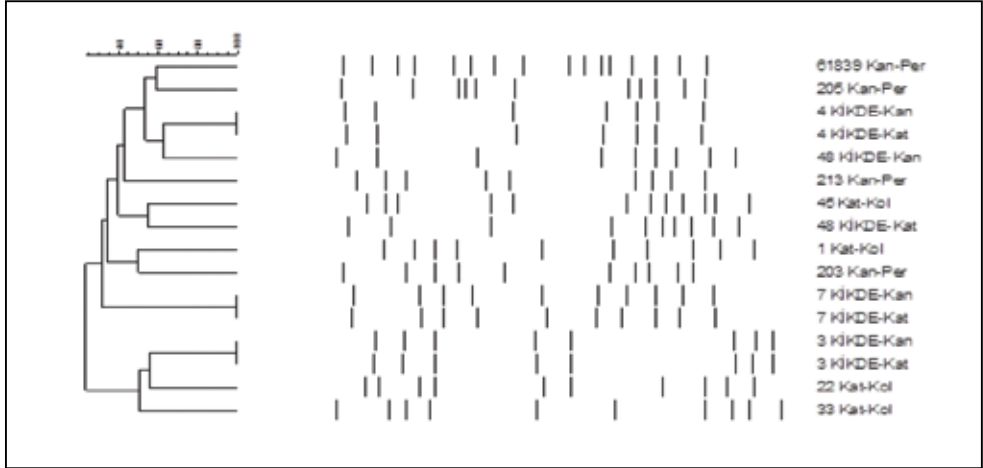
İzolatların %50 ve %90'ının oluşturduğu biyofilmin eradike edilebilmesi için gerekli en düşük ilaç değeri ile (sırasıyla MBEK₅₀ ve MBEK₉₀) ile izolatların %50 ve %90'ının ölebilmesi için gerekli en düşük ilaç konsantrasyonunun (sırasıyla MiK₅₀ ve MiK₉₀) karşılaştırılması sonucunda, vankomisin için MBEK₅₀ değerinin 1-8 kat, MBEK₉₀ değerinin 1-16 kat; aynı değerlerin daptomisin için sırasıyla 0-4 kat ve 0-8 kat yüksek olduğu saptanmıştır.

PFGE dendrogramları *S.epidermidis* için Şekil 3'te, *S.haemolyticus* için Şekil 4'te ve *S.hominis* için Şekil 5'te verilmiştir. Periferik kan kültüründen izole edilen bir *S.epidermidis* ve kateter kolonizanı bir *S.hominis* izolatı istenilen sayıda enzim kesim ürünü vermediğinden değerlendirme dışı bırakılmıştır. PFGE sonuçları yorumlandığında aynı hastaların SVK



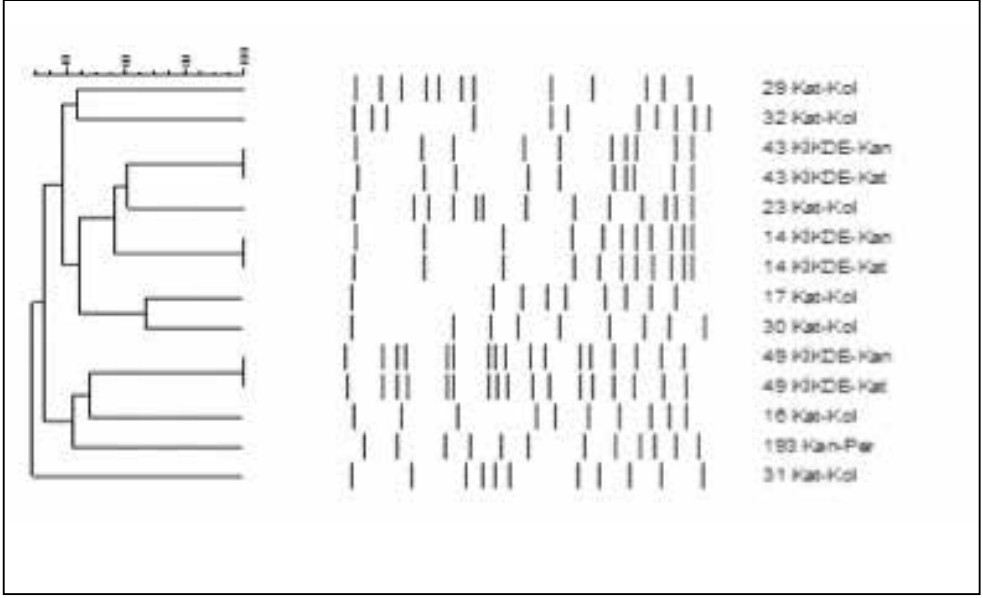
Şekil 3. *S. epidermidis* izolatlarının PFGE dendrogramı.*

* KİKDE-Kan: SVK ucu kültürü ile aynı zamanda gönderilen periferik kan kültüründen izole edilen KNS'ler; KİKDE-Kat: SVK kültüründen izole edilen KNS'ler; Kat-Kol: Kateter kolonizanı KNS'ler; Kan-Per: SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'leri ifade etmektedir.



Şekil 4. *S. haemolyticus* izolatlarının PFGE dendrogramı.*

* KİKDE-Kan: SVK ucu kültürü ile aynı zamanda gönderilen periferik kan kültüründen izole edilen KNS'ler; KİKDE-Kat: SVK kültüründen izole edilen KNS'ler; Kat-Kol: Kateter kolonizanı KNS'ler; Kan-Per: SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'leri ifade etmektedir.



Şekil 5. *S.hominis* izolatlarının PFGE dendogramı*

* KİKDE-Kan: SVK ucu kültürü ile aynı zamanda gönderilen periferik kan kültüründen izole edilen KNS'ler; KİKDE-Kat: SVK kültüründen izole edilen KNS'ler; Kat-Kol: Kateter kolonizasyonu KNS'ler; Kan-Per: SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'leri ifade etmektedir.

örnekleri ve kanlarından KİKDE etkeni olarak izole edilen suşların %100 benzer patern oluşturduğu gözlemlenmiş, diğer izolatlar arasında klonal ilişkinin olmadığı görülmüştür.

TARTIŞMA

KNS'lerin etken oldukları enfeksiyonların tedavilerinde klinik örnekten izole edilen KNS'lerin türlerinin belirlenmesinin önemli olduğu belirtilmektedir²⁰⁻²². Çalışmamızda kullanılan izolatların, 33 (%50.8)'ü *S.epidermidis*, 16 (%24.6)'sı *S.haemolyticus*; 15 (%23.1)'i *S.hominis* ve biri (%1.5) *S.capitis* olarak tanımlanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, klinik örneklerden *S.epidermidis* izole edilme oranı %36-49 arasında bildirilmektedir²⁰⁻²². İkinci ve üçüncü sıklıkta izole edilen KNS türlerini sırasıyla; Güzel ve arkadaşları²⁰ %39 *S.haemolyticus* ve %5 *S.hominis*, Çiftçi ve arkadaşları²¹ %42 *S.hominis* ve %9 *S.haemolyticus* olarak belirtmiştir. Çalışmamızda sıralanan KNS türleri ülkemizde yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Stafilokoklarda metisiline karşı gelişen direnç, oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığın en önemli nedenlerinden biridir. Çalışmamızda incelenen 65 KNS içinde; kateter kolonizasyonu olanların %76.9 (20/26)'u; KİKDE etkeni olanların %78.6 (22/28)'sı; KDE etkeni olanların %100'ü metisiline dirençli (*mecA* pozitif) olarak saptanmıştır. Tüm KNS'lerde metisiline direnç oranı ise %81.5 olarak tespit edilmiştir. KNS'lerde metisiline direnç oranlarını Güzel ve arkadaşları²⁰ %37.5, Akpaka ve arkadaşları²³ %45.1, Khorsed ve arkadaşları²⁴ %66.7, Çiftçi ve arkadaşları²¹ %82.2 olarak bulmuşlardır. Yılmaz ve arka-

daşları²² da metisiline direnç oranını, hastane enfeksiyonu etkeni olan KNS'lerde %100, hastane enfeksiyonu etkeni olmayan KNS'lerde %67 olarak saptamıştır. Çalışmamızda elde edilen yüksek metisiline direnç oranı; izolatlarımızın yarısından fazlasının enfeksiyon etkeni (%43.1 KİKDE, %16.9 KDE) olmasına bağlanmış ve son yıllarda KNS'lerde görülen metisiline direnç artışından kaynaklandığı düşünülmüştür. PFGE sonuçlarına göre izolatlar arasında klonal ilişkinin olmaması, bu bulguyu daha değerli kılmaktadır.

Metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarında tedavide ilk seçenek glikopeptitler olduğu için çalışmamızda vankomisinin MİK ve MBEK değerleri ölçülmüştür⁵. İzolatların MİK değerleri 0.125-4 µg/ml arasında saptanarak, vankomisine duyarlı oldukları bulunmuştur. KNS'lerde vankomisin duyarlılığının çeşitli yöntemler (gradiyent test, otomatize yöntemler, sıvı mikrodilüsyon) kullanılarak araştırıldığı birçok çalışmada da vankomisine dirençli KNS saptanmamıştır^{2,21,24}.

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda antibiyotiklerin özellikle de vankomisin gibi büyük molekül yapısına sahip olanların biyofilmin içine geçişinin zorluğu nedeniyle tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır. Çalışmamızda vankomisinin MBEK değerlerindeki (2-64 µg/ml) yükseklik bu bulguyu destekler nitelikte bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda antibiyotiklere direncin 10-1000 kat arttığı gösterilmiştir²⁵⁻²⁸.

Biyofilm oluşturan izolatlarla meydana gelen enfeksiyonlarda daptomisin'in daha iyi bir tercih olabileceğini bildiren bazı çalışmalardan^{29,30} yola çıkılarak ayrıca çalışmamızdaki yüksek vankomisin MBEK ve MBEK/MİK değerlerine dayanarak daptomisin için de MİK ve MBEK ölçümleri yapılmıştır. Daptomisin'in etkinliğinin, bu antimikrobiyalın yapısında konformasyonel değişikliklere neden olan Ca^{++} 'nin fizyolojik seviyelerinin varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir³¹. Bu nedenle daptomisin için MİK değerinin belirlenmesinde değişik Ca^{++} oranı (25 ve 50 µg/ml) içeren MHBII besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlarımızın tümü daptomisine duyarlı bulunmakla birlikte, 50 µg/ml Ca^{++} içeren MHBII besiyerinde MİK değerleri daha düşük bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu bulgu daptomisin'in etkinliğinin en iyi düzeyde olması için yüksek Ca^{++} düzeylerine ihtiyaç olduğu yönünde yorumlanmıştır.

Çalışmamızdaki izolatların 12 (%18.5)'sinin zayıf, 35 (%53.8)'inin orta, 18 (%27.7)'inin güçlü olmak üzere tamamının biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. SVK örneklerinden izole edilen 82 KNS'nin biyofilm oluşturma özelliklerinin incelendiği bir çalışmada; %20.7'sinin biyofilm oluşturmadığı, %20.7'sinin güçlü, %29.3'ünün orta ve %29.3'ünün zayıf biyofilm oluşturduğu saptanmış ve kateter ilişkili enfeksiyon ile karşılaşıldığında biyofilm oluşumundan şüphelenmek gerektiği vurgulanmıştır¹⁷.

Çalışmamızda güçlü biyofilm oluşturan izolatların, zayıf biyofilm oluşturanlara göre her iki antibiyotik için de MBEK değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (vankomisin için $p = 0.05$; daptomisin için $p = 0.029$). MBEK/MİK oranları vankomisin için 1-128; daptomisin için 1-16 değerleri arasında bulunarak, vankomisin MBEK/MİK değerlerinin daptomisininkinden yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Literatürde bulgularımızı destekler nitelikte biyofilm oluşumu ile MBEK değeri arasında benzer sonuçlar elde eden ve vankomisin'in MBEK/MİK oranının düşük olduğunu gösteren çalışmalar yer almaktadır^{17,32}. Çalışmamızda her iki ilaç için de MBEK₅₀ ve MBEK₉₀ değerlerinin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile karşılaştırılması sonucunda da aynı bulgular elde edilmiştir.

MBEK ya da MBEK/MİK oranının güçlü biyofilm üreten izolatlarda daha yüksek değerlerde bulunması, bu izolatlarda biyofilm tabakasının kalınlığı nedeniyle vankomisin difüzyonunun daha zor olmasıyla açıklanmaktadır¹⁷. Stafilocokların oluşturduğu biyofilmdeki bakteri miktarını vankomisin ve linezolidin azalttığı, ancak bu antimikrobiyal-lerin yüksek konsantrasyonlarda uygulanmasına rağmen, biyofilm oluşumunu tamamen önleyemediklerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır^{28,33}.

S.aureus ve *S.epidermidis* izolatlarında; linezolid, vankomisin, kinupristin/dalfopristin- nin MİK ve MBEK değerlerinin karşılaştırıldığı El-Azizi ve arkadaşlarının³⁴ çalışmasında; biyofilm içindeki bakterilerin planktonik ve biyofilmden kopan bakterilere kıyasla antimik-robiyalere karşı daha fazla dirençli olduğu bulunmuştur. Kinupristin/dalfopristin biyo- filmden kopan bakterilere karşı en etkili antibiyotik olarak bulunurken, vankomisin 500 ve 1000 µg/ml gibi yüksek dozlarda uygulandığında metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve *S.epidermidis* biyofilmlerine etki gösterirken, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA)'ların oluşturduğu biyofilmlere karşı etkili olmamıştır³⁴.

Çalışmamızdaki izolatların tamamı vankomisin ve daptomisine duyarlıdır ancak her iki antibiyotiğinde MBEK değerlerindeki yükseklik dikkat çekicidir. Bulgularımız ile uyumlu olarak, antimikrobiyallerin hem *S.aureus* hem de *S.epidermidis*'in yol açtığı 24 saatlik bi- yofilm üzerine etkili olabilmesi için planktonik formdaki bakterileri öldüren dilüsyonların, hem daptomisin hem de vankomisin için 1-4 kat artırılması gerektiği bildirilmektedir⁷. Özellikle daptomisinin *S.epidermidis*'in oluşturduğu kalın biyofilm tabakasından hızla pe- netre olması nedeniyle, biyofilm oluşumunun görülmesinin yüksek muhtemel olduğu katetere bağlı enfeksiyonlarda değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir³⁵.

Sonuç olarak, enfeksiyon tanısı ile birlikte genellikle ampirik tedaviye başlandığından ampirik tedavide kullanılacak uygun antibiyotiğe karar verilmesi önem taşımaktadır. Bu antibiyotiğin seçilmesinde; kateter ilişkili enfeksiyona sebep olan etken ve bu etkenin vi- rülans özellikleriyle birlikte antibiyotik direnç profili hastalığın prognozunu belirleyen en önemli unsurlar olmaktadır. Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin MBEK/MİK oranları- nın yüksekliği dikkat çekici bir bulgudur. Bu sonuca göre biyofilm ilişkili enfeksiyonlarda, mikroorganizmanın duyarlılığını saptamak açısından sadece MİK değeri saptanmasının her zaman yeterli olamayacağı ve tedavide daha yüksek dozlara çıkılmasının gerektiği söylenebilir. Buna bağlı olarak, MBEK/MİK oranlarının vankomisine göre daha düşük ol- ması nedeniyle, biyofilm oluşturan KNS izolatlarının etken olduğu kateter ilişkili enfeksi- yonlarda daptomisinin iyi bir tercih olacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7(8): 555-67.
2. Doğruman AI F, Akça G, Sipahi B, Sultan N. Kan örneklerinden soyutlanan stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları. ANKEM Derg 2005; 19(1): 14-6.
3. Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Disease Society of America. Clin Infect Dis 2009; 49(1): 1-45.
4. Beekmann SE, Henderson DK. Infections caused by percutaneous intravascular devices, pp: 3347-62. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill-Livingstone Inc, Philadelphia.

5. Yen HW, Yang WC, Tarng DC, et al. Daptomycin antibiotic lock therapy for hemodialysis patients with Gram-positive bloodstream infections following use of tunneled, cuffed hemodialysis catheters: retrospective single center analysis. *Hemodial Int* 2016; 20(2): 315-20.
6. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl 3): 171-6.
7. Gkentzi D, Kolyva S, Spiliopoulou I, Marangos M, Dimitriou G. Treatment options for persistent coagulase negative staphylococcal bacteremia in neonates. *Curr Pediatr Rev* 2016; 12(3): 199-208.
8. Ishiekwe C, Ghitan M, Kuhn-Basti M, Chapnick E, Lin YS. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis with destruction of the ventricular septum and multiple native valves. *ID Cases* 2016; 22(7): 14-5.
9. Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(10): 617-24.
10. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter related infection. *N Engl J Med* 1977; 296(23): 105-9.
11. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control* 2011; 39(4 Suppl 1): S1-S4.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M47-A., 2007, Wayne, USA.
13. Geha DJ, Uhl JR, Gustafson CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1768-72.
14. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI Document M100-S25, 2015, Wayne, USA.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard- 10th edition, M07-A10, 2015, Wayne, USA.
16. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, et al. A microtiterplate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol* 2010; 33(2): 137-45.
17. Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by staphylococcus species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(1): 51-5.
18. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3481-5.
19. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı İ, Akın AA, Karahan ZC. Ankara Üniversitesi Hastanesinde 2002-2005 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler özellikleri. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(1): 1-10.
20. Güzel-Tunçcan Ö, Tozlu-Keten D, Dizbay M, Şenol E. Febril nötroopenik hastalardan kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen koagülaz negatif stafilokok türlerinin teikoplanine duyarlılıkları. *Klinik Derg* 2010; 23(2): 44-7.
21. Çiftçi N, Dağı Türk H, Demircan A, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tür tayini ve antibiyotiklere direnç oranları. *ANKEM Derg* 2016; 30(1): 7-11.
22. 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.
23. Akpaka PE, Christian N, Bodonaik NC, Smikle MF. Epidemiology of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical blood specimens at the university hospital of the West Indies. *West Indian Med J* 2006; 55(3): 170-3.
24. Khorshed A, Özbal Y. Kan kültürlerinde izole edilen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Sağlık Bilimleri Derg* 2012; 21(3): 153-6.
25. LaPlante KL, Mermel LA. In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(8): 2239-46.
26. Aslan H, Yapar N. Tigesiklin ve vankomisin etkinliklerinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ile oluşturulan in vitro biyofilm modelinde karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(4): 475-83.

27. de Oliveira A, Cataneli Pereira V, Pinheiro L, Moraes Riboli DF, Benini Martins K, Ribeiro de Souza da Cunha Mde L. Antimicrobial resistance profile of planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1423.
28. Luther MK, Mermel LA, LaPlante KL. Comparison of telavancin and vancomycin lock solutions in eradication of biofilm-producing staphylococci and enterococci from central venous catheters. *Am J Health Syst Pharm* 2016; 73(5): 315-21.
29. Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin versus vancomycin for bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high vancomycin minimum inhibitory concentration: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2012; 54(1): 51-8.
30. Murray KP, Zhao J, Davis SL, et al. Early use of daptomycin versus vancomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia with vancomycin MIC > 1 mg/L: a matched cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; 56(11): 1562-9.
31. Ho SW, Jung D, Calhoun JR, et al. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur Biophys J* 2008; 37(4): 421-33.
32. Mathur T, Bhateja P, Pandya M, Fatma T, Rattan A. In vitro activity of RBx 7644 (ranbezolid) on biofilm producing bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24(4): 369-73.
33. Bilman Bayındır F, Can F, Kaya M, Yazıcı AC. Kateter ile ilişkili hastane enfeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli stafilokoklarda biyofilim ile ilişkili antibiyotik duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 401-16.
34. El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biyofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4(2): 1-9.
35. Steward PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3505-7.