

Stafilokok İzolatlarında Antibiyotiklerin Antibiyofilm Etkinliği Üzerine N-asetilsisteinin Etkisi

Effect of N-acetylcystein on Antibiofilm Efficiency of Antibiotics in Staphylococci Isolates

Gülcan KUYUCUKLU¹(ID), Fatma KAYNAK ONURDAĞ²(ID), Canan ERYILDIZ¹(ID)

¹ Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

¹ Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

² Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

² Trakya University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Edirne, Turkey.

Makale Atfı: Kuyucuklu G, Kaynak Onurdağ F, Eryıldız C. Stafilokok izolatlarında antibiyotiklerin antibiyofilm etkinliği üzerine n-asetilsisteinin etkisi. Mikrobiyol Bul 2021;55(2):125-145.

ÖZ

Biyofilmler, antibiyotik etkisinden kaçmayı kolaylaştıran özellikleri ve antifagositik etkileri nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirmiştir. Tüm enfeksiyon hastalıklarının en az %65'i biyofilm oluşturan bakteriler ile ilişkilidir. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*, hastane enfeksiyonlarının en sık etkenlerinden olmaları ve enfeksiyonların çoğunlukla biyofilm kaynaklı olması nedeniyle önemli bir sorun oluşturmaktadır. Enfeksiyon etkeni izolatlarda, biyofilm formlarının minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon (MBEK) değerleri, planktonik formların minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerine göre çok daha yüksektir. Bu durum, enfeksiyonların tedavisinde çok daha yüksek dozlarda antibiyotik kullanımını gerektirmekte ve antibiyotik direncinin artışına neden olmaktadır. N-asetilsistein (NAC) molekülünün, olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak biyofilme karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* (n= 38) ve *S.epidermidis* (n= 12) izolatının, i) biyofilm oluşturma yeteneklerinin, ii) ampisilin ve vankomisin MİK değerlerinin NAC molekülü varlığındaki değişiminin, iii) bu antibiyotiklerin MBEK değerlerinin NAC molekülü varlığındaki değişiminin, ve iv) biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon düzeylerinin NAC molekülü varlığındaki değişiminin ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada, stafilokoklarda biyofilm oluşumunun gösterilmesi için mikropalak kristal viyole yöntemi kullanılmıştır. Ampisilin ve vankomisin, MİK ve MBEK değerlerinin NAC molekülü varlığındaki değişiminin ortaya konması için sıvı mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemi kullanılmıştır. Stafilokoklardaki biyofilm genleri olan hücreler arası bağlanma proteini A ve D (*icaA*, *icaD*) ve *Staphylococcus* yardımcı düzenleyici protein A (*sarA*) genlerinin ekspresyonu üzerine NAC'ın etkisi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRt-PCR) yöntemi ile incelenmiştir. Sinerji ve aditif etki tespit edilen konsantrasyonların karşılaştırılmasında Student-t testi kullanılmış ve p< 0.05 değeri anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada NAC molekülünün, ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında, bu kombinasyonun stafilokok izolatlarının MİK değerlerini ve stafilokok biyofilm MBEK değerlerini düşürdüğü ve ayrıca stafilokoklarda biyofilm oluşumunda etkili olan *icaA*, *icaD* ve *sarA* genlerinde, fark saptanmayan ve azalış gösteren ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, NAC molekülünün kombine ilaç tedavisi için yeni bir alternatif olabileceği ve tedaviye yeni bir

yaklaşım kazandırması açısından umut vadecici olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, NAC molekülünün farklı mikroorganizmalar ve antimikrobiyal ajanlar ile birlikte kullanılmasının da mümkün olabileceği ve bu konuda yapılacak olan ileri çalışmalar açısından bu çalışmada elde edilen bulguların yol gösterici olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: N-asetilsistein (NAC); *Staphylococcus*; antibiyofilim aktivite; ampisilin; vankomisin.

ABSTRACT

Biofilms are often responsible for the difficulties in the treatment of infectious diseases due to their properties that facilitate escape from antibiotic effect and their antiphagocytic effects. At least 65% of all infectious diseases are associated with biofilm-forming bacteria. As *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are among the most common agents of hospital infections and the infections are mostly biofilm-related, they pose an important problem. In infectious isolates, the minimum biofilm eradication concentration (MBEK) values of biofilm forms are much higher than the minimum inhibition concentration (MIC) values of planktonic forms. This situation requires the use of much higher doses of antibiotics in the treatment of infections and causes an increase in antibiotic resistance. The N-acetylcysteine (NAC) molecule is known to be effective against biofilm by disrupting mature biofilms and reducing the adhesion of bacteria to surfaces. In this study, it was aimed to demonstrate i) the biofilm-forming abilities ii) the change in ampicillin and vancomycin MIC values in the presence of NAC molecules, iii) the change in the MBEK values of these antibiotics in the presence of NAC molecule and iv) the change in the expression levels of genes thought to be related to biofilm formation in the presence of the NAC molecule among *S.aureus* (n= 38) and *S.epidermidis* (n= 12) isolates isolated from various clinical specimens in Trakya University Health Research and Application Center. In this study, microplate crystal violet method was used to demonstrate the biofilm formation in staphylococci. Broth microdilution and checkerboard method were used to demonstrate the change in the presence of NAC molecule of the MIC and MBEC values of ampicillin and vancomycin. The effect of NAC on the expression of intercellular binding proteins A and D (*icaA*, *icaD*) and *Staphylococcus* regulatory protein A (*sarA*) genes, which are the genes involved in biofilm formation in staphylococci, was determined by quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method. The Student-t test was used to compare the control and experimental groups (concentrations detected with synergy and additive effect); $p < 0.05$ was accepted as the limit value of significance. In this study, when the NAC molecule was used together with ampicillin and vancomycin, it was determined that this combination lowers the MIC values of *staphylococcus* isolates and staphylococcal biofilm MBEK values; and also the expression levels of *icaA*, *icaD* and *sarA* which were effective in biofilm formation in staphylococci have not changed and decreased. As a result, in this study, it has been determined that the NAC molecule can be a new alternative for combined drug therapy and is promising in terms of bringing a new approach to treatment. In addition, it is thought that it is possible to use the NAC molecule together with different microorganisms and antimicrobial agents, and the results obtained in this study are considered to be guiding for further studies on this subject.

Keywords: N-acetylcysteine (NAC); *Staphylococcus*; antibiofilm activity; ampicillin; vancomycin.

GİRİŞ

Biyofilim, bir yüzey üzerine tutunan mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glikozaminoglikanlar) ile organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır. Enfeksiyon hastalıklarının yaklaşık %65'i biyofilim oluşturan bakteriler ile ilişkilidir. Klinik öneme sahip pek çok gram-pozitif, gram-negatif bakteri ve mantar biyofilim oluşturmaktadır. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* ise, çoğunluğu biyofilim kaynaklı olan hastane enfeksiyonlarının sık etkenlerinden olmaları nedeniyle oldukça önemlidir. Bu etkenlerin ölü doku, kemik ya da tıbbi olarak implante edilmiş cihazlar üzerinde oluşturdukları biyofilim, içerisine gömülü mikroorganizmaların antibiyotik etkisinden ve fagositozdan kaçmalarını kolaylaştırarak tedavisi güç

enfeksiyon hastalıklarının görülmesine neden olmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşumunu engelleyen ya da biyofilme etki eden moleküllerin kullanımı, tedavi için umut veren bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde, birçok molekülün antibiyofilm aktivitesi araştırılmaktadır¹. N-asetilsistein (NAC)'in olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak EPS yapımını azaltmakta etkili olduğu bilinmektedir^{2,3}.

Bu çalışmada, *S.aureus* ve *S.epidermidis* izolatlarının, i) biyofilm oluşturma yeteneklerinin, ii) ampisilin ve vankomisin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) NAC molekülü varlığındaki değişiminin, iii) ampisilin ve vankomisin minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEK) NAC molekülü varlığındaki değişiminin, iv) biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon düzeylerinin NAC molekülü varlığındaki değişiminin ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri izolatları

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, "Microgen® Staph-ID" kitiyle stafilokok olduğu ve kristal viyole mikropalak yöntemiyle^{4,5} biyofilm pozitif olduğu doğrulanan *S.aureus* (n= 38) ve *S.epidermidis* (n= 12) izolatı kullanıldı. Çalışmada kullanılan *S.aureus* izolatlarının 22'si metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA); 16'sı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'tur. Bakteri izolatlarının numaraları, izole edildikleri klinik yer ve örnekleri tabloda verildi (Tablo I). Çalışmada, "ampisilin ve NAC"ın kombine etkisinin araştırılması bu 50 izolat kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada, "vankomisin ve NAC"ın kombine etkisinin araştırılmasında toplam 31 izolat kullanıldı.

Kalite kontrol suşu olarak, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 29213 (biyofilm negatif), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *S.aureus* ATCC 6538 (biyofilm pozitif), *S.epidermidis* NCTC 11047 (biyofilm pozitif) standart suşları kullanıldı. *S.aureus* izolatlarında metisilin direncini araştırmak için CLSI-M100-S28⁶ önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon tarama testi yapıldı.

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI-M100-S28 önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi⁶. Mikropalaklarda, katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyerinde (CA-MHB), NAC'ın 4096-64 µg/ml; ampisilin ve vankomisin 16-0.016 µg/ml aralığında konsantrasyonları hazırlandı. Kuyucuklara 5 x 10⁵ cfu/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu eklendi. Mikropalaklar, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi ve üremeyi inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Dama Tahtası Yöntemi

Dama tahtası yönteminde⁷, mikropalakların soldan sağa ilk onar kuyucuğuna antibiyotigin seri sulandırılmaları (16-0.016 µg/ml), bir başka mikropalağın yukarıdan aşağı ilk seker kuyucuğuna ise NAC'ın seri sulandırılmaları (4096-64 µg/ml) dağıtıldı. İki plağın içe-

Tablo 1. Stafilocok Türlerinin İzole Edildikleri Klinik ve Örnekler

Bakteri numarası	Tür	Klinik yeri	Örnek
1	MRSA	Dahili yoğun bakım servisi	Kan
2	MRSA	Acil polikliniği	Kan
3	MSSA	Acil polikliniği	Kan
4	MSSA	Acil polikliniği	Kan
5	MSSA	Koroner yoğun bakım servisi	Kan
6	<i>S.epidermidis</i>	Dahili yoğun bakım servisi	Bos
7	MSSA	Acil polikliniği	Kan
8	MRSA	Enfeksiyon servisi	Aspirat
9	<i>S.epidermidis</i>	Cerrahi yoğun bakım servisi	Kan
10	<i>S.epidermidis</i>	Genel cerrahi servisi	Kateter
11	MRSA	Enfeksiyon servisi	Kan
12	MRSA	Plastik cerrahi	Kan
13	MSSA	Nöroşirurji servisi	Doku biyopsi
14	MSSA	Enfeksiyon servisi	Yara sürüntüsü
15	MSSA	Plastik cerrahi	Doku biyopsi
16	MSSA	Dahili yoğun bakım servisi	Kan
17	<i>S.epidermidis</i>	Acil polikliniği	Kateter
18	<i>S.epidermidis</i>	Dahili yoğun bakım servisi	Kan
19	MSSA	Çocuk yeni doğan servisi	Kan
20	MSSA	Nerfroloji servisi	Kan
21	MSSA	Medikal onkoloji servisi	Kan
22	MRSA	Ortopedi servisi	Doku biyopsi
23	MRSA	Hematoloji	Kan
24	MSSA	Enfeksiyon servisi	Aspirat
25	MSSA	Deri ve zührevi hastalıklar	Yara sürüntüsü
26	MSSA	Kulak burun boğaz polikliniği	Aspirat
27	<i>S.epidermidis</i>	Reanimasyon ünitesi	Solunum sekresyonu
28	MSSA	Medikal onkoloji	Kan
29	MSSA	Dahili yoğun bakım servisi	Solunum sekresyonu
30	MSSA	Plastik cerrahi	Aspirat
31	<i>S.epidermidis</i>	Acil polikliniği	Yara sürüntüsü
32	<i>S.epidermidis</i>	Göğüs hastalıkları	Kan
33	<i>S.epidermidis</i>	Plastik cerrahi	Doku biyopsi
34	MRSA	Dahili yoğun bakım servisi	Kan
35	MRSA	Enfeksiyon servisi	Kan
36	<i>S.epidermidis</i>	Cerrahi yoğun bakım servisi	Kan
37	<i>S.epidermidis</i>	Cerrahi yoğun bakım servisi	Kan

Tablo 1. Stafilokok Türlerinin İzole Edildikleri Klinik ve Örnekler (devamı)

Bakteri numarası	Tür	Klinik yeri	Örnek
38	MSSA	Enfeksiyon servisi	Aspirat
39	MSSA	Çocuk genel servisi	İdrar
40	MSSA	Acil polikliniği	Yara sürüntüsü
41	<i>S.epidermidis</i>	Nöroşirurji servisi	Kan
42	MSSA	Acil polikliniği	Yara sürüntüsü
43	MSSA	Nöroşirurji servisi	Kan
44	MRSA	Kardiyoloji servisi	Kan
45	MRSA	Cerrahi yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
46	MRSA	Nöroşiroloji servisi	İdrar
47	MRSA	Plastik cerrahi servisi	Doku
48	MRSA	Radyasyon onkolojisi	Kan
49	MRSA	Dahili yoğun bakım	Endotrakeal aspirat
50	MRSA	Enfeksiyon servisi	Kateter

MSSA: Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*, MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*.

rikleri başka bir mikroplakta birleştirildi. Kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyon aralığı, MİK değerlerine göre tespit edildi. Kuyucuklara 5×10^5 cfu/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri inokulumu eklendi. Plaklar 37°C 'de 18-24 saat inkübe edildi. Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapıldı⁷⁻⁹.

Antibiyofilm Aktivite Testleri için Bakteri İnokulumunun Belirlenmesi

Antibiyofilm aktivite testlerinde kullanılacak olan bakteri inokulumunu standardize edebilmek için her izolat için 5×10^5 cfu/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri inokulumu, %5 glikoz içeren triptik soy buyyon içeren mikroplak kuyucuklarına pasajlanıp 6, 12, 18, 24, 32 ve 48 saat 37°C 'de inkübe edildikten sonra fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanarak vejetatif bakteriler ortamdaki uzaklaştırıldı. Kuyucuklara tekrar besiyeri eklendi ve biyofilm içerisindeki bakteriler ultra sonikatörde bekletilerek besiyerine geçmeleri sağlandı. Sıvı besiyerindeki bakteriler, 10^{-1} - 10^{-4} oranında sulandırılarak Mueller-Hinton agar besiyerine sabit hacimde ekildi. Besiyerleri 37°C 'de belirtilen saatlerde inkübe edildikten sonra koloniler sayıldı. Bu yöntemle bakterilerin oluşturdukları biyofilmin, yaklaşık olarak hangi inkübasyon koşullarında ve hangi sürede, ne kadar bakteri içerdiğinin öngörülmesi amacıyla ön değerlendirme yapılmış oldu. Bu yöntem sonucunda bakterilerin oluşturdukları biyofilmin 18 saat sonunda hedeflenen bakteri inokulumunu içerdiği tespit edildi.

Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi

NAC'ın [$16000 \mu\text{g/ml}$ ampicilin ($32000 \mu\text{g/ml}$) ve vankomisin ($32000 \mu\text{g/ml}$)] stok çözeltileri hazırlanarak mikroplaklarda çift katlı seri sulandırım yapıldı. Biyofilm oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmış plakların tabanında oluşan biyofilm, inokulum olarak kullanıldı. Antibiyotikler ve NAC'ın tek başına biyofilme etkisini belirlemek için maddele-

rin çift katlı seri sulandırılmaları, inokulum içeren bu plaklara aktarıldı. 18-24 saat 37°C'de inkübasyonu takiben üremenin görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonu MBEK değeri olarak saptandı¹⁰. Madde kombinasyonlarının etkisini incelemek için dama tahtası yöntemi kullanıldı. Dama tahtası yönteminde, yukarıda belirtilen işlemler tekrar edilerek madde delerin kombine konsantrasyonları [(ampisilin + NAC) ve (vankomisin + NAC)] kullanıldı. Üremenin görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonu MBEK olarak saptandı^{8,10}. Madde içermeyen kontrol kuyucukları ve MBEK olarak tespit edilen tüm kuyucuklar boşaltılıp, beş kez 0.01 M potasyum fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra, plakların içerisine steril serum fizyolojik eklenerek, sonikatörde 15 dakika bekletildi. Sonikasyon sonrası bu kuyucuklardan 10⁻¹-10⁻⁴ oranında sulandırılarak, triptik soy agara ekim yapıldı. 37°C'de bir gece inkübasyonu takiben bakteri kolonileri sayılarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizma sayısı hesaplandı. Kontrol kuyucuğundaki bakteri sayısı (cfu/ml) başlangıç inokulumu olarak değerlendirildi. Plaklarda üreyen koloni sayıları kontrol ile kıyaslandı ve biyofilm içerisindeki bakterilerin cfu/ml olarak azalma miktarı saptandı.

Katı besiyerlerine ekim yapılan tüm kuyucuklardan alınan örnekler %50 oranında soğuk etanol içerisine alınarak moleküler testler için -80°C'de saklandı. Plaklarda biyofilm oluşumunun doğrulanması, ayrı bir plakta kristal viyole mikropalak yöntemiyle gerçekleştirildi^{4,5}. Sonuçların doğrulanması amacıyla yapılan tüm çalışmalar üç kez tekrarlandı.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *icaA*, *icaD* ve *sarA* Genlerinin Ekspresyonunun Belirlenmesi

Hücreler arası bağlanma proteini A ve D (*icaA*, *icaD*) ve *Staphylococcus* yardımcı düzenleyici protein A (*sarA*) genlerinin ekspresyonu üzerine NAC'ın etkisinin saptanması için bu genlerinin değişik koşullarda i) NAC ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı, ii) NAC ve antibiyotikleri içeren besiyerinde üretilen kültür ortamı koşullarında ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi için kantitatif gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qrRT-PCR) uygulandı. *S.aureus* ve *S.epidermidis* sıvı kültürlerinden, RNA izolasyon aşamasına geçildi. RNA izolasyonu için, Bio-Speedy (.BS-NA-309-50) (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) bakteriyel RNA izolasyon kiti optimize edilerek kullanıldı. Daha önceki literatürde tanımlanmış ve validasyonları gerçekleştirilmiş qrRt-PCR'de hem *S.aureus* hem de *S.epidermidis* için *icaA*¹¹, *icaD*¹¹ ve *sarA*¹² genlerini hedefleyen primerler kullanıldı (Tablo II ve III). Gen ekspresyon analizlerinde referans gen "house keeping" olarak 16SrRNA geni kullanıldı. cDNA'lar, qrRT-PCR işleminde, PCR döngüsüne ek olarak cDNA basamağı eklenerek elde edildi. Çalışılan genlerin ekspresyon düzeyi Tablo IV'teki reaksiyon karışımı ve döngüsü kullanılarak Roche LightCycler Nano (Roche Diagnostics, Basel, İsviçre) cihazı ile elde edildi.

İstatistiksel Analiz

qrRT-PCR yönteminde reaksiyon verimini belirlemek için kalıp DNA'lardan bir tanesinin seri dilüsyonu yapıp reaksiyon verimi hesaplandı. Reaksiyon verimi 1.5-2.0 aralığında ve korelasyon faktörü (r2) sürekli 0.9'un üzerinde olan sonuçlar karşılaştırma analiz-

Tablo II. *Staphylococcus aureus* için qRT-PCR'da Kullanılan Primer Dizileri, Tm Dereceleri ve Elde Edilen Ürün Boyutu**-Hücreler arası adezyon proteini A geni (icaA):**

icaA_Staphylococcus aureus_F: 5'- TGC TGG CGC AGT CAA TAC TA -3'

icaA_Staphylococcus aureus_R: 5'- TCT GGA ACC AAC ATC CAA CA -3'

Tm: 60°C

Elde edilen ürün boyutu: 183 bp

-Hücreler arası adezyon proteini D geni (icaD):

icaD_Staphylococcus aureus_F: 5'- ACC CAA CGC TAA AAT CAT CG-3'

icaD_Staphylococcus aureus_R: 5'- GCG AAA ATG CCC ATA GTT TC-3'

Tm: 59°C

Elde edilen ürün boyutu: 211 bp

-Staphylococcal accessory regulator geni (sarA):

sarA_Staphylococcus aureus_F: 5'- TGA CAT ACA TCA GCG AAA ACAA -3'

sarA_Staphylococcus aureus_R: 5'- TCTTTCATCATGCTCATTACGTT -3'

Tm: 59°C

Elde edilen ürün boyutu: 152 bp

Tablo III. *Staphylococcus epidermidis* için qRT-PCR'da Kullanılan Primer Dizileri, Tm Dereceleri ve Elde Edilen Ürün**-Hücreler arası adezyon proteini A geni (icaA):**

icaA_Staphylococcus epidermidis_F: 5'- AGC GAA GTC AAT CTC TTG CAG -3'

icaA_Staphylococcus epidermidis_R: 5'- TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA -3'

Tm: 60°C

Elde edilen ürün boyutu: 199 bp

-Hücreler arası adezyon proteini D geni (icaD)

icaD_Staphylococcus epidermidis_F: 5'- ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG -3'

icaD_Staphylococcus epidermidis_R: 5'- CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA -3'

Tm: 60°C

Elde edilen ürün boyutu: 198 bp

-Staphylococcal accessory regulator geni (sarA):

sarA_Staphylococcus aureus_F: 5'- TGACATACATCAGCGAAAACAA -3'

sarA_Staphylococcus aureus_R: 5'- TCTTTCATCATGCTCATTACGTT -3'

Tm: 58°C

Elde edilen ürün boyutu: 176 bp

lerinde kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hedef genlerin rRNA genine göre rölatif ifade düzeyi hesaplandı¹³. Kontrol ve deneme gruplarının (sinerji ve aditif etki tespit edilen konsantasyonlar) karşılaştırılmasında Student-t testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı sınır değeri olarak kabul edildi.

Tablo IV. qRT-PCR Reaksiyon Karışımı ve Döngüsü

qrRT-PCR reaksiyon karışımı	qrRT-PCR reaksiyon döngüsü	
1.5 mM MgCl ₂	Çoğalma reaksiyonu, 45°C'de 30 dk cDNA sentezi ile başlatıldı. Ardından preinkübasyon için 1 döngü 95°C'de 5 dk, amplifikasyon için; 40 döngü 95°C'de 15 sn, primere özgü bağlanma sıcaklığında (Tablo II ve Tablo III) 30 sn ve 72°C'de 25 sn koşullarında gerçekleştirildi.	
0.2 mM dNTP karışım		
1x Reaksiyon tamponu		
0.1 U Proof Reading Hot-Start Taq DNA Polimeraz,		
1x SybrGreen-I		
5 ng/μl kalıp cDNA		
0.5 μM forward primer		
0.5 μM reverse primer		
qrRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu.		
qrRT-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C-95°C arasında erime eğrisi analizi yapıldı.		

Tablo V. Çalışılan İzolatların Biyofilim Düzeylerinin Dağılımı ve Yüzdeleri

Bakteri adı	Zayıf düzeyde biyofilim	Orta düzeyde biyofilim	Kuvvetli düzeyli biyofilim	Toplam
<i>S.aureus</i>				
MSSA	n= 15 (%68.18)	n= 5 (%22.72)	n= 2 (%9.1)	n= 22 (%100)
MRSA	n= 10 (%62.5)	n= 4 (%25)	n= 2 (%12.5)	n= 16 (%100)
<i>S.epidermidis</i>	n= 6 (%50)	n= 5 (%41.67)	n= 1 (%8.33)	n= 12 (%100)
Toplam	n= 31 (%62)	n= 14 (%28)	n= 5 (%10)	n= 50 (%100)

BULGULAR

Çalışılan izolatlar içerisinde *S.aureus* ve *S.epidermidis* izolatlarına ait biyofilim düzeylerinin dağılımı ve yüzdeleri Tablo V'te gösterilmiştir.

Biyofilim pozitif 26 izolatta NAC'ın MİK değeri, 2048 μg/ml, 24 izolatta ise 4096 μg/ml olarak tespit edilmiştir. Biyofilim pozitif 50 stafilokok izolatının 9 (%18)'ü ampisiline duyarlı, 41 (%82)'i ampisiline dirençli ve tüm izolatlar (%100) vankomisine duyarlı bulunmuştur. Ampisiline dirençli 41 stafilokok izolatının 25 (%60.98)'inin 2048 μg/ml ve 4096 μg/ml NAC konsantrasyonu varlığında ampisiline duyarlı hale geldiği saptanmıştır. Bununla birlikte, *S.aureus* izolatlarının ampisilin MİK değerlerinde 4-256 kat düşüş, *S.epidermidis* izolatlarının ampisilin MİK değerlerinde ise 2-128 kat düşüş tespit edilmiştir. Ampisilin ve NAC kombinasyonunun 50 stafilokok izolatının 17 (%34)'si üzerine sinerjik etkili olduğu tespit edilmiştir. Sinerjik etki tespit edilen izolatlardan 13 (%26)'ünün *S.aureus*, 4 (%8)'ünün *S.epidermidis* türü bakteriler olduğu saptanmıştır. NAC varlığında (2048 μg/ml ve 4096 μg/ml), vankomisin MİK değerlerinde ise 2-32 kat düşüş tespit edilmiştir. *S.aureus* izolatlarının ampisilin MİK değerlerinde 2-32 kat düşüş, *S.epidermidis* izolatlarının ampisilin MİK değerlerinde ise 4-16 kat düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca, vankomisin ve NAC'ın 50 stafilokok izolatının 3 (%6)'ü üzerine sinerjik etkili olduğu tespit

edilmiştir. Bu izolatlardan 2 (%4)'sinin *S.aureus*, 1 (%2)'inin *S.epidermidis* türü bakteriler olduğu saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen stafilocokların ampisilin MBEK değerleri 31.25 - > 4000 µg/ml aralığında, vankomisin MBEK değerleri ise 500 - > 4000 µg/ml aralığında tespit edilmiştir. Antibiyofilm aktivite testi sonucunda ampisilin ve NAC, çalışılan 50 stafilocok izolatının 16 (%32)'sına sinerjik olarak etkili bulunmuştur. Sinerjik etki tespit edilen izolatlardan 13 (%26)'ünün *S.aureus*, 3 (%6)'ünün *S.epidermidis* türü bakteriler olduğu saptanmıştır. Ampisilin bu 16 izolat için 128-2048 µg/ml aralığında olan MBEK değerleri, NAC varlığında 64-256 kat azalmıştır (Tablo VI).

Antibiyofilm aktivite testi sonucunda vankomisin ve NAC, çalışılan 31 stafilocok izolatının 10(%32.26)'una sinerjik olarak etki etmiştir. Bu izolatlardan 7 (%22.58)'si *S.aureus*, 3'ü (%9.68) *S.epidermidis* türü bakterilere aittir. Vankomisinin bu 10 izolat için 256-2048 µg/ml aralığında olan MBEK değerleri, NAC varlığında 4-512 kat azalmıştır (Tablo VII).

Çalışılan 50 bakterinin "ampisilin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında, 45 izolatta bakteri miktarında 6 log azalma tespit edilmiştir. Kalan beş bakteride ise, "ampisilin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklarından yapılan ekim sonuçlarında 5 log azalma saptanmıştır (Tablo VIII).

Aynı şekilde, çalışılan 31 bakterinin 24'ünün "vankomisin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklarından yapılan ekim sonucunda üreme olmamış ve 6 log azalma tespit edilmiştir. Kalan yedi bakteride, "vankomisin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklarından yapılan ekim sonuçlarında 5 log azalma saptanmıştır (Tablo IX).

Bu çalışmada, ampisilin ve NAC'ın sinerjik etki gösterdiği konsantrasyonları içeren kuyucuklarda, *icaD* geninin ekspresyon düzeyinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu grupta, *icaA* ve *sarA* geni ekspresyon düzeylerinde kontrole göre bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Bu çalışmada ampisilin ve NAC ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda, vankomisin ve NAC ile sinerjik etki gösteren kuyucuklarda ve vankomisin ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda, *icaA*, *icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon düzeylerinde kontrole göre azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu gruplarda konvansiyonel yöntemler ve moleküler yöntemle elde edilen sonuçlar birbirini desteklemiştir.

TARTIŞMA

Klinik izolatlarda, biyofilm formlarının MBEK değerleri, planktonik formların MİK değerlerine göre çok daha yüksektir. Bu durum, tedavide çok daha yüksek dozlarda antibiyotik kullanımını gerektirmektedir^{14,15}. Bununla birlikte, biyofilm oluşumu ve tedavide yarattığı sorunlar bilinmesine karşın, laboratuvar uygulamalarında biyofilm oluşturmuş mikroorganizmalara karşı etkili olan en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonunun tespitinde standart bir yöntem bulunmamaktadır.

Son yıllarda biyofilm oluşumunu engelleyen ya da biyofilmi inhibe eden moleküllerin kullanımı bu etkenlerin tedavisi için umut vaat etmektedir. Bu moleküllerden biri-

Tablo VI. Ampisilin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK Değerleri ve Etkileşim Türü

İzolat No	Bakteri türü	Ampisilin MBEK (µg/ml)	NAC MBEK (µg/ml)	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	FİK	Etkileşim Türü
1	<i>S.aureus</i>	2000	4096	1000/2048	1	Aditif
				2000/128	1.031	Aditif
2	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/4096	1	Aditif
3	<i>S.aureus</i>	2000	4096	500/128	0.53	Sinerjik
4	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
5	<i>S.aureus</i>	1000	4096	31.25/2048	0.531	Sinerjik
				250/256	0.313	Sinerjik
7	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	500/2048	0.56	Sinerjik
				2000/512	0.375	Sinerjik
8	<i>S.aureus</i>	2000	8192	250/2048	0.503	Sinerjik
				1000/512	0.56	Sinerjik
11	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
12	<i>S.aureus</i>	1000	8192	1000/8192	2	Aditif
13	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
14	<i>S.aureus</i>	1000	8192	1000/128	1.061	Aditif
15	<i>S.aureus</i>	1000	4096	15.63/2048	0.52	Sinerjik
				500/256	0.56	Sinerjik
16	<i>S.aureus</i>	500	4096	250/512	0.625	Aditif
19	<i>S.aureus</i>	500	4096	7.81/2048	0.516	Sinerjik
				125/512	0.375	Sinerjik
20	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
21	<i>S.aureus</i>	2000	4096	7.81/2048	0.503	Sinerjik
22	<i>S.aureus</i>	1000	4096	125/2048	0.625	Aditif
23	<i>S.aureus</i>	> 4000	2048	31.25/2048	1.004	Aditif
24	<i>S.aureus</i>	1000	4096	125/2048	0.625	Aditif
25	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	2000/2048	0.75	Aditif
26	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
28	<i>S.aureus</i>	31.25	4096	7.81/1024	0.499	Sinerjik
				31.25/128	1.031	Aditif
29	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	62.5/2048	0.507	Sinerjik
30	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	2000/2048	0.75	Aditif
34	<i>S.aureus</i>	4000	4096	62.5/2048	0.508	Sinerjik
				500/256	0.19	Sinerjik
35	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	500/4096	1.125	Aditif
38	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif

Tablo VI. Ampisilin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK Değerleri ve Etkileşim Türü (devamı)

İzolot No	Bakteri türü	Ampisilin MBEK (µg/ml)	NAC MBEK (µg/ml)	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	FİK	Etkileşim Türü
39	<i>S.aureus</i>	1000	8192	62.5/2048	0.313	<i>S.aureus</i>
				125/1024	0.25	Sinerjik
				250/512	0.313	Sinerjik
				500/256	0.531	Sinerjik
				1000/128	1.016	Aditif
40	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	125/2048	0.516	Sinerjik
42	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	2	Aditif
43	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	2	Aditif
44	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	2000/4096	1.5	Aditif
45	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	500/2048	0.56	Sinerjik
				4000/1024	0.75	Aditif
46	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/8192	1.5	Aditif
47	<i>S.aureus</i>	2000	4096	7.81/4096	1.004	Aditif
48	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/8192	1.5	Aditif
49	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/8192	1.5	Aditif
50	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/8192	1.5	Aditif
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 (biyofilm negatif kontrol suşu)	-	-	-	-	-
6	<i>S.epidermidis</i>	62.5	4096	62.5/128	1.031	Aditif
9	<i>S.epidermidis</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
10	<i>S.epidermidis</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
17	<i>S.epidermidis</i>	250	4096	125/1024	0.75	Aditif
18	<i>S.epidermidis</i>	> 4000	4096	125/2048	0.516	Sinerjik
				1000/256	0.19	Sinerjik
27	<i>S.epidermidis</i>	500	4096	250/2048	1	Aditif
31	<i>S.epidermidis</i>	1000	4096	500/1024	0.75	Aditif
				1000/128	1.031	Aditif
32	<i>S.epidermidis</i>	4000	4096	4000/4096	2	Aditif
33	<i>S.epidermidis</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
36	<i>S.epidermidis</i>	> 4000	4096	4000/4096	2	Aditif
37	<i>S.epidermidis</i>	500	8192	62.5/1024	0.25	Sinerjik
41	<i>S.epidermidis</i>	125	4096	62.5/128	0.531	Sinerjik
				15.63/2048	0.502	Sinerjik
	<i>S.epidermidis</i> NTCC 11047 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	> 4000	4096	125/128	0.048	Sinerjik

NAC: N-asetilsistein, MBEK: Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu, FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, Amp: Ampisilin.

Tablo VII. Vankomisin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK Değerleri ve Etkileşim Türü

No	Bakteri türü	Vankomisin	NAC	Kombinasyon		Etkileşim Türü
		MBEK (µg/ml)	MBEK (µg/ml)	Van/NAC MBEK	FİK	
1	<i>S.aureus</i>	4000	8192	2000/1024	0.625	Aditif
2	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
4	<i>S.aureus</i>	1000	4096	1000/128	1.031	Aditif
5	<i>S.aureus</i>	> 4000	4096	4000/4096	1.5	Aditif
11	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
15	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	2000/2048	0.5	Sinerjik
				500/8192	2.125	Aditif
19	<i>S.aureus</i>	4000	4096	2000/4096	1.5	Aditif
				4000/128	1.031	Aditif
20	<i>S.aureus</i>	> 4000	8192	4000/4096	1	Aditif
21	<i>S.aureus</i>	4000	4096	1000/2048	0.75	Aditif
				2000/256	0.56	Sinerjik
22	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
25	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
				62.5/2048	0.52	Sinerjik
34	<i>S.aureus</i>	4000	4096	2000/1024	0.75	Aditif
				31.25/2048	0.515	Sinerjik
35	<i>S.aureus</i>	2000	4096	1000/512	0.625	Aditif
38	<i>S.aureus</i>	1000	4096	1000/128	1.031	Aditif
				1000/1024	0.75	Aditif
39	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
40	<i>S.aureus</i>	2000	8192	1000/512	0.56	Sinerjik
42	<i>S.aureus</i>	500	4096	62.5/2048	0.625	Aditif
				500/2048	0.5	Sinerjik
43	<i>S.aureus</i>	2000	8192	2000/1024	1.125	Aditif
44	<i>S.aureus</i>	1000	4096	500/1024	0.75	Aditif
45	<i>S.aureus</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
46	<i>S.aureus</i>	4000	8192	2000/2048	0.75	Aditif
				62.5/2048	0.531	Sinerjik
47	<i>S.aureus</i>	2000	4096	500/512	0.188	Sinerjik
48	<i>S.aureus</i>	4000	8192	2000/1024	0.625	Aditif
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	2000	4096	2000/2048	1.5	Aditif

Tablo VII. Vankomisin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK değerleri ve Etkileşim Türü (devamı)

No	Bakteri türü	Vankomisin MBEK (µg/ml)	NAC MBEK (µg/ml)	Kombinasyon Van/NAC MBEK	FİK	Etkileşim Türü
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 (biyofilm negatif kontrol suşu)	-	-	-	-	-
9	<i>S.epidermidis</i>	2000	4096	1000/256 2000/128 7.81/2048	0.56 1.031 0.508	Sinerjik Aditif Sinerjik
17	<i>S.epidermidis</i>	1000	4096	62.5/1024 500/512	0.313 0.625	Sinerjik Aditif
18	<i>S.epidermidis</i>	4000	4096	2000/512 4000/128	0.625 1.031	Aditif Aditif
27	<i>S.epidermidis</i>	500	4096	250/2048 500/128	1 1.031	Aditif Aditif
31	<i>S.epidermidis</i>	2000	4096	100/1024	0.75	Aditif
32	<i>S.epidermidis</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
33	<i>S.epidermidis</i>	2000	4096	2000/128	1.031	Aditif
41	<i>S.epidermidis</i>	2000	4096	1000/1024 2000/128	0.75 1.031	Sinerjik Aditif
	<i>S.epidermidis</i> NTCC 11047 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	2000	4096	2000/2048	1.5	Aditif

NAC: N-asetilsistein, MBEK: Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu, FİK: fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

si de çalışmamızda kullandığımız NAC molekülüdür. NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak EPS yapımını azaltmakta etkili olduğu³ ve *P.aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S.epidermidis*, *S.aureus* ve *E.coli* gibi, gram-negatif ve gram-pozitif birçok bakteri biyofilmini etkili bir şekilde azalttığı bildirilmiştir^{2,3}.

Stafilokoklarda biyofilm oluşumu farklı araştırmacılar tarafından, farklı yöntemler kullanılarak çalışılmıştır. Bu yöntemlerden en fazla kullanılanı kristal viyole-mikroplak yöntemidir. Bu nedenle bu çalışmada da aynı yöntem kullanılmış ve zayıf, orta ve yüksek düzeyde biyofilm oluşturan izolatlar çalışmaya alınmıştır.

Ampisilin direnci stafilokoklarda sık rastlanan bir durumdur ve bu nedenle artık tedavide tercih edilmemektedir¹⁶. Çalışmamızda da 50 stafilokok izolatının 41 (%82)'i, bu verilerle uyumlu olarak ampisiline dirençli bulunmuştur. Bununla birlikte, ampisilinin etkinliğini arttırmak ve tedaviye tekrar kazandırmak amacıyla NAC ile kombine etkisi araştırılmış ve ampisiline dirençli 41 stafilokok izolatının 25 (%60.98)'inin uygun NAC konsantras-

Tablo VIII. Ampisilin ve NAC Konsantrasyonlarına Göre Etkileşim Gözlenen Kuyulardaki Bakteri Sayım Sonuçları ve Log10'a Göre Azalan Bakteri İnokülümü

No	Bakteri türü	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	Kontrol kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Kombinasyon kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Azalma oranı	Etkileşim türü
1	<i>S.aureus</i>	1000/2048	6 x 10 ⁶	3	6 log	Aditif
		2000/128		1	5 log	Aditif
2	<i>S.aureus</i>	4000/4096	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
3	<i>S.aureus</i>	500/128	5 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
4	<i>S.aureus</i>	4000/4096	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
5	<i>S.aureus</i>	31.25/2048	4 x 10 ⁶	60	5 log	Sinerjik
		250/256		50	5 log	Sinerjik
7	<i>S.aureus</i>	500/2048	5 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		2000/512		0	6 log	Sinerjik
8	<i>S.aureus</i>	250/2048	1 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		1000/512		48	5 log	Sinerjik
11	<i>S.aureus</i>	2000/128	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
12	<i>S.aureus</i>	1000/8192	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
13	<i>S.aureus</i>	4000/4096	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
14	<i>S.aureus</i>	1000/128	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
15	<i>S.aureus</i>	15.63/2048	9 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		500/256		3	6 log	Sinerjik
16	<i>S.aureus</i>	250/512	5 x 10 ⁶	87	5 log	Aditif
19	<i>S.aureus</i>	7.81/2048	2 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		125/512		23	5 log	Sinerjik
20	<i>S.aureus</i>	4000/4096	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
21	<i>S.aureus</i>	7.81/2048	1 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
22	<i>S.aureus</i>	125/2048	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
23	<i>S.aureus</i>	31.25/2048	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
24	<i>S.aureus</i>	125/2048	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
25	<i>S.aureus</i>	2000/2048	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
26	<i>S.aureus</i>	4000/4096	1 x 10 ⁶	95	5 log	Aditif
28	<i>S.aureus</i>	7.81/1024	6 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		31.25/128		90	5 log	Aditif
29	<i>S.aureus</i>	62.5/2048	9 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
30	<i>S.aureus</i>	2000/2048	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
34	<i>S.aureus</i>	62.5/2048	3 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		500/256		0	6 log	Sinerjik
35	<i>S.aureus</i>	500/4096	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif

Tablo VIII. Ampisilin ve NAC Konsantrasyonlarına Göre Etkileşim Gözlenen Kuyulardaki Bakteri Sayım Sonuçları ve Log10'a Göre Azalan Bakteri İnokülümü (devamı)

No	Bakteri türü	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	Kontrol kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Kombinasyon kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Azalma oranı	Etkileşim türü
38	<i>S.aureus</i>	4000/4096	8 x 10 ⁶	23	5 log	Aditif
		62.5/2048		68	5 log	Sinerjik
		125/1024		58	5 log	Sinerjik
39	<i>S.aureus</i>	250/512	7 x 10 ⁶	51	5 log	Sinerjik
		500/256		31	5 log	Sinerjik
		1000/128		48	5 log	Aditif
40	<i>S.aureus</i>	125/2048	2 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
42	<i>S.aureus</i>	4000/4096	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
43	<i>S.aureus</i>	4000/4096	7 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
44	<i>S.aureus</i>	2000/4096	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		500/2048		0	6 log	Sinerjik
45	<i>S.aureus</i>	4000/1024	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		4000/8192	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
47	<i>S.aureus</i>	7.81/4096	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
48	<i>S.aureus</i>	4000/8192	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
49	<i>S.aureus</i>	4000/8192	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
50	<i>S.aureus</i> ATCC 6538 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	4000/4096	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		<i>S.aureus</i> ATCC 29213 (biyofilm negatif kontrol suşu)	-	-	-	-
6	<i>S.epidermidis</i>	62.5/128	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
9	<i>S.epidermidis</i>	4000/4096	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
10	<i>S.epidermidis</i>	4000/4096	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
17	<i>S.epidermidis</i>	125/1024	8 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		125/2048		0	6 log	Sinerjik
18	<i>S.epidermidis</i>	1000/256	9 x 10 ⁶	75	5 log	Sinerjik
		250/2048	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
27	<i>S.epidermidis</i>	500/1024	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
31	<i>S.epidermidis</i>	1000/128		0	6 log	Aditif

Tablo VIII. Ampisilin ve NAC Konsantrasyonlarına Göre Etkileşim Gözlenen Kuyulardaki Bakteri Sayım Sonuçları ve Log10'a Göre Azalan Bakteri İnokulumu (devami)

No	Bakteri türü	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	Kontrol kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Kombinasyon kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Azalma oranı	Etkileşim türü
32	<i>S.epidermidis</i>	4000/4096	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
33	<i>S.epidermidis</i>	4000/4096	9 x 10 ⁶	10	6 log	Aditif
36	<i>S.epidermidis</i>	4000/4096	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
37	<i>S.epidermidis</i>	62.5/1024	1 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		250/256		0	6 log	Sinerjik
41	<i>S.epidermidis</i> NTCC 11047 (biyofilm pozitif kontrol suşu)	62.5/128	3 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		15.63/2048		0	6 log	Sinerjik
		125/128	9 x 10 ⁶	90	5 log	Sinerjik

NAC: N-asetilsistein, MBEK: Minimum biyofilim eradikasyon konsantrasyon, Amp: Ampisilin.

yonları varlığında ampisiline duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Ampisiline dirençli 9 (%8) izolatın MİK değerlerinde ise azalma tespit edilmekle birlikte, MİK değerleri hala direnç sınır değerinin üzerindedir. Aynı şekilde vankomisin ve NAC birlikteliğinde vankomisin MİK değerlerinde de 2-32 kat düşüş tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antimikrobiyal etkisi olmayan ve dolayısıyla MİK değeri tek başına çok yüksek olan NAC molekülünün, ampisilin ve vankomisin ile birlikte stafilokok izolatlarına karşı, antibiyotiklerin MİK değerlerini düşürmede etkili bir kimyasal ajan olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmayla benzer olarak, NAC'ın farklı antibiyotikler (rifampisin, tigesiklin, siprofloksasin) ve bakteriler (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S.aureus*) ile kombine etkisinin antibiyotiklerin MİK değerlerinde düşüşe neden olduğu farklı çalışmalar ile de bildirilmiştir¹⁷⁻¹⁹.

Bu çalışmada da stafilokoklarda ampisilin ve vankomisinin MBEK değerleri, MİK değerlerinden yaklaşık 1000 kat daha yüksek saptanmıştır. NAC'ın bakteriyel biyofilim oluşumuna etkisi, ilk defa *S.epidermidis*'te gösterilmiştir. Bu çalışmada, biyofilim oluşumunda NAC konsantrasyonuna bağlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, NAC'ın matriks oluşumu üzerindeki inhibitör etkisi elektron mikroskobu ile de gösterilmiştir²⁰. NAC'ın, biyofilim oluşumunu azaltmasının yanı sıra oluşan biyofilm üzerine antibiyofilim etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur^{15,20,21}. Farklı antibiyotiklerin ve maddelerin NAC ile kombine etkisi, çeşitli mikroorganizmaların biyofilim oluşumuna etkisi de araştırılmış olup biyofilim oluşumunu azalttığı yönünde etkiler tespit edilmiştir²²⁻²⁵. Bu çalışmada stafilokoklarda, NAC varlığında ampisilin ve vankomisinin MBEK değerlerinin azaldığı gösterilmiştir.

Tablo IX. Vankomisin ve NAC Konsantrasyonlarına Göre Etkileşim Gözlenen Kuyulardaki Bakteri Sayım Sonuçları Ve Log10'a Göre Azalan Bakteri İnokülümü

No	Bakteri türü	Kombinasyon Van/NAC MBEK	Kontrol kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Kombinasyon kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Azalma oranı	Etkileşim türü
1	<i>S.aureus</i>	2000/1024	2 x 10 ⁶	19	5 log	Aditif
2	<i>S.aureus</i>	2000/128	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
4	<i>S.aureus</i>	1000/128	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
5	<i>S.aureus</i>	4000/4096	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
11	<i>S.aureus</i>	2000/128	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
15	<i>S.aureus</i>	2000/2048	1 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		500/8192		0	6 log	Aditif
19	<i>S.aureus</i>	2000/4096	1 x 10 ⁶	11	5 log	Aditif
		4000/128		24	5 log	Aditif
20	<i>S.aureus</i>	4000/4096	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		1000/2048		0	6 log	Aditif
21	<i>S.aureus</i>	2000/256	5 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
22	<i>S.aureus</i>	2000/128	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
25	<i>S.aureus</i>	2000/128	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
34	<i>S.aureus</i>	62.5/2048	3 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		2000/1024		0	6 log	Aditif
35	<i>S.aureus</i>	31.25/2048	9 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		1000/512		23	5 log	Aditif
38	<i>S.aureus</i>	1000/128	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		1000/1024		18	5 log	Aditif
39	<i>S.aureus</i>	2000/128	8 x 10 ⁶	30	5 log	Aditif
40	<i>S.aureus</i>	1000/512	7 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
42	<i>S.aureus</i>	62.5/2048	1 x 10 ⁶	15	5 log	Aditif
		500/2048		0	6 log	Sinerjik
43	<i>S.aureus</i>	2000/1024	7 x 10 ⁶	39	5 log	Aditif
44	<i>S.aureus</i>	500/1024	3 x 10 ⁶	14	5 log	Aditif
45	<i>S.aureus</i>	2000/128	5 x 10 ⁶	26	5 log	Aditif
46	<i>S.aureus</i>	2000/2048	3 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		62.5/2048		0	6 log	Sinerjik
47	<i>S.aureus</i>	500/512	2 x 10 ⁶	21	5 log	Sinerjik
48	<i>S.aureus</i>	2000/1024	2 x 10 ⁶	14	5 log	Aditif

Tablo IX. Vankomisin ve NAC Konsantrasyonlarına Göre Etkileşim Gözlenen Kuyulardaki Bakteri Sayım Sonuçları Ve Log10'a Göre Azalan Bakteri İnokülumu (devamı)

No	Bakteri türü	Kombinasyon Van/NAC MBEK	Kontrol kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Kombinasyon kuyucuğu bakteri miktarı (cfu/ml)	Azalma oranı	Etkileşim türü
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538 (biyofilim pozitif kontrol suşu)	2000/2048	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 (biyofilim negatif kontrol suşu)	-	-	-	-	-
9	<i>S.epidermidis</i>	1000/256	3 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		2000/128		0	6 log	Aditif
		7.81/2048		0	6 log	Sinerjik
17	<i>S.epidermidis</i>	62.5/1024	3 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		500/512		90	5 log	Aditif
18	<i>S.epidermidis</i>	2000/512	2 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		4000/128		0	6 log	Aditif
27	<i>S.epidermidis</i>	250/2048	5 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
		500/128		0	6 log	Aditif
31	<i>S.epidermidis</i>	100/1024	1 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
32	<i>S.epidermidis</i>	2000/128	4 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif
33	<i>S.epidermidis</i>	2000/128	9 x 10 ⁶	48	5 log	Aditif
41	<i>S.epidermidis</i>	1000/1024	2 x 10 ⁶	0	6 log	Sinerjik
		2000/128		0	6 log	Aditif
	<i>S.epidermidis</i> NTCC 11047 (biyofilim pozitif kontrol suşu)	2000/2048	9 x 10 ⁶	0	6 log	Aditif

NAC: N-asetilsistein, MBEK: Minimum biyofilim eradikasyon konsantrasyon.

Çalışılan 50 bakterinin “ampisilin ve NAC” MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında 45’inde hiç üreme olmamış, bakteri miktarında 6 log azalma tespit edilmiş ve beş bakteride az sayıda koloni gözlenip 5 log azalma olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde, çalışılan 31 bakterinin “vankomisin ve NAC” MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında 24 bakteri hiç ürememiş, bakteri miktarında 6 log azalma ve 7 bakteride ise az sayıda koloni gözlenip 5 log azalma saptanmıştır. Farnesol ve NAC’ın kombine etkisinin *S.epidermidis* izolatlarının biyofilimlerine etkisini araştıran başka bir çalışmada, MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan ekim yapmış ve bakteri miktarında 4 log azalma tespit edilmiştir²⁶.

Çalışmalarda, *ica* operonunun varlığı ile biyofilm üretiminin fenotipik olarak gözlemlenmesi arasında bir ilişki olduğu düşünülse de, bu ilişkinin kompleks mekanizmalar içerdiği belirtilmiştir. Özellikle bu lokusta meydana gelen nokta mutasyonları, biyofilm oluşumunun negatif regülasyonuna neden olabilmekte ve stres, in vivo ve in vitro ortam farklılığı gibi durumlar biyofilmin gen ekspresyon düzeylerini etkileyebilmektedir^{27,28}. Çalışmamızda 50 stafilokok izolatının tamamında *icaA* ve *icaD* genleri tespit edilmiştir.

Stafilokokkal biyofilm gelişiminde *icaADBC* lokusunun dışında *ica* bağımsız moleküler yolların varlığı da ortaya konmuştur. Bu mekanizmaların temelinde hücre yüzey adezinlerinin matrikse bağlanmasındaki farklılıklar ve farklı biyofilm proteinleri etkilidir. Bu mekanizmalardan en önemlisi ve en iyi aydınlatılmış olanı *bap* sentezidir. *sarA* geni, *bap* geni için bir aktivatör ve *bap* aracılı biyofilm oluşumunda arttırıcı etkisi olan bir regülatör olarak işlev görmektedir²⁷. Özellikle, MRSA izolatlarında *sarA* geninin mutasyonunun biyofilm oluşum kapasitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir²⁹. Bu çalışmada 50 stafilokok izolatının tamamında *sarA* geni tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca *icaA*, *icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine NAC'ın etkisinin saptanması için bu genlerin NAC ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı (kontrol) ile NAC ve antibiyotikleri içeren besiyerinde üretilen kültür ortamındaki ekspresyon düzeylerinin farkı araştırılmıştır. Sonuç olarak, ampisilin ve NAC'ın sinerjik etki gösterdiği konsantrasyonları içeren kuyucuklarda, *icaD* geninin ekspresyon düzeyinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu grupta, *icaA* ve *sarA* geni ekspresyon düzeylerinde kontrole göre bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Biyofilm oluşumu farklı ortam koşullarına hassas ve planktonik formlara kıyasla daha kompleks bir yapıdır. Bu nedenle daha önce de belirttiğimiz gibi inokulum miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi birçok parametre biyofilm içerisindeki mikroorganizmaları etkilemektedir. Stabil olmayan bu süreç içerisinde moleküler teknikler için örnek alınırken de gen ekspresyon düzeylerinde bazı farklılıklar meydana gelebilir. Bu nedenle konvansiyonel yöntemlerle saptamış olduğumuz sonuçlar genel olarak moleküler yöntemle paralel gitse de sadece ampisilin ve NAC birlikteliğinde *icaA* ve *sarA* gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenememiş olmasının bu nedenden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada ampisilin ve NAC ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda vankomisin ve NAC ile sinerjik etki gösteren kuyucuklarda ve vankomisin ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda *icaA*, *icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon düzeylerinde kontrole göre bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu gruplarda konvansiyonel yöntemler ve moleküler yöntemle elde edilen sonuçlar birbirini desteklemiştir.

NAC molekülünün antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında antibiyotiklerin MİK değerleri, MBEK değerleri ve biyofilm oluşumunda rol oynayan gen ekspresyonlarının düzeyleri üzerine öngörülen etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Özellikle tedavisi zor olan ve antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların ve biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde NAC molekülünün antibiyotiklerle birlikte kullanılmasının tedaviyi kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmanın sonucu olarak stafilokoklarda

gösterilmiş olan bu etki sonucunda NAC molekülünün kombine ilaç tedavisi için yeni bir alternatif olabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada i) NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında bu antibiyotiklerin stafilokoklara etki eden MİK değerlerini düşürdüğü, ii) NAC molekülünün ampilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında bu antibiyotiklerin stafilokok biyofilmine etki eden MBEK değerlerini düşürdüğü, iii) NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında stafilokoklarda biyofilm oluşumunda etkili olan genlerin fark saptanmayan ve artış gösteren ekspresyon düzeyleri olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak NAC molekülünün diğer mikroorganizmalar ve antimikrobiyal ajanlar ile birlikte çalışmasının tedaviye yeni yaklaşımlar açısından umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu çalışma ile ilgili olarak çıkar çatışması bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JWJB. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012; 33(26): 5967-82.
2. Blasi F, Page C, Rossolini GM, Pallicchi L, Matera MG, Rogliani P, et al. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respir Med* 2016; 117: 190-7.
3. Olofsson A-C, Hermansson M, Elwing HJAEM. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(8): 4814-22.
4. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol* 2000; 40(2): 175-9.
5. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *J Apmis* 2007; 115(8): 891-9.
6. Institute CaLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th Informational Supplement CLSI M100-S28. 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 2018.
7. Kayış U. *Acinetobacter* spp, izolatlarında dışı atım pompası (Dap) inhibitörlerinin siprofloksasinin etkinliği üzerine etkisi. [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Edirne: Trakya Üniversitesi, 2016.
8. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL, disease i. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44(4): 363-6.
9. Özseven AG, Sesli Çetin E, Özseven LJMB. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi* 2012; 46(3): 410-20.
10. Kirmusaoğlu S. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. In: Kirmusaoğlu S (ed). *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. (E-book). IntechOpen. 2016;1-17.
11. Gad GFM, Aziz AAA, Alybrahem RJJAPS. In-vitro adhesion of *Staphylococcus* spp. to certain orthopedic biomaterials and expression of adhesion genes. *Res J* 2012; 2(6): 145.

12. Juhlin A, Svensson S, Thomsen P, Trobos MJJoBMRPA. Staphylococcal biofilm gene expression on biomaterials—A methodological study. *J Biomed Mater Res A* 2017; 105(12): 3400-12.
13. Livak KJ, Schmittgen TDJm. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
14. Hogan S, Stevens N, Humphreys H, O’Gara J, O’Neill EJCpd. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. *Curr Pharm Res* 2015; 21(1): 100-13.
15. Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 2010; 10(1): 140.
16. Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. *J Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34(1): 20-3.
17. Domenech M, García EJA. N-Acetyl-L-Cysteine and cysteamine as new strategies against mixed biofilms of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Chemother* 2017; 61(2): e01992-16.
18. Göçer H, Emir D, Önger ME, Dabak NJ. Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation: an in vitro study. *Surgery* 2017; 28(1): 013-8.
19. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15(5): 264-70.
20. Perez-Giraldo C, Rodriguez-Benito A, Moran F, Hurtado C, Blanco M, Gomez-Garcia AJ. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(5): 643-6.
21. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche ROJAa, Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Chemother* 2007; 51(4): 1556-8.
22. Efrati S, Berman S, Siman-Tov Y, Lotan R, Averbukh Z, Weissgarten J, et al. N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(7): 1873-81.
23. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol* 2009;58(3):261-7.
24. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol in combination with N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm cells. *Braz J Microbiol* 2012; 43(1): 235-42.
25. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomicin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2003; Suppl 2: 95-100.
26. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol in combination with N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm cells. *Brazil J Microbiol* 2012; 43(1): 235-42.
27. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; 183(9): 2888-96.
28. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun* 2010; 34(1): 81-9.
29. Trotonda MP, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR. *SarA* positively controls bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2005; 187(16): 5790-8.