

Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarından İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokokların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması

Investigation of Biofilm Formation Properties of Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Catheter-Related Bloodstream Infections

Duygu ÖCAL(ID), Alper TEKELİ(ID), İştah DOLAPÇI(ID)

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

Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Türkiye.

Makale Atfı: Öcal D, Tekeli A, Dolapçı İ. Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen koagülaz negatif stafilokokların biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56(3):506-524.

ÖZ

Biyofilm aracılı enfeksiyonların hasta sağlığı üzerindeki önemli olumsuz etkileri ve bu nedenle biyofilm üreten mikroorganizmaları tespit etmek için güvenilir bir fenotipik yöntemin gerekliliği göz önüne alınarak, bu çalışmada kateter ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) fenotipik ve moleküler olarak biyofilm oluşumunun gösterilmesi ve kullanılan yöntemlerin birbirleriyle kıyaslanması amaçlanmıştır. Aynı zamanda tedaviyi yönlendirici olması açısından vankomisin biyofilm üzerindeki etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Çalışmamızda 30'u kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu (KİKDE) etkeni olan [15 hastanın hem kateter ucu hem de kan kültürlerinden izole edilen], 89'u santral venöz kateteri (SVK) olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen [13'ü kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni, 76'sı kontaminant] ve 35'i kateter kolonizasyonu olarak izole edilen toplam 154 KNS izolatının biyofilm oluşturma özellikleri mikropalak yöntemi, Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyerinde üreme özellikleri ve polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] (*icaA*, *icaD* ve IS256 genleri için) ile araştırılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Vankomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değerleri saptanmıştır. KİKDE saptanan hastaların kateter uçlarından ve periferik kanlarından izole edilen KNS'ler arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi göstermek amacıyla "pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) kullanılmıştır. Çalışmaya alınan toplam 154 KNS izolatının %38.9'u *Staphylococcus epidermidis* (n= 60), %34.4'ü *Staphylococcus haemolyticus* (n= 53), %20.7'si *Staphylococcus hominis* (n= 32) ve %3.8'i *Staphylococcus capitis* (n= 6) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda KKA yöntemi ile izolatların %31.8'inde, mikropalak yöntemi ile %68.1'inde biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Mikropalak yöntemi ile izolatların %22 (n= 34)'si zayıf, %31.2 (n= 48)'si orta ve %14.9 (n= 23)'ü kuvvetli biyofilm üreticileri olarak belirlenmiştir. Mikropalak yönteminde zayıf pozitif olarak saptanan izolatlar için KKA yönteminin duyarlılığı düşük bulunurken, orta ve yüksek düzeyde pozitiflik belirlenen izolatlarda KKA yönteminin duyarlılığının yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur. İzolatların *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin pozitiflik oranları sırasıyla 40 (%25.9), 57 (%37) ve 77 (%50) olarak bulunmuştur. Toplam 107 (%69.5) izolatla

İletişim (Correspondence): Dr. Duygu Öcal, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 69 05, **E-posta (E-mail):** drduygunil@hotmail.com

araştırılan genlerden en az birinin pozitifliği saptanmıştır. Elli beş (%35.7)'inde tek gen, 35 (%22.7)'inde iki gen ve 17 (%11)'sinde üç gen pozitifliği saptanmıştır. Gen pozitifliği saptanmayan 47 KNS izolatının 10'unda (beş *S.epidermidis*, üç *S.hominis*, bir *S.haemolyticus* ve bir *S.capitis*) mikroplak yöntemi ile biyofilm (dördü zayıf, dördü orta, ikisi kuvvetli) oluşumu saptanmıştır. Vankomisin MBEK/MİK değerleri yüksek olarak saptanmış ve izolatların biyofilm oluşturma gücü arttıkça MBEK/MİK oranının da arttığı izlenmiştir. PFGE'de KİKDE tanısı alan hastaların kateter örnekleri ve kanlarından izole edilen KNS'ler, değerlendirilemeyen bir izolat haricinde, %100 benzer profil oluşturmuştur. Mikroplak yönteminin KKA besiyerine göre daha fazla sayıda izolatta biyofilm oluşumunu göstermesi ve biyofilmin derecesi hakkında bilgi vermesi nedeniyle, daha iyi bir seçenek olduğu düşünülmüştür. *icaAD* ve *IS256* genlerinin varlığı her zaman in vitro biyofilm oluşumu ile ilişkili bulunmamaktadır. Biyofilmleri özgül olarak tespit etmek için güvenilir yöntemlerin kullanılmasının, tedavilerinde güçlükle karşılaşılan hastalar için yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Tıbbi araç ilişkili enfeksiyonlarda biyofilm oranlarının ve biyofilm oluşturan izolatların antimikrobiyal direnç oranlarının yüksekliği göz önüne alındığında, duyarlılık sonuçları için sadece MİK sonuçlarını değerlendirmenin yeterli olmayacağı öngörülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Biyofilm, kateter ilişkili kan akım enfeksiyonları, koagülaz negatif stafillokok.*

ABSTRACT

In view of the significant negative impact of biofilm-mediated infection on patient health and the necessity of a reliable phenotypic method to detect biofilm producers, this study aimed to demonstrate phenotypic and molecular biofilm formation in coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from catheter related infections and to compare the methods used with each other. The study was also aimed to determine the biofilm eradication effect of vancomycin in order to guide for the treatment. For the detection of biofilm formation, a total of 154 CoNS clinical isolates of which 30 being causative agents of catheter related bloodstream infection (CRBSI) (isolated from both the catheter tip and blood cultures of 15 patients), 89 being isolated from peripheral blood cultures of patients without a central venous catheter (CVC) (13 of them were bloodstream infection agents, 76 of them were contaminant), and 35 being isolated as catheter colonizer, were screened by tissue culture plate (TCP), Congo red agar (CRA) method and polymerase chain reaction (*icaA*, *icaD* and *IS256*). Vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum biofilm eradicating concentration (MBEC) values were determined. The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) method was used to show the clonal relationship between CoNS isolated from the catheter tips and peripheral blood of patients with CRBSI. Of the 154 CoNS isolates included in the study, 38.9% were *Staphylococcus epidermidis* (n= 60), 34.4% were *Staphylococcus haemolyticus* (n= 53), 20.7% were *Staphylococcus hominis* (n= 32), and 3.8% were detected as *Staphylococcus capitis* (n= 6). In our study, biofilm formation was shown in 31.8% with the CRA method and in 68.1% with the TCP method. By TCP method, 22% (n= 34) were determined as weak, 31.2% (n= 48) medium and 14.9% (n= 23) strong biofilm producers. While the sensitivity of the CRA method was found to be low for isolates that were determined as weak positive in the microplate method, the high sensitivity of the CRA method for isolates with medium and strong positivity was found remarkable. The positivity rates of *icaA*, *icaD* and *IS256* genes in a total of 154 CoNS isolates were found to be 40 (25.9%), 57 (37%) and 77 (50%), respectively. In total, at least one gene positivity was detected in 107 (69.5%) isolates. Single gene positivity was detected in 55 (35.7%), two gene positivity in 35 (22.7%) and three gene positivity was detected in 17 (11%) of the included CoNS. Biofilm formation (four weak, four medium, two strong) was detected by microplate method in 10 of 47 CoNS isolates (five *S.epidermidis*, three *S.hominis*, one *S.haemolyticus* and one *S.capitis*) in which no genes were detected. Vancomycin MBEC/MIC values were found to be high and it was observed that as the biofilm forming power of the isolates increased, the MBEC/MIC ratio also increased. The CoNS isolated from the catheter samples and blood of patients diagnosed with CRBSI had a 100% similar profile with PFGE except for one unevaluable isolate. The tissue culture plate (TCP) method was found to be most sensitive, accurate and reproducible screening method for detection of biofilm formation by staphylococci and has the advantage of being a quantitative model to study the adherence of staphylococci. The presence of the *icaAD* and *IS256* gene is not always associated with in vitro biofilm formation. For this reason, it is more appropriate to use more than one method together for the evaluation of biofilm formation. It was thought that the use of reliable methods to specifically detect biofilms could be helpful in diseases that are difficult to treat. Considering the high rates of biofilm and antimicrobial resistance of biofilm-forming isolates in biomedical device-

associated infections, it was determined that it would not be sufficient to evaluate only the MIC results for susceptibility results.

Keywords: *Biofilm, catheter-related bloodstream infection, coagulase-negative staphylococci.*

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) insan cilt florasının baskın mikroorganizmasıdır. Aynı zamanda antibiyotiklere direnç geliştirebilme kapasiteleri ve biyofilm oluşturabilme potansiyelleri nedeniyle kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının (KİKDE) da önde gelen etkeni olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilen KİKDE, acil müdahale ve bu nedenle çoğunlukla ampirik tedavi gerektirmektedir. KİKDE etkeni KNS'ler içerisinde ilk sırayı *Staphylococcus epidermidis* alırken bunu, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Staphylococcus capitis* izlemektedir^{1,2}.

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları antimikrobiyal dirençlerine de katkı sağlamaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerin çoğunun çoklu ilaç direncine sahip olduğu gösterilmiştir. Bir bakterinin ilaç duyarlılığı klasik olarak antimikrobiyal duyarlılık testleri (ADT) ile ya da ilgili antimikrobiyal için minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) saptanmasıyla gösterilmektedir. Bununla birlikte bu tanımlamalar laboratuvarında eksponansiyel üreme fazındaki planktonik bakteriler üzerinden yapılmaktadır. Oysa çalışmalarda biyofilm ilişkili enfeksiyonların konvansiyonel antibiyotikler ile tedavisinde karşılaşılan güçlüklerden bahsedilmektedir. Bunun nedenleri arasında antibiyotik aktivitesinin, bakterinin üreme hızı ve metabolizmasına bağlı olarak dramatik olarak düşmesi yer almaktadır^{3,4}. Bu nedenle biyofilm oluşumu ile seyreden kateter ilişkili enfeksiyonlarda daha etkili, dolayısıyla da minimum biyofilm eradike edici konsantrasyonlarda (MBEK) uygulanan tedaviler gerekmektedir.

Biyofilm için farklı kaynaklarda pek çok benzer tanımlama yer almaktadır. Genel olarak, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik bir madde içerisinde gömülü olan, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından planktonik formlarından farklılıklar gösteren, birbirlerine ve bir ara yüze tutunmuş, birbirleri ile iletişim içerisinde olan hareketsiz hücre topluluğuna biyofilm denilmektedir⁵. KNS'lerin biyofilm yapısının temelini, salgıladıkları N-asetil glukozaminil transferaz enzimi tarafından sentezlenen β -1,6-N-asetil glukozamininden oluşan, hücreler arası polisakkarit yapıda bir adezin (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) oluşturmaktadır. PIA sentezi kromozomal *ica* genleri tarafından kontrol edilmektedir. Aynı operon üzerinde bulunan *icaABCD* genlerinden, *icaA*, N-asetil glukozaminil transferaz enzimini kodlayarak, *icaD* de, bu enzimin maksimum ekspresyonunu sağlayarak biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır⁶. Tam biyofilm yapısının oluşması için bu iki genin birlikte çalışması gerektiği bildirilmektedir⁷. Klinik KNS izolatlarında sıklıkla görülen aktif hareketli bir genetik eleman olan IS256 da, *ica* gen ekspresyonunu etkileyerek biyofilm oluşumunu düzenlemektedir⁶.

Biyofilm yapısının tedavi güçlüğü ile ilişkili bir virülans faktörü olabileceğinden yola çıkılarak bu çalışmada, santral venöz kateter (SVK) uçları ve aynı hastaların kan kültürlerinden üretilen, ayrıca kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni ya da kontaminantı ya da kateter

kolonizanı olarak izole edilen KNS'lerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda tüm izolatların vankomisin için MİK değerleri ile biyofilm oluşturanların sesil formlarının duyarlılıklarının belirlenmesi için MBEK değerleri saptanarak, biyofilm oluşturan izolatların tedavileri için yol gösterici veriler elde edilmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 24.12.2012 ve Karar No: 21-680-12).

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılan çalışmada, Ocak 2013-Ocak 2015 tarihleri arasında, İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden izole edilen KNS'ler kullanıldı.

İzolatların Elde Edilmesi ve Tanımlanması

Çalışmamızda KİKDE etkeni (n= 30) olan [hem kateter ucu hem de kan kültürlerinden izole edilen (n= 15)], SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen (n= 89) [kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni (n= 13), kontaminant (n= 76)] ve kateter kolonizanı (n= 35) olarak izole edilen toplam 154 KNS izolatu incelendi. İzolatlar konvansiyonel yöntemler, BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ve gerek duyulduğunda Bruker MALDI TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak tiplendirildi. Kateter kültürü Maki ve arkadaşları⁸ tarafından tanımlanan protokole göre yapıldı. Bakteriyemi ve kan dolaşım enfeksiyonunun tanımlanması ve ayırımında Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] tarafından belirlenen kriterler dikkate alındı⁹. İzolatlar ileri çalışmalar için %15 gliserollü triptik soy buyyon (TSB) içerisinde -20°C'de saklandı.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi, sefoksitine dirençli olanlar metisilin dirençli olarak kabul edildi¹⁰. Metisilin direncinin doğrulanması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile *mecA* geni varlığı araştırıldı¹¹. Vankomisin için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK değeri saptandı¹⁰. Kalite kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Saptanması

İzolatların biyofilm oluşturma kapasitelerinin kalitatif metotla fenotipik olarak gösterilmesinde Kongo kırmızısı agar (KKA) yöntemi kullanıldı¹². Bu amaçla tek koloni ekimi yapılan KKA besiyerleri 35°C'de 24 saat süre ile inkübe edildi, kuru kristal yüzeyli siyah koloniler PIA-pozitif olarak değerlendirilirken, pembe-kırmızı renkli bazen de ortasında siyahlaşma (boğa gözü görünümü) izlenen kolonileri oluşturan izolatlar PIA-negatif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol olarak *S.epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı ve plaklar iki farklı araştırmacı tarafından birbirlerinden bağımsız olarak yorumlandı.

Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Üretiminin Gösterilmesi

Biyofilm üretiminin kantitatif olarak saptanması amacıyla, Stepanovic ve arkadaşları¹³ tarafından tanımlanan mikroplak yöntemi kullanıldı. Her izolat üç farklı kuyucukta çalışıldı ve sterilite kontrolü sadece besiyeri içeren kuyucuklar oluşturularak sağlandı. Kuyucukların absorban değerleri spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm’de saptandı, biyofilm pozitifliği, elde edilen “cut-off (sınır değer)”e göre belirlendi. Sadece besiyeri içeren kuyucukların optik dansitometrelerinin ortalaması alındı ve üç standart derivasyonu hesaplanarak ODc değeri belirlendi. $OD \leq ODc$: negatif; $ODc < OD \leq 2xODc$: zayıf pozitif; $2xODc < OD \leq 4xODc$: pozitif; $4xODc < OD$: kuvvetli pozitif olarak yorumlandı¹⁴. Pozitif kontrol olarak *S.epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı ve plaklar iki farklı araştırmacı tarafından birbirlerinden bağımsız olarak yorumlandı.

Vankomisin Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi

Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşturduğu gösterilen izolatlar için vankomisin MBEK değeri hesaplandı. Mikroplak kuyucuklarında %1 glikoz ilave edilmiş TSB içerisinde 24 saat 37°C’de inkübe edilen izolatların oluşturduğu biyofilm yapısı fizyolojik tuzlu su (FTS) ile üç kez yıkandı ve kuyucuklara katyonu ayarlanmış Müller Hinton Broth (MHB) II ile resüpsansiyon sonrası farklı konsantrasyonlarda vankomisin (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µL/ml) eklendi. Mikroplakların tekrar 24 saat 37°C’de inkübasyonunu takiben aspirasyon ile vankomisin uzaklaştırıldı, FTS ile üç kez yıkanan kuyucuklarda bulunan biyofilm yapısı metanol ile 20 dakika süreyle sabitlenerek kurutulduktan sonra kristal viyole ile boyandı. Kuyucukların absorbanı spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm’de okutuldu, optik dansite ölçümündeki değişkenleri en aza indirmek için deney üç kez tekrarlandı¹⁴. Pozitif kontrol olarak *S.epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *icaA*, *icaD* ve *IS256* Genlerinin Saptanması

İzolatların genomik DNA’larının ticari kit (Fermentas, Litvanya) ile ekstraksiyonunu takiben, literatürde tanımlanmış primer dizileri kullanılarak *icaA*, *icaD* ve *IS256* gen bölgelerinin varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı^{15,16}. Pozitif kontrol olarak *S. epidermidis* ATCC 35984 suşu kullanıldı.

“Pulsed Field” Jel Elektroforezi

KİKDE saptanan hastaların SVK uçlarından ve periferik kanlarından izole edilen bakteriler arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi göstermek amacıyla PFGE yöntemi kullanıldı¹⁷. Sonuçlar Tenover ve arkadaşlarının¹⁸ kriterlerine göre değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) paket programı ile yapıldı. Kategorik değişkenler sayı (n) ve yüzde (%) olarak sunuldu. Tanı performanslarının karşılaştırılması için duyarlılık, seçicilik, doğruluk, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) hesaplandı. Kategorik değişkenler arasındaki oran karşılaştırmaları örneklem büyüklüklerine bağlı olarak ki-kare testi veya Fisher-exact test ile gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 154 KNS izolatının %38.9'u *S.epidermidis* (n= 60), %34.4'ü *S.haemolyticus* (n= 53), %20.7'si *S.hominis* (n= 32) ve %3.8'i *S.capitis* (n= 6) olarak saptanmıştır. Kan kültüründe kontaminant olarak izole edilen birer adet *Staphylococcus warnerii*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Staphylococcus sciuri* birlikte %1.8'lik oranı oluşturmuştur. KNS'lerin izole edildikleri yerlere göre tür düzeyinde dağılımları Tablo I'de verilmiştir.

KKA yöntemi ile toplam 154 izolatın 49 (%31.8)'unda PIA oluşumu gösterilmiştir. Mikroplak yönteminin değerlendirilmesinde ODc değerleri; 0.28-0.56 arasındakiler zayıf, 0.57-1.12 olanlar orta ve > 1.13 olanlar kuvvetli biyofilm üreten izolatlar olarak kabul edilmiştir. Buna göre mikroplak yöntemi ile tüm izolatların %68.1 (n= 105)'inde biyofilm üretimi saptanmıştır. Biyofilm pozitif olarak saptanan izolatların %32.4'ü (n= 34) zayıf, %45.7 (n= 48)'si orta ve %21.9 (n= 23)'ü kuvvetli biyofilm üreticileri olarak belirlenmiştir. Toplam izolat sayısı üzerinden değerlendirme yapıldığında mikroplak yönteminin biyofilm varlığını göstermesi KKA yöntemine göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

Her iki yöntemin, Tablo III'te KNS türleri düzeyinde, Tablo IV'te ise KNS'lerin izole edildikleri yerlere göre karşılaştırılmaları verilmiştir.

Her iki yöntem ile de KNS türleri arasında herhangi bir türün diğerine göre daha fazla ya da az biyofilm oluşturduğu yönünde bir veri elde edilmemiştir (KKA yöntemi için $p = 0.215$, mikroplak yöntemi için $p = 0.118$).

KKA yönteminin mikroplak yöntemine göre tanı doğruluğundaki başarısını belirlemek için saptanan duyarlılık, seçicilik, PPD, NPD ve doğruluk değerleri Tablo V'te verilmiştir.

KNS'lerin izolasyon bölgelerine göre yapılan değerlendirmede de KİKDE etkenleri, kan kültürlerinde kontaminant olarak izole edilenler ve kateter kolonizanları için biyofilm oluşumunu saptamada mikroplak yönteminin daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (sırasıyla $p = 0.002$, $p < 0.001$, $p < 0.001$).

Tablo VI'da toplam izolat sayısı üzerinden, mikroplak yönteminde zayıf, orta ya da kuvvetli biyofilm oluşumu ile KKA yönteminde saptanan pozitiflikler arasındaki ilişki gösterilmiştir.

Mikroplak yönteminde zayıf pozitif olarak saptanan izolatlar için KKA yönteminin duyarlılığı düşük bulunurken, orta ve kuvvetli düzeyde pozitiflik veren izolatlarda KKA yönteminin de duyarlılığının yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur.

Vankomisin MBEK değerini belirlemek için mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşturduğu gözlenen 105 adet KNS izolatı (45 *S.epidermidis*, 31 *S.haemolyticus*, 24 *S.hominis* ve beş diğeri) değerlendirilmiştir (Tablo VII).

Tablo 1. KNS İzolatlarının Klinik Örnek ve Tür Dağılımları

Örnekler	<i>S.epidermidis</i> n (%)	<i>S.haemolyticus</i> n (%)	<i>S.hominis</i> n (%)	<i>S.capitis</i> n (%)	<i>S.warnerii</i> n (%)	<i>S.saprophyticus</i> n (%)	<i>S.sciuri</i> n (%)	Toplam n (%)
Kan kültürü	7 (4.5)	5 (3.2)	3 (1.9)	-	-	-	-	15 (9.7)
KİKDE	7 (4.5)	5 (3.2)	3 (1.9)	-	-	-	-	15 (9.7)
KDE etkenleri (SVK'sı olmayan hastalardan izole)	7 (4.5)	6 (3.8)	-	-	-	-	-	13 (8.4)
Kan kültürü kontaminantları	21 (13.6)	24 (15.5)	12 (7.7)	4 (2.5)	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.6)	74 (48.1)
Kateter kolonizantları	18 (11.6)	13 (8.4)	14 (9)	2 (1.2)	-	-	-	47 (30.5)
Toplam, n (%)	60 (38.9)	53 (34.4)	32 (20.7)	6 (3.8)	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.6)	154 (100)

KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu, KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu, SVK: Santral venöz kateteri. İzolatların antimikrobiyal direnç profilleri Tablo II'de verilmiştir. Metisilin direnci Kirby Bauer disk difüzyon testi ile %81.8 (n= 126), PCR ile %83.1 (n= 128) olarak saptanmıştır. Vankomisin MİK değeri tüm izolatlar için 4 µg/ml'nin altında saptanmış ve tamamı vankomisine duyarlı kabul edilmiştir (MİK₅₀= 1 µg/ml, MİK₉₀= 2 µg/ml).

Tablo II. KNS İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Oranları

Antimikrobiyal ilaçlar	<i>S.epidermidis</i> (n= 60) n (%)	<i>S.haemolyticus</i> (n= 53) n (%)	<i>S.hominis</i> (n= 32) n (%)	Diğer KNS (n= 9) n (%)
Sefoksitin*	43 (71.7)	49 (92.4)	27 (84.4)	7 (77.7)
Sefazolin	43 (71.7)	49 (92.4)	27 (84.4)	7 (77.7)
Siprofloksasin	37 (61.6)	46 (86.7)	24 (75)	5 (55.5)
Trimetoprim- sulfametaksazol	28 (46.6)	46 (86.7)	18 (56.2)	7 (77.7)
Rifampisin	20 (33.3)	37 (69.8)	10 (31.2)	4 (44.4)
Eritromisin	45 (75)	48 (90.5)	31 (96.8)	6 (66.6)
Klindamisin	41 (68.3)	29 (54.7)	24 (75)	6 (66.6)
İndüklenebilir klindamisin direnci	10 (16.6)	7 (13.2)	10 (31.2)	2 (22.2)
Amoksisilin-klavulanik asit	43 (71.7)	49 (92.4)	27 (84.4)	7 (77.7)
Tetrasiklin	34 (56.6)	28 (52.8)	20 (62.5)	3 (33.3)
Gentamisin	27 (45)	44 (83)	17 (53.1)	4 (44.4)
Teikoplanin	0	0	0	0
Linezolid	0	0	0	0
Vankomisin	0	0	0	0

*Kateter kolonizanı olarak izole edilen bir *S.haemolyticus* ve bir *S.epidermidis*, sefoksitin duyarlı olarak bulunmasına rağmen, mecA pozitif olarak saptanmıştır.

Minimum MBEK değeri 1 µg/ml, maksimum MBEK değeri ise 64 µg/ml olarak bulunmuş, ortalama değer 4 µg/ml olarak hesaplanmıştır. MBEK/MİK oranları, planktonik formların MİK değerleri ile bu bakterilerin oluşturdukları biyofilm yapısının vankomisin ile muamelesi sonrası saptanan MBEK değerlerinin karşılaştırılması yoluyla elde edilmiştir. Buna göre, zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda MBEK/MİK oranları düşük olarak saptanırken, izolatların biyofilm oluşturma gücü arttıkça bu oranın da arttığı izlenmiştir (p< 0.001).

Toplam 154 KNS izolatında *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin pozitiflik oranları sırasıyla 40 (%25.9), 57 (%37) ve 77 (%50) olarak bulunmuştur.

Toplam 107 (%69.5) izolatta araştırılan genlerden en az biri pozitif bulunmuştur. Bunlardan 55 (%35.7)'sinde tek gen, 35 (%22.7)'sinde iki gen ve 17 (%11)'inde üç gen pozitifliği saptanmıştır.

Araştırılan genleri taşımayan 47 KNS'nin 37'sinde mikropalak yönteminde de biyofilm oluşumu saptanmamıştır. Periferik kan kültürü örneklerinden izole edilen 10 izolatta ise (beş *S.epidermidis*, üç *S.hominis*, bir *S.haemolyticus* ve bir *S.capitis*) *icaA*, *icaD* ve IS256 gen pozitiflikleri bulunmadığı halde mikropalak yöntemi ile dördünde zayıf, dördünde orta ve ikisinde kuvvetli olmak üzere biyofilm oluşumu gösterilmiştir.

Tablo III. KNS Türlerine göre KKA ve Mikroplak Yöntemi ile Saptanan Biyofilm Oluşturma Oranları

Mikroplak yöntemi	Negatif, n= 105				Pozitif, n= 49			
	Biyofilm oluşumu negatif n= 48 n (%)	Zayıf biyofilm oluşturan n= 30 n (%)	Orta kuvvette biyofilm oluşturan n= 17 n (%)	Kuvvetli biyofilm oluşturan n= 10 n (%)	Biyofilm oluşumu negatif n= 1 n (%)	Zayıf biyofilm oluşturan n= 4 n (%)	Orta kuvvette biyofilm oluşturan n= 31 n (%)	Kuvvetli biyofilm oluşturan n= 13 n (%)
<i>S.epidermidis</i> n= 60 (%)	15 (25)	11 (18.3)	6 (10)	4 (6.6)	-	3 (3.3)	12 (20)	9 (15)
<i>S.haemolyticus</i> n= 53	21 (39.6)	11 (20.7)	4 (7.8)	4 (7.8)	1 (1.8)	1 (1.8)	9 (16.9)	2 (3.7)
<i>S.hominis</i> n= 32	8 (25)	5 (15.6)	6 (18.7)	2 (6.3)	-	-	9 (28.1)	2 (6.3)
Diğer* n= 9	4 (44.4)	3 (33.3)	1 (11.1)	-	-	-	1 (11.1)	-

*Diğer: *S.capitis* (n= 6), *S.warnerii* (n= 1), *S.saprophyticus* (n= 1), *S.sciuri* (n= 1).

Tablo IV. Örneklerle göre KKA ve Mikropalak Yöntemi ile Saptanan Biyofilim Pozitiflik Oranları

	PIA oluşumu	Biyofilim oluşumu negatif n (%)	Zayıf biyofilim oluşturan n (%)	Orta biyofilim oluşturan n (%)	Kuvvetli biyofilim oluşturan n (%)	Toplam n (%)
KİKDE	Kan kültürü	KKA +	1 (0.6)	6 (3.8)	2 (1.2)	9 (5.8)
	SVK	KKA -	1 (0.6)	1 (0.6)	2 (1.2)	6 (3.8)
	KDE etkeni	KKA +	1 (0.6)	1 (0.6)	2 (1.2)	6 (3.8)
Kan kültürü (SVK yok)	Kontaminant	KKA -	3 (1.9)	2 (1.2)	1 (0.6)	8 (5.1)
	Kateter kolonizasyonu	KKA +	10 (6)	9 (5.8)	5 (3.2)	33 (21.4)
Toplam			49 (31.8)	48 (31.2)	23 (14.9)	154

KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu, KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyon etkeni, KKA: Kongo kırmızısı agar.

	KNS türleri						
	<i>S.epidermidis</i> n= 60	<i>S.haemolyticus</i> n= 53	<i>S.hominis</i> n= 32	KİKDE n= 30	KDE etkeni n= 13	Kan kültürü kontaminanı n= 64	Kateter kolonizanı n= 47
Duyarlılık	%53.3 (%38.-%68)	% 38.7 (%22.4-%57.7)	% 45.8 (%26.1-%66.7)	%64.2 (%44.1-%80.6)	%80 (%44.2-%96.4)	%29 (%14.8-%48.2)	%36.1 (%21.3-%53.7)
Seçicilik	%100 (%74.6-%100)	%95.4 (%75.1-%99.7)	%100 (%59.7-%100)	%100 (%19.7-%100)	%100 (%30.9-%100)	%100 (%87.-%100)	%90.9 (%57.1-%99.5)
PPD	%100 (%82.8-%100)	%92.3 (%62.-%99.5)	%100 (%67.8-%100)	%100 (%78.1-%100)	%100 (%59.7-%100)	%100 (%62.8-%100)	%92.8 (%64.1-%99.6)
NPD	%41.6 (%25.9-%59.1)	%52.5 (%36.3-%68.1)	%38 (%18.9-%61.3)	%16.6 (%2.9-%49.1)	%60 (%17.-%92.7)	%60 (%45.9-%72.6)	%30.3 (%16.2-%48.8)
Doğruluk	%65	%62.3	%59.3	%66.7	%84.6	%65.6	%48.9

Biyofilm oluşumunun KNS türlerine göre saptanmasında mikropalak yöntemi KKA yöntemine göre üstün bulunmuş ve iki yöntem arasında anlamlı fark saptanmıştır (*S.epidermidis* için p< 0.001, *S.haemolyticus* için p< 0.001 ve *S.hominis* için p= 0.001).

Tablo VI. Toplam İzolat Sayısı için KKA Yönteminin Başarı Oranları (Mikroplak Yöntemi Pozitifliğinin Zayıf, Orta ve Kuvvetli Olmasına Göre)

	Zayıf pozitif	Orta pozitif	Kuvvetli pozitif
Duyarlılık	%11.7 (%3.8-%28.3)	%64.5 (%49.3-%77.4)	%56.5 (%34.8-%76.1)
Seçicilik	%97.9 (%87.7-%99.8)	%97.9 (%87.7-%99.8)	%97.9 (%87.7-%99.8)
PPV	%80 (%29.8-%98.9)	%96.8 (%82-%99.8)	%92.8 (%64.1-%99.6)
NPV	%61.5 (%0.49.8-%72.1)	%73.8 (%61.2-%83.6)	%82.7 (%70.1-%90.9)
Doğruluk	% 62.7	% 81.4	% 84.7

PPV: Pozitif prediktif değer, NPV: Negatif prediktif değer.

KKA besiyerinde biyofilm oluşturan 49 izolatın altısında hiç gen pozitifliği saptanmamıştır, 14'ünde üç genin birlikte pozitifliği saptanmıştır.

Üç genden herhangi biri ya da tamamının pozitif olması durumunda KKA ve mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p= 0.606$). Mikroplak yönteminde zayıf, orta ya da kuvvetli pozitiflik saptanması ile yöntemin herhangi bir gen pozitifliğini yakalaması açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p= 0.910$). Bununla birlikte izolatların her üç geni de taşıması halinde, mikroplakta biyofilm oluşturmama durumunun izlenmediği görülmüştür ($p< 0.001$).

Her üç geni de taşıyan 17 KNS izolatının mikroplak yöntemi ile dokuzunun kuvvetli, altısının orta kuvvette ve ikisinin zayıf biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bu izolatların 14'ünde KKA besiyerinde de PIA oluşumu gözlenirken, kateter kolonizasyonu olarak izole edilen üçünde PIA varlığı saptanmamıştır. Bu 17 izolatın 10 tanesinin KİKDE etkeni olduğu görülmüştür, KİKDE etkenlerinde üç genin birlikte pozitif bulunma oranı anlamlı bulunmuştur ($p< 0.001$).

KİKDE etkenleri aralarındaki epidemiyolojik ilişki PFGE yöntemi ile incelenmiştir. Tekrar çalışmalarında da bant profili oluşturmaması nedeniyle değerlendirim dışı bırakılan bir *S.epidermidis* kan izolatı haricinde KİKDE tanısı alan hastaların SVK örnekleri ve kanlarından izole edilen KNS'ler %100 benzer profil oluşturmuştur. Bununla birlikte farklı hastalardan izole edilen KNS'ler arasında herhangi bir epidemiyolojik benzerlik saptanmamıştır.

TARTIŞMA

KNS izolatlarının etken olduğu araç ilişkili enfeksiyonlarda, özellikle biyofilm tabakası gelişimine bağlı olarak izlenen ilaç direnci ve tedavi güçlüğü ile ilgili yapılan çalışmalar, bu enfeksiyonların patogenezi, biyofilm oluşumunun gösterilmesinde kullanılan yöntemler ve biyofilm oluşturmuş mikroorganizmaların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ile ilgili veriler sunmaktadır^{4,7,19-22}. Çalışmamızda da 154 KNS izolatının biyofilm oluşturma özellikleri üç farklı yöntem ile incelenmiş ve vankomisin biyofilm üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Tablo VII. Mikroplak Yöntemiyle Biyofilm Pozitif Bulunan KNS İzolatlarında Vankomisinin MİK ve MBEK Değerleri

	0.125 µg/ml n (%)	0.25 µg/ml n (%)	0.5 µg/ml n (%)	1 µg/ml n (%)	2 µg/ml n (%)	4 µg/ml n (%)	8 µg/ml n (%)	16 µg/ml n (%)	32 µg/ml n (%)	64 µg/ml n (%)
<i>S. epidermidis</i> (n= 45)										
MBEK	-	-	-	1 (2.2)	12 (26.6)	13 (28.8)	9 (20)	3 (6.6)	4 (8.8)	3 (6.6)
MİK	-	2 (4.4)	2 (4.4)	18 (40)	22 (48.8)	1 (2.2)	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n= 31)										
MBEK	-	-	-	-	5 (16.1)	14 (45.1)	5 (16.1)	1 (3.2)	1 (3.2)	5 (16.1)
MİK	1 (3.2)	-	1 (3.2)	15 (48.3)	12 (38.7)	2 (6.5)	-	-	-	-
<i>S. hominis</i> (n= 24)										
MBEK	-	-	-	-	4 (16.6)	7 (29.1)	7 (29.1)	-	4 (16.6)	2 (8.3)
MİK	-	-	2 (8.3)	14 (58.3)	8 (33.3)	-	-	-	-	-
<i>Diğer</i> (n= 5)										
MBEK	-	-	-	-	4 (80)	1 (20)	-	-	-	-
MİK	-	-	2 (40)	1 (20)	2 (40)	-	-	-	-	-

MBEK: Minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon.

Klinik örneklerden ya da çevreden en sık izole edilen biyofilm oluşturan KNS türü, *S.epidermidis*'tir^{1,4}. KİKDE etkeni olarak izole edilen KNS'ler incelendiğinde de, *S.epidermidis*'in en sık izole edilen KNS türü olduğu, ardından *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.saprophyticus*'un geldiği görülmektedir^{1,20}. Cilt florasının bir parçası olması ve kontaminasyon sonucunda kolaylıkla enfeksiyona yol açabilmesi nedeniyle, bu enfeksiyonlarda en sık görülen etkeninin *S.epidermidis* olması beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda da benzer olarak en sık izole edilen KNS'ler sırasıyla *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.hominis* olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda mikropalak yöntemi ile tüm izolatların; %68.1 (n= 105)'inin biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Kateterler, kan veya KİKDE'lerden izole edilen stafilokoklarda biyofilm oluşumunun mikropalak yöntemi kullanılarak araştırıldığı çeşitli çalışmalarda biyofilm pozitiflik oranları %75, %46 ve %43.3 olarak saptanmıştır^{20,22,23}. Çalışmamızda %53.9 oranında (n= 83) biyofilm oluşturmayan ya da zayıf biyofilm oluşturan izolat saptanırken, izolatların %31.2 (n= 48)'si orta ve %14.9 (n= 23)'ü kuvvetli biyofilm üreticileri olarak belirlenmiştir. Hassan ve arkadaşları²⁴ ise çalışmalarında, invaziv araç ilişkili enfeksiyon etkenlerinde orta (%41) ve kuvvetli biyofilm (%22.7) oluşturan izolat oranını, zayıf biyofilm oluşturan ya da biyofilm oluşturmaya göre (%36.3) daha yüksek oranda saptamışlardır. Mathur ve arkadaşlarının²⁵ verileri ise sonuçlarımızla uyumlu bulunmuş, modifiye mikropalak yöntemi kullandıkları çalışmalarında biyofilm oluşturmaya/zayıf biyofilm oluşturan 70 (%46.0), orta kuvvette biyofilm oluşturan 60 (%39.4), kuvvetli biyofilm oluşturan 22 (%14.4) izolat saptandığı bildirilmiştir. Araç ilişkili enfeksiyonlarda biyofilm oluşumunun incelendiği farklı çalışmalarda zayıf, orta ya da kuvvetli biyofilm oluşturan izolat sayılarında farklılıklar izlense de, genel olarak biyofilm oluşma oranlarının yüksekliği dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda KKA yöntemi ile izolatların %31.8'inde biyofilm oluşumu gösterilmiş, bu oranın mikropalak yöntemi ile saptanan orandan (%68.1) düşük olduğu görülmüştür. Klinik örneklerden elde edilen 152 stafilokok izolatının biyofilm özelliklerinin KKA, tüp ve mikropalak yöntemleri ile değerlendirildiği bir çalışmada; izolatların %9.1'inin mikropalak yöntemi, %73.6'sının tüp yöntemi ile ve sadece %6.8'inin KKA yöntemiyle biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir²⁵. Kord ve arkadaşları²⁶ hem mikropalak hem de tüp yöntemiyle, *S.epidermidis* izolatlarının %53.6'sında, KKA yöntemi ile izolatların yalnızca %24.4'ünde biyofilm oluşumu göstermiştir. Hassan ve arkadaşları²⁴ KKA besiyerinin duyarlılığını %11, özgüllüğünü ise %92 olarak saptarken, az sayıda izolat ile yapılan bir başka çalışmada mikropalak yöntemi altın standart olarak kabul edilerek; KKA yönteminin duyarlılığı %0.9, özgüllüğü %97.4, PPD %50 ve NPD'si %25 olarak saptanmıştır¹⁹. Çalışmalarda mikropalak yönteminin biyofilm oluşumunu göstermede KKA besiyerine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir^{19,24,25}. Çalışmamızda benzer veriler elde edilerek, mikropalak yönteminde kuvvetli pozitif olan izolatlar için KKA yönteminin duyarlılığı %56.5, özgüllüğü %97.9 olarak saptanırken, mikropalak yönteminin zayıf pozitiflik veren izolatlar için duyarlılığı %11.7, özgüllüğü %97.9 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda mikropalak yönteminde zayıf pozitif olarak saptanan izolatlar için KKA yönteminin duyarlılığının düşük olduğu görülürken, mikropalak yöntemi ile orta ve yüksek düzeyde pozitiflik veren izolatlarda KKA yönteminin de duyarlılığının yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda ise mikropalak yönteminde saptanan biyofilm oluşum düzeyleri ile KKA yönteminin biyofilm pozitifliğini yakalaması/göstermesi arasında bir korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir^{22,24,25}. Bu uyumsuzluğun KKA yönteminin duyarlılığının genel olarak düşük olması nedeniyle izlendiği belirtilmiştir.

KNS'lerin izole edildikleri bölgelere göre her iki yöntemin biyofilm oluşumunu gösterme oranları karşılaştırıldığında, KİKDE etkenleri, kan kültüründe kontaminant olarak izole edilenler ve kateter kolonizanları için mikropalak yönteminin daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Kandan ve araç ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen etkenlerin ve genel olarak invaziv izolatların, kolonizan ya da kommensal izolatlarla göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğunu saptayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır^{20,21,27}. Kolonize olan araç, lokalize ve jeneralize enfeksiyonların odak noktası olabileceğinden büyük bir risk oluşturmaktadır. Aracın intraluminal kolonizasyonunun kan dolaşımı enfeksiyonlarına yol açan mikroorganizmaların göçü için ana kaynak olduğu da bildirilmektedir²⁷.

Çalışmamızda her iki yöntem ile de KNS türleri arasında herhangi bir türün diğerine göre daha fazla ya da az biyofilm oluşturduğu yönünde istatistiksel olarak anlamlı bir veri elde edilememiştir. Abdel Halim ve arkadaşları¹⁹ KNS izolatlarında en yüksek biyofilm oluşum oranını *S.hemolyticus*'larda (%57.7) saptamıştır. Hashem ve arkadaşlarının²⁸ çalışmasında ise *S.epidermidis* izolatlarının (%55'ini) en yüksek biyofilm oluşum oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar arasında saptanan farklılıkların, kullanılan izolat sayısı, tür dağılımı ya da izole edilen bölgelerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, biyofilm oluşturmuş formların planktonik formlara göre vankomisine daha az duyarlı olduğu saptanmıştır. Literatürde de çok yüksek vankomisin MBEK değerleri saptanmış, vankomisin ve çeşitli antimikrobiyal ilaçların duyarlılığının biyofilm oluşturmuş formlarda daha az olduğunu belirten çalışmalara rastlanmıştır^{3,4,29-32}. Çalışmamızda ayrıca zayıf biyofilm oluşturan izolatlarda MBEK/MİK oranları düşük iken, izolatların biyofilm oluşturma gücü arttıkça bu oranın da arttığı izlenmiştir. Başka çalışmalarla da desteklenen bu bulgu, biyofilm oluşturan bakterilerin büyüme hızının düşük olması, metabolizmalarının daha yavaş olması, biyofilm içinde direnç genlerinin transferini daha kolay yapabilmeleri ve biyofilm tabakasının kalınlığının artmasıyla antimikrobiyal ilaçların biyofilme nüfuz ederek mikroorganizmalara ulaşmasında karşılaşılan güçlüğü bağlanmıştır^{3,4,29}.

Birçok çalışma kateter ilişkili ve hastane enfeksiyonlarına neden olan stafilokoklarda biyofilm oluşumunun izolatların taşıdığı *ica* genleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir^{16,22,26,27,32-34}. Çalışmamızda KNS izolatlarında *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin pozitiflik oranları sırasıyla %25.9, %37 ve %50 olarak bulunmuştur. Her üç geni de taşıyan ve mikropalak yönteminde biyofilm oluşturmeyen izolat saptanmamış, bir diğer deyişle araştırılan üç geni birden taşıyan izolatların hepsinin mikropalak yöntemi ile biyofilm oluştur-

dukuları saptanmıştır. Satorres ve Alcaráz³² kan ve intravasküler kateterlerden izole edilen tüm stafilokokların %42.2'sinin *icaA* ve *icaD* genleri taşıdığını, Cafiso ve arkadaşları²⁷ kateterle ilişkili ve diğer hastane kaynaklı *S.epidermidis* izolatlarının %45'inde *ica*-operon tanımlandığını bildirmiştir.

Çalışmamızda KKA besiyerinde biyofilm oluşturan altı KNS izolatında araştırılan genlerden hiçbiri saptanmamıştır. On KNS [*S.epidermidis* (n= 5), *S.hominis* (n= 3), *S.haemolyticus* (n= 1) ve *S.capitis* (n= 1)] izolatında da yine biyofilm ilişkili genlerden herhangi biri saptanmamasına rağmen, mikropalak yöntemi ile biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Liberto ve arkadaşlarının³³ çalışmasında KKA'da PIA oluşumu ile biyofilm genlerinin (*icaA* ve *icaD*) varlığının uyum oranı %79.3 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada; genlerin en az birini taşıyan ve biyofilm oluşturmeyen izolat tespit edilememiştir. Kord ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında ise *icaA* ve *icaD* genleri izolatların sırasıyla %100 ve %95.1'inde saptanmıştır. Bu çalışmada, izolatların %4.8'inde biyofilm oluşumu mikropalak yöntemi ile gösterilmiş olmasına rağmen *icaAD* genleri saptanmamıştır. Başka bir çalışmada intravasküler kateter ve kan kültürlerinden elde edilen 50 stafilokok biyofilm oluşumu açısından değerlendirilmiş; *icaAD* negatif olan 15 (%30) izolatın KKA besiyeri, 18 (%36) izolatın mikropalak yöntemi ile biyofilm oluşumu gösterilmiştir²². KNS izolatlarında çeşitli biyofilm genlerinin (*icaAB*, *aap*, *atLE*, *fbe*, *bhp*, ve *embp*) araştırıldığı bir çalışmada; kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların %52.9'unun, orta kuvvette biyofilm oluşturan izolatların ise %58.3'ünün ya tekli ya da çoklu biyofilmle ilişkili genlere sahip olduğu saptanmıştır³⁴. Protez eklem enfeksiyonlarından elde edilen *S.epidermidis* izolatlarının biyofilm özelliklerinin incelendiği bir başka çalışmada ise, IS256, kommensal olan izolatlarda daha az tespit edilmiş ve invazivlik kapasitesini göstermesi açısından *ica* operonundan daha iyi bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır⁷. *S.aureus* izolatlarında biyofilm oluşumunun araştırıldığı bir çalışmada bazı izolatlarda *ica* genleri saptanmadığı halde KKA yöntemi ile PIA oluşumu gözlenmesinin, yöntemin subjektif yorumlamasına veya *ica* gen regülasyonuna bağlı olabileceği belirtilmiştir³⁵. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde *ica* genleri en sık araştırılan genler olmakla birlikte, çalışma verilerimiz yukarıda sunulan araştırmalarla da desteklendiği üzere, daha iyi bir değerlendirme için biyofilm oluşumuna katkı sağlayan diğer genlerin de araştırılmasının gerektiği sonucunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda PFGE ile aynı hastanın kateterinden ve periferik kan dolaşımından alınan örneklerden elde edilen izolatların aynı epidemiyolojik özellikte olduğu saptanmış ve KİKDE tanısı moleküler yöntemle de doğrulanmıştır. Kateter üzerinde kolaylıkla yerleşebilecek olan KNS izolatlarının, KİKDE'ye yol açması ve oluşturduğu biyofilm yapısı nedeniyle KİKDE tedavisini zorlaştıracığı düşünüldüğünde durumun önemi ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte farklı hastaların KİKDE etkenleri arasında epidemiyolojik benzerliğe rastlanmamıştır. İzolatlarımız salgın izolatları olmadığı için, baskın bir klona rastlanmamış ve bu veri beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunda rol alan genler (*icaA*, *icaD* ve IS256) ile PFGE paternleri birlikte değerlendirildiğinde, epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlarda da gen pozitifliği saptandığı görülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda tek başına hiçbir yöntemin biyofilm oluşumunu göstermede yeterli olmadığı belirlenmiştir. Moleküler olarak *icaAD* ve *IS256* geninin varlığı ile in vitro biyofilm oluşumu her zaman uyumlu değildir. Bu genlerin yokluğunda bazı izolatların biyofilm oluşturma yeteneği için *ica* operonundan bağımsız biyofilm oluşum mekanizmalarının araştırılmasına ya da daha fazla genin araştırılmasını içeren yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Fenotipik yöntemler karşılaştırıldığında, mikropalak yönteminin KKA besiyerine göre daha fazla sayıda izolatta biyofilm oluşumunu göstermesi ve biyofilmin derecesi hakkında bilgi vermesi nedeniyle, iyi bir seçenek olduğu düşünülmüştür. Araç ilişkili enfeksiyonlarda biyofilm oluşum oranlarının ve biyofilm oluşturan izolatların da antimikrobiyal direnç oranlarının yüksekliği göz önüne alındığında, tedaviyi yönlendirmesi açısından sadece MİK ile verilen duyarlılık sonuçlarının yeterli olmayabileceği ve MBK konsantrasyonlarının saptanmasına ihtiyaç olduğu görülmüştür.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 24.12.2012 ve Karar No: 21-680-12).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? Clin Microbiol Infect 2019; 25(9): 1071-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>
2. Chaves F, Garnacho-Montero J, Del Pozo JL, Bouza E, Capdevila JA, de Cueto M, et al. Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and (SEIMC) and the Spanish Society of Spanish Society of Intensive and Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC). Medicina Intensiva 2018; 42(1): 5-36. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2017.09.012>
3. Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, Pinto CC, Freitas AL, Macedo AJ. 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. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000100008>
4. 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. <https://doi.org/10.3390/ijms17091423>
5. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E. et al. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. Clin Microbiol Rev 2018; 31(3): e00084-16. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>
6. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA-biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J 2020; 18: 3324-34. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>
7. Koskela A, Nilsson-Augustinsson A, Persson L, Söderquist B. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence *IS256* among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009;28(6):655-60. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0664-6>
8. 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. <https://doi.org/10.1056/NEJM197706092962301>

9. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP. et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 49(1): 1-45. <https://doi.org/10.1086/599376>
10. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, CLSI Document M100-S25, 2015, Wayne, USA
11. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1768-72. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.7.1768-1772.1994>
12. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42(8): 872-4. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
13. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115(8): 891-9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
14. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol* 2010; 33(2): 137-45.
15. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003; 92(1-2): 179-85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00360-7)
16. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Ravaoli S, Otto M, Arciola CR. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(3): 813-8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31399>
17. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, et al. Canadian Committee for the standardization of molecular methods. 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3481-3485.2001>
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-39. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
19. Abdel Halim RM, Kassem NN, Mahmoud BS. Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Maced J Med Sci* 2018; 6(8): 1335-41. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.246>
20. Hashem AA, Abd El Fadeal NM, Shehata AS. In vitro activities of vancomycin and linezolid against biofilm-producing methicillin-resistant staphylococci species isolated from catheter-related bloodstream infections from an Egyptian tertiary hospital. *J Med Microbiol*. 2017; 66(6): 744-52. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000490>
21. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods* 2009; 76(1): 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.09.017>
22. Nasr R, AbuShady H, Hussein S. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egy J Med Hum Gen* 2012; (13): 269-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.04.007>
23. Sharvari S, Chitra P. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates of staphylococci. *Int J Pharm Bio Sci* 2012; 3(4): 724-33.
24. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(4): 305-11. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70197-0](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70197-0)
25. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol* 2006; 24(1): 25-9. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02466-X](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02466-X)

26. Kord M, Ardebili A, Jamalana M, Jahanbakhsh R, Behnampour N, Ghaemi EA. Evaluation of biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong Public Health Res Perspect* 2018; 9(4): 160-6. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.4.04>
27. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(12):1081-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01024.x>
28. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 167-93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
29. Erdoğan SF, Konak S. Bazı antibiyotiklerin biyofilm oluşturan stafilokok izolatları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology* 2020; 10(2): 838-45.
30. Kuyucuklu G, Kaynak Onurdağ F, Eryıldız C. Stafilokok izolatlarında antibiyotiklerin antibiyofilm etkinliği üzerine N-asetilsisteinin etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2021; 55(2): 125-45. <https://doi.org/10.5578/mb.20219902>
31. Bilman Bayındır F, Can F, Kaya M, Yazıcı AC. Kateter ile ilişkili hastane enfeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli stafilokoklarda biyofilm ile ilişkili antibiyotik duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 401-16.
32. Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health* 2007; 15(2): 87-90 <https://doi.org/10.21101/cejph.a3396>
33. Liberto MC, Matera G, Quirino A, Lamberti AG, Capicotto R, Puccio R, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. *Microbiol Res* 2009; 164(5): 522-8. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.04.004>
34. Soumya KR, Philip S, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Virulence factors associated with coagulase negative staphylococci isolated from human infections. *3 Biotech*. 2017; 7(2): 140. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0753-2>
35. Hortaç İftar E, Alışkan HE, Başustaoğlu A. Metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(2): 223-34. <https://doi.org/10.5578/mb.69204>