

Nöraminidazın Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Biyofilm Oluşumu, Bakteri Adheransı ve Antibiyotik Direncine Etkisinin Araştırılması: İn Vitro Çalışma[§]

Ş. Barçın ÖZTÜRK, Serhan SAKARYA

Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda nöraminidaz kullanılarak siyalik asitin uzaklaştırılmasının koagülaz negatif stafilokoklarda biyofilm oluşumu, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 63 adet koagülaz negatif stafilokok izolatu kullanıldı. Bakterilerin slime üretimi, Christensen yöntemi (kalitatif tüp yöntemi) ve kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı. Nöraminidazın, slime oluşumuna ve antibiyotik direncine etkisinin görülmesi amacı ile bakteriler, tek başına nöraminidaz ve artan dilüsyonlarda antibiyotik-nöraminidaz karışımı ile birlikte 96 kuyucuklu U tabanlı polistiren plaklara ekildi. Slime oluşumunun izlenmesi için plaklar kristal viyole ile boyanarak 570 nm’de, antibiyotik direnci için 625 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Koagülaz negatif stafilokok izolatlarında, slime pozitif bakterilerin slime negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığının saptanmasına karşın, nöraminidazın slime faktör oluşturan ve oluşturmayan suşların, adherans ve çoğalmasına hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Nöraminidazın slime faktör oluşumuna etkisi incelendiğinde, slime pozitif suşlarda nöraminidazın slime oluşumunu anlamlı olarak azalttığı izlenmiştir. Aynı şekilde nöraminidazın artan doz siprofloksasin ile birlikte uygulandığında, tek başına siprofloksasine göre slime oluşumunu daha fazla azalttığı saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızın, antibiyotiklerin biyofilme etkinliğini arttırmada nöraminidazın rolüne dikkat çekmesi bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, koagülaz negatif stafilokok, nöraminidaz

SUMMARY

The Investigation of the Effect of Neuraminidase on Biofilm Formation, Bacterial Adherence and Antibiotic Resistance of Coagulase-Negative Staphylococcus Strains: An In-Vitro Study

Objective: We investigated the effect of removing sialic acid from slime by using neuraminidase on bacterial adherence and antibiotic resistance in coagulase negative staphylococcus strains in our study.

Material and Method: Sixty-three coagulase negative staphylococci strains isolated from various clinical specimens were used in this study. Slime production of the bacteria was investigated by Christensen method (qualitative tube method) and quantitative microdilution plate method. In order to determine neuraminidase effect on slime formation and antibiotic resistance, bacteria were cultured with neuraminidase only and with increasing dilutions of antibiotic-neuraminidase mixtures, and incubated on 96- well polystyrene plates with U bottom. For observation of slime formation, plates were stained with crystal violet and examined spectrophotometrically at 570 nm and for antibiotic resistance directly at 625 nm.

Results: Adherence of slime-forming coagulase negative staphylococci was greater than non-slime forming bacteria. However, neuraminidase did not affect bacterial adherence and growth in both of the groups. Considering the effect of neuraminidase on slime formation, it was observed that neuraminidase reduced slime formation significantly on slime positive strains. Treatment of bacteria with neuraminidase and increasing doses of ciprofloxacin decreased the slime formation more than ciprofloxacin alone in coagulase negative staphylococci.

Conclusion: We believe that our study is important in that it emphasized the role of neuraminidase in increasing the effectiveness of antibiotics on biofilm formation.

Key words: Biofilm, coagulase negative staphylococci, Neuraminidase

Alındığı tarih: 20.06.2016

Kabul tarihi: 18.07.2016

Yazışma adresi: Ş. Barçın Öztürk, Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 09010 Aydın

Tel: 0 256 444 12 56 / 2811 **Faks:** 0 256 214 64 95

e-posta: barcinozturk@yahoo.com

[§] Bu çalışma XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi’nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Günümüzde hasta popülasyonundaki köklü değişimler (prematüre bebekler, multimorbid, kronik hastalığı olan, immün sistemi baskılanmış hastalar, yaşlılar) ve yabancı cisimlerin artan kullanımı, cilt ve mukoza flora bakterilerinden biri olan koagülaz negatif stafilokokların (KNS) neden olduğu enfeksiyonların büyük ölçüde tanınmasına yol açmıştır⁽¹⁾. Bu durum, belirli hasta gruplarında yapılan çok sayıda klinik çalışma ile doğrulanmıştır. Yedi yıllık bir sürenin sonunda, ABD çapındaki Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance (SCOPE) veritabanı içinde kaydedilen nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarındaki en yaygın izolatlar KNS (%31) ve bunu takiben de *Staphylococcus aureus* (%20) olmuştur⁽²⁾. International Collaboration on Endocarditis veri tabanından elde edilen bulgular, protez kapak endokarditlerinde kalp yetmezliği ile karşılaşılma sıklığının KNS (%54) ile *S. aureus* (%33) ya da viridans grubu streptokoklara (%32) oranla anlamlı olarak daha fazla olduğunu gösterdi⁽³⁾. KNS'lerin etken olduğu yabancı cisim ile ilişkili enfeksiyonların patogeneğinde, polimer yüzeye kolonizasyonu sonrası çok katmanlı bir biyofilm (slime faktör) oluşumunun önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir⁽⁴⁻⁶⁾.

Biyofilmler, mikroorganizmaların bir yüzey ya da ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanmak suretiyle oluşturduğu matris yapısıdır. Hücrelerin gömülü olduğu bu yapı nonsellüler ve abiyotik komponentleri de içermesinin yanı sıra planktonik organizmaların yapamadığı büyüme oranlarını değiştirme ve gen transkripsiyonu gibi özelliklere de sahiptir⁽⁷⁾. Bakteriler, konak savunması ve antibiyotiklere direnç, yaşam için gerekli ortam oluşturabilme, adhezyon ve kolonizasyon sağlama gibi amaçlarla biyofilm oluştururlar. Biyofilm oluşumu, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, viridans

streptokoklar, enterokoklar, aktinomiçesler, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella* spp. ve *Candida* spp. gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir⁽⁸⁾. Bakteriyel endokarditten, kistik fibrozise, otitis mediadan, yabancı cisim enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonlarına kadar birçok enfeksiyonun gelişiminden biyofilmlerin sorumlu olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir⁽⁹⁻¹¹⁾.

Biyofilmler mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilme yeteneği kazanabilirler⁽⁸⁾. Fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarına bakıldığında, biyofilmin hâlen tam tanımlanamamış olan karbonhidrattan zengin yapısının bu fonksiyonlarda en olası anahtar yapı olduğu düşünülmektedir. Karbonhidratların bilinen işlevleri göz önünde bulundurulduğunda, siyalik asidin en fonksiyonel molekül olabileceği düşünülmektedir⁽¹²⁾. Siyalik asit, hücre membranını ve glikoproteinlerin yapısal stabilizasyonunu sağlayan, hücreler arası etkileşim ve hücrelerin birbirini tanımada yardımcı rol oynayan ve membran reseptör moleküllerinin fonksiyonlarını düzenleyen bir aminoşekerdir. Hücre membranındaki dış siyalik asit birimleri negatif yüklü olup, hücrenin yüzey elektrik yükünü sağlamaktadır. Siyalik asit ayrıca hücrede adheransı ve deformabiliteyi düzenleyici rol oynamaktadır⁽¹³⁾. Siyalik asidin hücre yüzeyindeki durumu, nöraminidaz (memelilerde siyalidaz olarak adlandırılır) ve siyalotranferaz tarafından kontrol edilir. Nöraminidaz, siyalik asiti hücre yüzeyinden uzaklaştırırken, siyalotranferazlar ise siyalik asitin hücre yüzeyindeki glukokonjugatlara yine yerleştirilmesini sağlar⁽¹⁴⁾.

Bu çalışma siyalik asitin bakteri adheransındaki öneminden yola çıkarak bu konuda yapılacak çalışmaların birçok ciddi enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisinde hedef molekül olabileceği

tezine dayanılarak yapılmıştır. Çalışmada nöraminidaz kullanılarak siyalik asitin uzaklaştırılmasının koagülaz negatif stafilokoklarda biyofilm oluşumu, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 63 adet KNS izolatu kullanıldı. Klinik örneklerin idantifikasyonu Gram boyama, katalaz reaksiyonu ve tüp koagülaz testi ile yapıldı.

Slime faktörün belirlenmesinde standart tüp yöntemi ve kantitatif mikroplak test yöntemi kullanıldı. Standart tüp yöntemi ile slime varlığının saptanması Christensen ve ark.'nın⁽⁶⁾ belirlediği şekilde yapıldı⁽¹⁵⁾. Yüzde 0.25 glikoz içeren triptic soy broth (TSB) (Oxoid) sıvı besiyerinde 35.5°C'de bir gece inkübe edilen KNS suşları, 1/40 oranında % 0.25 glukoz içeren TSB sıvı besiyeri ile dilüe edilerek 35.5°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra test tüpünün içeriği boşaltıldı ve iki kez yıkandı. Tüpler ters çevrilerek havada kurutulduktan sonra, %0.25'lik saf ranin boyası (Sigma) konularak 2 dakika süre ile beklendi. Tüp içeriği boşaltılıp 2 kez nazikçe yıkandıktan sonra ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bekletildi. Tüpün iç çeperinde görülür ince film tabakası, slime faktör oluşumu yönünde değerlendirildi. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar (+), (++) , (+++) olarak değerlendirildi. Sıvı ile hava birleşim yerinde halka oluşumu, slime faktör oluşumunun göstergesi olarak kabul edilmedi.

Kantitatif mikrodilüsyon plak yönteminde ise izolatların inkübasyonu farklı olarak 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plaklarda 200 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde yapıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl %1 kristal viyole eklenerek 15 dk. boyanması için beklen-

dikten sonra içerik boşaltıldı ve iki kez yıkanaarak kuyucuklar içinde kalan kristal viyole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanolaseton (80/20) ile çözdürüldü. Beş yüz doksan beş nm dalga boyunda mikroplak okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okunarak optik dansitesi ≥1 olan izolatların slime faktör oluşturduğu kabul edildi⁽¹⁶⁾.

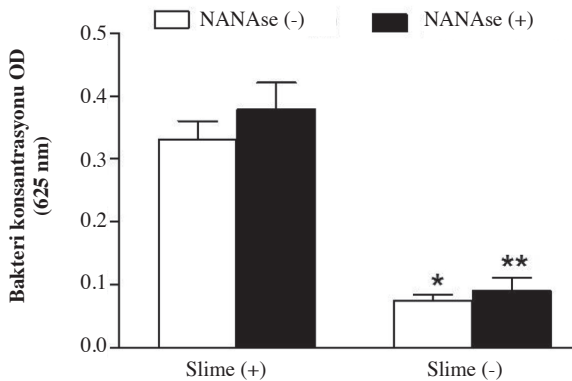
KNS'larda Nöraminidazın Slime Faktör Oluşumuna, Adheransa ve Antibiyotik Direncine Etkisinin Araştırılması

Bakterinin nöraminidaz ile birlikte inkübasyonunun adheransa, slime faktör oluşumuna ve antibiyotik direncine etkisinin görülmesi amacıyla 6 adet slime-pozitif ve 6 adet slime-negatif Bakteri süspansiyonu spektrofotometrik olarak 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlandı. Antibiyotik olarak seçilen siprofloksasin, 32 - 16 - 8 - 4 - 2 - 1 - 0.5 - 0 µg/ml son dilüsyonları olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada *Clostridium perfringens*'ten izole edilmiş nöraminidaz (NANase) (Sigma) kullanıldı. Nöraminidaz son konsantrasyonu 100 IU/ml olarak belirlendi. Bundan sonra bakteriler iki grup olarak çalışıldı.

I. Grup: Doksan altı kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa her bakteri için 100 µl bakteri süspansiyonu ve 100 µl antibiyotik dilüsyonu + NANase olacak şekilde ekim yapıldı. Başka bir plak ise 100 µl antibiyotik dilüsyonu ve 100 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde hazırlandı. 35.5°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okunarak üreme üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, %1'lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kuru-

tulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 570 nm dalga boyunda mikro ELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okunarak slime faktör oluşumu üzerine etki tespit edildi.

II. Grup: Doksan altı kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa altı sıralık iki grup olarak her bakteri süspansiyonundan 200 µl ekildi. 35.5°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okutuldu. Plak içerikleri boşaltılarak planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla plaklar iki kez nazikçe yıkandı. Plağın bir yarısında 200 µl antibiyotik dilüsyonu + NANase, diğer yarısına 200 µl antibiyotik dilüsyonu olacak şekilde ekim yapıldı. 35.5°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra yine 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okunarak bakteri adheransı üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, %1’lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi.



Şekil 1. Nöraminidazın slime oluşturma özelliklerine göre bakteri adherans ve çoğalmasına etkisi.

Slime oluşturma özelliklerine göre KNS lerin bakteri adheransı ve çoğalmasına NANase’in etkisi karşılaştırıldığında; NANase içermeyen (beyaz bar) ve NANase (100 mU/ml) (siyah bar) ile muamele edilmiş gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edilmezken, slime pozitif KNS lerin polistren mikropklara yapışma ve çoğalmasının daha fazla olduğu saptanmıştır (, **: p<0.0001).*

Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 570 nm dalga boyunda mikro ELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiskan Spectro) okunarak slime faktör oluşumu üzerine etki tespit edildi.

İstatistiksel İnceleme

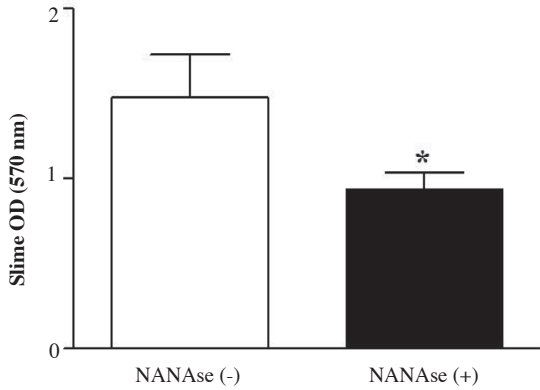
Çalışmada nöraminidazın slime faktör oluşumu ve bakteri çoğalmasına etkisi için, GraphPad (Prism) versiyon 2.01 bilgisayar programı ile One-Way ANOVA yöntemi kullanılarak istatistiksel karşılaştırma yapıldı. İstatistiksel analiz için $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR

Koagülaz negatif stafilokok suşlarının slime faktör oluşturma özelliklerine göre adherans ve çoğalması incelendiğinde, slime pozitif bakterilerin slime negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığının saptanmasına ($p < 0.0001$) karşın, nöraminidazın slime faktör oluşturan ve oluşturmeyen KNS’lerin adherans ve çoğalmasına hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 1).

Nöraminidazın slime faktör oluşumuna etkisi incelendiğinde, slime pozitif KNS suşlarında nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı saptanmış ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.03$) (Şekil 2).

Slime pozitif KNS’larda artan doz siprofloksasin ve nöraminidaz kombinasyonu ile yalnızca artan doz siprofloksasin uygulaması karşılaştırıldığında, nöraminidazın artan doz siprofloksasin ile birlikte uygulandığında slime oluşumunun azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 3).



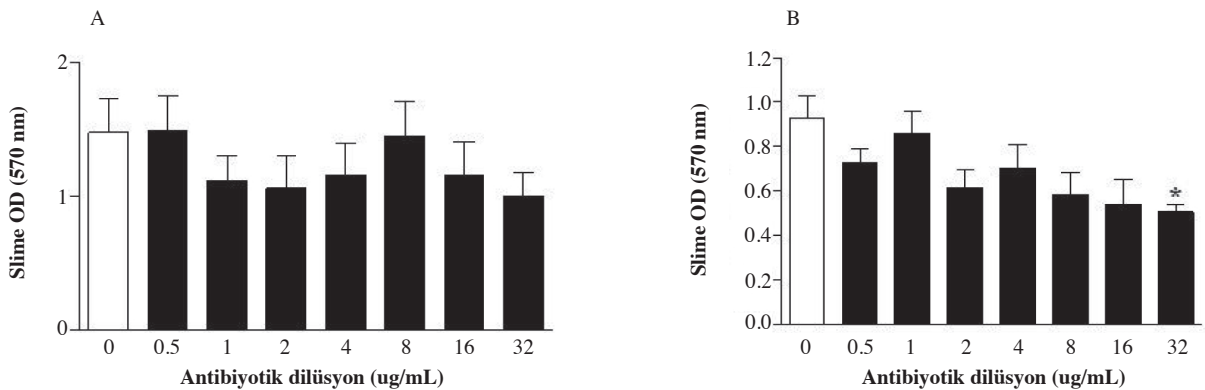
Şekil 2. Slime pozitif KNS lerde NANase in slime oluşumuna etkisi.

*, iki grup karşılaştırıldığında NANase in slime oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını belirtmektedir ($p < 0.03$)

TARTIŞMA

Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik enfeksiyonlara kadar çok geniş bir yelpazede enfeksiyon patogeneğinde rol oynamaktadırlar. Biyofilmlerin öneminin anlaşılması ile son 30 yıldır bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalar arasında biyofilm oluşumunu belirleyen genetik modülasyonlar kadar, biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmeye ve biyofilmi eradike etmeye yönelik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri ile adherans yetenekleri arasındaki ilişki, özellikle stafilokoklarla yapılan çalışmalarda pek çok kez gösterilmiştir⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Harris ve ark.⁽²⁰⁾

98 *S. epidermidis* izolatında konfokal lazer mikroskobu (CLSM) ile adherans ve biyofilm oluşturma özelliğini in vitro olarak göstermiştir. Christensen ve ark.⁽⁶⁾ intravasküler kateter ile ilişkili sepsis olgularından elde ettikleri *S. epidermidis* izolatlarında yaptıkları çalışmada, transmisyon ve elektron mikroskobu ile slime pozitif suşların kateter yüzeyine adhezyonunu gösterirken, slime negatif suşlarda adhezyon saptamamışlardır. Aguilar ve ark.⁽²¹⁾, inek ve koyunlardaki mastit olgularından izole edilen *S. aureus* suşlarında slime oluşumunun adherans ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, adheransın slime oluşturan suşlarda arttığını tespit etmişlerdir. Son zamanlarda atomik “force” mikroskobu (AFM), hücre adhezyonu ve biyofilm oluşumunda rol oynayan kuvvetleri belirlemeye yönelik çalışmalarda yeni bir yol açmıştır⁽²²⁾. Merghni ve ark.⁽²³⁾ *S. aureus*’un ortodontik materyaller ve biyotik yüzeylere adherans ve biyofilm oluşturma özelliğini araştırdıkları çalışmalarında, suşların %70.6’sının biyofilm oluşturduğunu, tüm suşların HeLa hücrelerine ve polistren yüzeylere adhere olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar biyofilmi göstermede AFM kullanmışlardır. Çalışmamızda da, her iki grup bakteride, slime pozitif bakterilerin slime negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığı ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Ancak her iki grupta da nöra-



Şekil 3. Slime pozitif KNS lerde (A) artan doz siprofloksasinin, (B) NANase ve artan doz siprofloksasinin slime oluşumuna etkisi.

*, kontrol grubu (beyaz bar) ile karşılaştırıldığında slime oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını belirtmektedir ($p < 0.05$)

minidazın, bakterilerin adherans ve çoğalmasına herhangi bir etki göstermediği saptandı.

Siyalik asitin biyofilm yapısındaki bulunduğunu gösteren çok az sayıda çalışma vardır⁽¹²⁾. Parker ve ark.⁽²⁴⁾, *Streptococcus pneumoniae*'da N-asetil nöraminik asit'in, yüksek konsantrasyonda nöraminidaz bağlanma bölgesini işgal ederek biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuca dayanarak nöraminidaz etkisi ile solunum epitelinden serbestleşen siyalik asit rezidülerinin *S. pneumoniae* biyofilminin oluşumunu sağladığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde Trapetti ve ark.⁽²⁵⁾, siyalik asitin *S. pneumoniae*'da nazofarinks yüzeyine adheransı ve biyofilm oluşumunu arttırdığını ve nöraminidaz genlerinin sunumunu indüklediğini göstermişlerdir. Buna karşılık Takao ve ark.⁽²⁶⁾, nöraminidaz aktivitesindeki artışın *Streptococcus intermedius*'da 1 mg/ml müsin içeren kültür ortamında 72 saatte biyofilm aktivitesini azalttığını göstermiştir. Saçar ve ark.⁽²⁷⁾, greft modelinde slime negatif *S. aureus*'un grefte adheransında NANase içeren ve içermeyen gruplar arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Buna karşılık slime pozitif *S. aureus* adheransında NANase içeren grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma bildirmişlerdir. Çalışmamızda yüzey siyalik asiti uzaklaştırmak amacıyla kullandığımız nöraminidazın, KNS suşlarında slime oluşumunu azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptadık. Bu veriler ışığında nöraminidazın biyofilm oluşumundaki rolü açısından yapılacak çalışmaların yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli olduğu açıktır.

Antimikrobiyal ajanların, biyofilm gelişimine ve bakteri adheransına etkinliğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Öztürk ve ark.⁽²⁸⁾ güçlü biyofilm oluşturan 46 MRSA suşunun 37'sinde moksifloksasin ile biyofilm üretiminin azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, rifampisin 44 izolatta biyofilm oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Reid ve ark.⁽²⁹⁾ oral siprofloksasin ve

ofloksasin verilen üriner kateterli hastalarda biyofilm gelişimini inceledikleri çalışmada, ortalama bir haftalık izlem sonucunda hiçbir kateterde biyofilm saptamamışlardır. Saini ve ark.⁽³⁰⁾ üriner kateter kaynaklı *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumunun azitromisin ile %84 oranında, siprofloksasin ile %72 oranında azalırken, bu iki antibiyotik kombinasyonu ile %92 oranında azaldığını göstermişlerdir. Biz çalışmamızda, nöraminidazın slime oluşumunu azaltmasından yola çıkarak antibiyotik ile birlikte uygulandığında bakterinin antibiyotik duyarlılığına ve adheransa etkisini araştırdık. Florokinolonlar yüksek düzeyde penetrasyonları nedeniyle kemik ve ekleme ait enfeksiyonlarda tercih edilen ajanlardır. Özellikle gram pozitif kokların etken olduğu yabancı cisim enfeksiyonlarında rifampisin ile kombine olarak kullanımının etkinliği bilinmektedir⁽³¹⁻³³⁾. Florokinolonların gram negatif bakterilerde polisakkarid kapsül oluşumunu, biyofilm gelişimini ve adheransı azalttığı gösterilmiştir^(30,34). Buna karşılık koagülaz negatif stafilokokların biyofilm üretimini azalttığı yönünde sınırlı sayıda yayın mevcuttur ve bunlar adherans üzerine olan etkiyi ölçmemektedir⁽³⁵⁻³⁷⁾. Pérez-Giraldo ve ark.⁽³⁸⁾ siprofloksasin ve moksifloksasinin *S. epidermidis* ATCC 45984 biyofilmine etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, moksifloksasinin biyofilm etkinliğinin siprofloksasinden daha iyi olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, araştırmacılar, moksifloksasinin x100 MIC konsantrasyonunda >%90 biyofilm inhibisyonu sağladığını, ancak tamamen ortadan kaldırmadığını belirtmişlerdir. Rupp ve ark.'nın⁽³⁹⁾ slime pozitif *S. epidermidis* suşları ile yaptıkları çalışmada ise, mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile vankomisin, sefazolin, ofloksasin, L-ofloksasin ve D-ofloksasin'in biyofilm oluşumu ve adheransa etkileri incelenmişler ve adheransa etkili olmadıklarını saptanmıştır. Yassein ve ark.⁽⁴⁰⁾ *S. epidermidis*'de florokinolonların biyofilm miktarında anlamlı ölçüde azalma sağladığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, florokinolonların subinhibitör kon-

santrasyonlarının biyofilm oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Fidan ve ark.⁽⁴¹⁾ biyofilm oluşturan 30 KNS suşunun 25'inde siprofloksasin uygulanmadan önce belirlenen optik dansitesiyle kıyaslandığında, biyofilm tabakasının optik dansitesinde anlamlı bir azalma saptamışlardır. Çalışmamızda, koagülaz negatif stafilokok suşlarında nöraminidaz ile birlikte artan doz siprofloksasin kullanıldı ve slime oluşumunun azaldığı görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Buna karşılık bakteri adheransına hiçbir etkisi görülmedi.

Sonuç olarak, koagülaz negatif stafilokoklarda biyofilm oluşumu ve adherans arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma mevcuttur. Buna karşılık gerek slime yapısındaki siyalik asitin varlığı ve nöraminidazın etkilerini, gerekse flo-rokinolonların koagülaz negatif stafilokokların biyofilm gelişimine etkisini gösterir çok az sayıda çalışma vardır. Çalışmamızın, antibiyotiklerin biyofilme etkinliğini arttırmada nöraminidazın rolüne dikkat çekmesi bakımından önemli olduğu düşüncesindeyiz. Biyofilm enfeksiyonlarının tedavilerindeki güçlükler düşünüldüğünde bu konuda yapılacak çalışmaların tedavi stratejilerinin gelişmesi açısından değeri açıkça görülmektedir.

Teşekkür

Yazarlar, çalışmanın deney aşamasındaki yardımından dolayı Burcu KURT MESTAV'a teşekkür eder.

Bu çalışma TPF-04004 proje numarası ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Fonu tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Becker K, Heilmann C, Peters G.** Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:870-926. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
2. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309-17. <http://dx.doi.org/10.1086/421946>
3. **Lalani T, Kanafani ZA, Chu VH, et al.** Prosthetic valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: findings from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:365-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0141-z>
4. **Peters G, Locci R, Pulverer G.** Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 1981; 173:293-9.
5. **Peters G, Locci R, Pulverer G.** Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982; 146:479-82. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/146.4.479>
6. **Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH.** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982; 37:318-26.
7. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-93. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
8. **Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB.** The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesion locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186:2449-56. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.8.2449-2456.2004>
9. **Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA.** A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003; 426:306-10. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02122>
10. **Stewart PS, Costerton JW.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
11. **Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P.** Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002; 70:6339-45. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.11.6339-6345.2002>
12. **Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA, Bakaletz LO.** Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* 2005; 73:3210-8. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.6.3210-3218.2005>
13. **Sillanauke P, Pönniö M, Jääskeläinen IP.** Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:413-25. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2362.1999.00485.x>

14. **Schauer R.** Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982; 40:131-234.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60109-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60109-2)
15. **Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA, Beachey EH.** Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983; 18:258-69.
16. **O'Toole GA, Kolter R.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998; 28:449-61.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
17. **Emaneini M, Khoramian B, Jabalameli F, Abani S, Dabiri H, Beigverdi R.** Comparison of virulence factors and capsular types of *Streptococcus agalactiae* isolated from human and bovine infections. *Microb Pathog* 2016; 91:1-4.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.016>
18. **Kloos WE, Bannerman TL.** Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:117-40.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.7.1.117>
19. **An YH, Friedman RJ.** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; 43:338-48.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199823\)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B)
20. **Harris LG, Murray S, Pascoe B, et al.** Biofilm morphotypes and population structure among *Staphylococcus epidermidis* from commensal and clinical samples. *PLoS One* 2016; 11:e0151240.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151240>
21. **Aguilar B, Amorena B, Iturralde M.** Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol* 2001; 78:183-91.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00287-](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00287-)
22. **Dufrêne YF.** Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface. *MBio* 2014; 5:e01363-14.
<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01363-14>
23. **Merghni A, Ben Nejma M, Dalle I, et al.** High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthodontic appliances. *Microb Pathog* 2016; 91:61-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.009>
24. **Parker D, Soong G, Planet P, Brower J, Ratner AJ, Prince A.** The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect Immun* 2009; 77:3722-30.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00228-09>
25. **Trappetti C, Kadioglu A, Carter M, et al.** Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J Infect Dis* 2009; 199:1497-505.
<http://dx.doi.org/10.1086/598483>
26. **Takao A, Nagamune H, Maeda N.** Sialidase of *Streptococcus intermedius*: a putative virulence factor modifying sugar chains. *Microbiol Immunol* 2010; 54:584-95.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00257.x>
27. **Saçar M, Önem G, Baltalarlı A, et al.** Neuraminidase produces a decrease of adherence of slime-forming *Staphylococcus aureus* to gelatin-impregnated polyester fiber graft fabric: an experimental study. *J Artif Organs* 2007; 10:177-80.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10047-007-0383-2>
28. **Öztürk İ, Yurtman AN, Eraç B, Gül-Yurtsever S, Ermertcan Ş, Hoşgör-Limoncu M.** In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratisl Lek Listy* 2014; 115:483-6.
29. **Reid G, Habash M, Vachon D, Denstedt J, Riddell J, Beheshti M.** Oral fluoroquinolone therapy results in drug adsorption on ureteral stents and prevention of biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17:317-9; discussion 9-20.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00353-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00353-8)
30. **Saini H, Chhibber S, Harjai K.** Azithromycin and ciprofloxacin: a possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45:359-67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.11.008>
31. **Rose WE, Poppens PT.** Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:485-8.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn513>
32. **Konig DP, Schierholz JM, Munnich U, Rutt J.** Treatment of staphylococcal implant infection with rifampicin-ciprofloxacin in stable implants. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121:297-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s004020000242>
33. **Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, et al.** In vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5717-20.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01236-13>
34. **Ahire JJ, Neveling DP, Hattings M, Dicks LM.** Ciprofloxacin-eluting nanofibers inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2015; 10:e0123648.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123648>
35. **Qu Y, Istivan TS, Daley AJ, Rouch DA, Deighton MA.** Comparison of various antimicrobial agents as catheter lock solutions: preference for ethanol in eradication of coagulase-negative staphylococcal biofilms. *J Med Microbiol* 2009; 58:442-50.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.006387-0>
36. **Finch RG, Edwards R, Filik R, Wilcox MH.** Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)

peritonitis: the effect of antibiotic on the adherence of coagulase-negative staphylococci to silicone rubber catheter material. *Perit Dial Int* 1989; 9:103-5.

37. **Wilcox MH, Finch RG, Smith DG, Williams P, Denyer SP.** Effects of carbon dioxide and sub-lethal levels of antibiotics on adherence of coagulase-negative staphylococci to polystyrene and silicone rubber. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27:577-87.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/27.5.577>
38. **Perez-Giraldo C, Gonzalez-Velasco C, Sanchez-Silos RM, Hurtado C, Blanco MT, Gomez-Garcia AC.** Moxifloxacin and biofilm production by coagulase-negative staphylococci. *Chemotherapy* 2004; 50: 101-4.
<http://dx.doi.org/10.1159/000077811>

39. **Rupp ME, Hamer KE.** Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:155-61.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/41.2.155>
40. **Yassien M, Khardori N.** Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40:79-89.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00253-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00253-X)
41. **Fidan I, Yüksel S, Çetin Gürelik F.** Koagülaz negatif stafilokok suşlarında biyofilm oluşumu ve siprofloksasinin biyofilm üzerine etkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35:149-52.