

Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Biyofilm Oluşumu ve Siprofloksasinin Biyofilm Üzerine Etkisi (*)

Işıl FIDAN (**), Sevgi YÜKSEL (**), Feryal ÇETİN GÜRELİK (**)

(*) XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (19-23 Eylül 2004, Kuşadası) sunulmuştur

(**) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), tıbbi aletlerle oluşan infeksiyonlarda sık olarak izole edilen mikroorganizmalardır. Çalışmamızda KNS'larda biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşumu ile siprofloksasin arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar siprofloksasinin biyofilm oluşumunu önlemede etkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Koagülaz negatif stafilokok (KNS), biyofilm, siprofloksasin

SUMMARY

Biofilm Production of Coagulase-negative Staphylococci and Effects of Ciprofloxacin on Biofilm Production.

Coagulase-negative staphylococci (CNS) are the most common causative agents of infections associated with medical devices. In this study we investigated biofilm production of CNS and interaction between biofilms and ciprofloxacin. Our results indicated that ciprofloxacin can be used to prevent biofilm formation.

Key words: Coagulase-negative staphylococci, biofilm, ciprofloxacin

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokokların (KNS), hastane infeksiyonu etkeni olarak her geçen gün önemleri artmaktadır. Kateter, yapay kalp kapakları ve plastik malzemelerin yaygın olarak kullanımı KNS'a bağlı hastane infeksiyonlarında önemli bir artışa neden olmuştur (1). Bu mikroorganizmanın etken olduğu infeksiyonlar, genellikle biyomateryaller üzerinde biyofilm tabakası oluşumuyla birliktedir (2). Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunması (adhere olmaları), çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleriyle oluşmaktadır (3). KNS'ların kateter yüzeylerine adhere olmaları ve biyofilm oluşturma yetenekleri, konak savunma mekanizmalarında ve antimikrobiyal maddelerin etkilerinde değişikliklere neden olmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler antimikrobiyal tedaviye, biyofilm oluşturmaya göre daha fazla direnç göstermektedirler (4). Bu nedenle biyofilm oluşturan mikroorganizmaların eradikasyonunda problemler yaşanmaktadır (5). Bu infeksiyonlar genellikle cihazın

çıkartılmasını gerekli kılmaktadır. Biyofilm oluşumunun engellenmesi veya oluşmuş biyofilmin eradike edilmesi, antimikrobiyal maddelerin penetrasyonunu arttırmaktadır. Bazı antimikrobiyal maddeler bakterilerin adherensini azaltmakta ve biyofilm oluşturmalarını engelleyebilmektedirler (6). Florokinolonların Gram negatif bakterilerde, polisakkarit kapsül formasyonunu, biyofilm oluşumunu ve adherensi azalttığı gösterilmiştir (7).

Bu çalışmada, KNS suşlarında biyofilm oluşumunun belirlenmesi, siprofloksasinin biyofilm oluşumunu engellemedeki rolü ve daha önceden oluşmuş biyofilmi eradike etmedeki etkinliğinin in vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50 adet KNS suşu incelenmiştir. Suşlar tüpte koagülaz yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Suşların 20'si kateter ucu, 10'u kan, 15'i yara, 5'i idrar örneğinden izole edilmiştir. Adezyon testi için Christensen tarafından tanımlanan kalitatif tüp metodu ve kantitasyon için spektrofotometrik mikroplyet yöntemi kullanılmıştır (1).

İletişim: Işıl Fidan

e-posta: isilfidan@yahoo.com

Tüp yönteminde, 5 ml triptikaz soy buyyon (TSB) içersine 1×10^5 cfu/ml bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra 37°C 'de 18-20 saat bekletilmiştir. Tüp içeriği boşaltılmış ve 1'er ml %25'lik safranin eklenip tüp içeriği uzaklaştırılmış ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip bekletilmiştir. Tüp yüzeyinde bir film tabakası oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Hava ile temas eden kısımda halka şeklinde tabaka oluşumu negatif sonuç olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik mikroplyt yönteminde, 1×10^5 cfu/ml bakteri süspansiyonundan 200'er ml düz tabanlı pleytlere dağıtılmıştır. Negatif kontrol olarak kuyucuklara TSB içeren besiyeri konulmuştur. 37°C 'de 18-20 saat bekletildikten sonra kuyucukların içeriği boşaltılmış, 4 kez PBS ile yıkanmış, %99'luk metanol ile fikse edilmiş ve kristal viole ile boyanmıştır. %33'lük glisial asetik asit eklenip, 570 nm'de spektrofotometride okunmuştur.

Deneyin ikinci kısmında, biyofilm oluşturan suşların siprofloksasine (Biofarma) duyarlılığı buyyonda mikrodilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Siprofloksasinin biyofilm oluşturan suşlarda, biyofilm tabakası oluşmadan önce etkinliğini belirlemek için, bakteri süspansiyonları mikroplyte kuyucuklarına konulmuş ve 2 MİK (minimal inhibitör konsantrasyon), MİK, 1/2 MİK, 1/4 MİK konsantrasyonlarda siprofloksasin kuyucuklara eklenmiştir. 37°C 'de 18-20 saat bekletilmiş, pleytler aspire edilmiş, yıkanmış, fikse edilip boyanmış ve optik dansiteleri spektrofotometride okunmuştur.

Deneyin son kısmında, daha önceden oluşturulmuş biyofilm tabakası üzerine siprofloksasinin etkisini belirlemek için, 1 gece önceden kuyucuklarda biyofilm tabakası oluşturulmuştur. Ertesi gün bu kuyucukların üzerine siprofloksasinin farklı konsantrasyonları (12.5 μg -400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eklenmiş, 37°C 'de 18-20 saat bekletilmiş, pleytler aspire edilmiş, yıkanmış ve fikse edilmiş, boyanarak spektrofotometride okunmuştur.

BULGULAR

İncelenen 50 KNS suşunun 30'unda (%60) tüp metodu ile biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Tüp yöntemiyle biyofilm oluşturduğu belirlenen suşların mikroplyt yöntemi ile belirlenen optik dansiteleri 0.095-1.2 arasında iken, tüp yöntemiyle biyofilm oluşturmadığı belirlenen suşların optik dansiteleri 0.05-0.08 arasında tespit edilmiştir.

Deneyin ikinci aşamasında, siprofloksasinin inhibitör ve subinhibitör konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Biyofilm oluşturan 30

suşun tamamında siprofloksasinin 2 MİK ve MİK değerlerinde spektrofotometrik olarak belirlenen optik dansite değerleri 0.08 değerinin altında bulunmuş ve biyofilm tabakası oluşumu tespit edilmemiştir. Siprofloksasinin subinhibitör konsantrasyonlarında (1/2 MİK, 1/4 MİK, 1/8 MİK değerlerinde) ise, biyofilm tabakasının optik dansitesinde siprofloksasin uygulanmadan önce tespit edilen optik dansite değeriyle kıyaslandığında anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Subinhibitör konsantrasyonlarda optik dansitede en belirgin azalma 1/2 MİK değerinde belirlenmiştir.

Deneyin son aşamasında, bir gece önce mikroplyt kuyucuklarının tabanında oluşturulmuş biyofilm tabakası üzerine siprofloksasinin farklı konsantrasyonlardaki (12.5-400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) etkisi incelenmiştir. Biyofilm oluşturan 30 suşun 25'inde siprofloksasin uygulanmadan önce belirlenen optik dansitesiyle kıyaslandığında, biyofilm tabakasının optik dansitesinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0.01$). 30 suşun 5'inde ise biyofilm tabakasının optik dansitesinde bir azalma belirlenmiş ama bu azalmanın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.01$).

TARTIŞMA

KNS'lar, kateter, kalp kapakçığı gibi tıbbi cihazların bulunduğu hastalarda sık olarak enfeksiyona neden olan etkenlerdir (2). Bu mikroorganizmalar yüzeye tutunduktan sonra, biyofilm oluşumuna neden olan hücre dışı slime oluşturarak, antimikrobiyal maddelerin penetre olmasını engelleyerek, biyosid ve dezenfektanlara da direnç oluşturarak bu enfeksiyonların güçlükle tedavi edilmelerine neden olurlar (8). Bu nedenle, çalışmalar kateter yüzeyine mikroorganizmanın yapışmasını önlemek amacıyla, kateterlerin gümüş, antiseptikler gibi maddelerle kaplanması üzerinde yoğunlaşmaktadır (3). Ancak kateterle ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde, biyofilm oluşumunu önleyecek veya uygulanan antimikrobiyal maddenin etkinliğini arttırmak için, oluşmuş biyofilm tabakasının çözülmesini sağlayacak uygun antimikrobiyal maddenin belirlenmesi de önem taşımaktadır.

Çalışmamızda KNS suşlarda biyofilm oluşumu %60 olarak tespit edilmiştir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada bu oran %43 olarak belirlenmiştir (9). Yassien ve ark. (5) ise bu oranı %50 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyonlardaki siprofloksasinin biyofilm tabakasının oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Siprofloksasinin subinhibitör konsantrasyonlarında, mikroplyt tabanında KNS'un

yapışmasını ve biyofilm oluşumunu anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Bu azaltıcı etkinin doza bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Subinhibitör konsantrasyonlarda en belirgin azalma 1/2 MİK değerinde belirlenmiştir. Yassien ve ark. da (5) siprofloksasinin subinhibitör konsantrasyonlarda biyofilm tabakasının optik dansitesinde anlamlı azalma sağladığını göstermişler ve florokinolonların kateter üzerinde oluşmuş biyofilmi eradike edebileceğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde yüksek konsantrasyonlarda (12.5-400 µmg/ml) siprofloksasinin daha önceden mikroplyet tabanında oluşturulan biyofilm tabakasının optik dansitesinde suşların 25'inde (%83) anlamlı olarak azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Bu etki aynı şekilde doza bağımlıydı ve yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olarak gözlenmiştir. Yani yüksek konsantrasyonlarda siprofloksasin biyofilm tabakasında düşük optik dansite değerleri oluşturmuştur.

Souli ve ark (10) kinolonların implant, kateter gibi tıbbi aletlere bağlı infeksiyonların tedavisinde kombine tedavilerde kullanılabilir bir güçlü bir antibiyotik olduğunu göstermişlerdir.

Presterl ve ark (11) moksifloksasinin yüksek konsantrasyonlarda biyofilm dansitesinde azalma sağladığını ve patogeneze biyofilm oluşumunun rol oynadığı düşünülen infeksiyonların tedavisinde kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışmamızda da gösterildiği gibi, siprofloksasinin prostetik kapak, kateter gibi yüzeylere KNS'ların yapışmasını ve biyofilm oluşmasını önlemede iyi bir seçenek olabilir. Böylece tıbbi aletlere üzerinde biyofilm oluşturan suşlarla oluşan infeksiyonlarda kullanılan antibakteriyel maddenin etkinliğini arttırmada siprofloksasinin iyi bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bakteri kolonizasyonunun engellenmesi için konulacak materyalin florokinolon gibi bir antimikrobiyal madde ile kaplanarak uygulanması biyofilm oluşumunu engelleyebilir. Bu bulguların klinik çalışmalarla da doğrulanması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Monzon M, Oteiza C, Leiva J, Amorena B: Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 48: 793 (2001).

2. Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn: Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 36: 139 (2000).

3. Beğendik F: İnfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojide biyofilm. *Flora* 8 : 271 (2003).

4. Yasuha H, Ajiki Y, Koga T, Yokota T: Interaction between Clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 138 (1994).

5. Yassien M, Khardori N: Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40: 79 (2001).

6. Rupp M, 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* 41: 155 (1998).

7. Held TK, Adamczik C, Trautmann M, Cross AS: Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39 : 1093 (1995).

8. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS: A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods* 54: 269 (2003).

9. Akyar I, Fidan I, Rota S, Türet S: Koagülaz negatif stafilokoklarda slime faktör yapımının üç farklı yöntemle araştırılması, tür tayini ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bült* 32: 15 (1998).

10. Souli M, Giamarellou H: Effects of slime produced by clinical isolated of Coagulase-Negative *Staphylococci* on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 939 (1998).

11. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W: Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 55: 45 (2005).

