

Kan ve El Kültüründen İzole Edilen Koagülaz-Negatif Stafilokok İzolatlarının Biyofilm Oluşumunun Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Kaplanmış Mikroplaklarda İncelenmesi: Deneysel Model

Biofilm Formation Research of Coagulase-Negative Staphylococci Isolates' Isolated from Blood and Hand Culture at Nanofilm Covered Micro Plaques by Plasma Polymerization Technique: An Experimental Model

Jülide Sedef GÖÇMEN¹, Elvan HORTAÇ İŞTAR², Dilek ÇÖKELİLER³, Mehmet MUTLU⁴, Gizem KALELİ CAN⁴, Sezin ALPARSLAN⁵, Ceren ÇETİN⁵, Naz KARTAL⁵, Uğur Can ÖZÇELİK⁵, Çağrı AYCAN⁵

¹ TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

⁴ TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

⁵ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Öğrenci Çalışma Grubu, Ankara, Türkiye

ÖZET

Giriş: Koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) biyolojik malzeme, medikal cihaz ve araçlar üzerinde üreyip biyofilm oluşturarak kendilerini antibiyotik etkilerinden koruyabilirler. Çeşitli yüzey modifikasyonları yardımıyla biyofilm oluşumunu etkilemek mümkündür. Çalışmamızda, bir yüzey modifikasyon tekniği olan plazma polimerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Plazma polimerizasyon tekniği, maddenin dördüncü hali kullanılarak malzeme iç yapısını değiştirmeden nano seviyede sadece yüzey modifikasyonu yapmaya olanak veren çevre dostu bir tekniktir. Çeşitli monomer ve gazlar yardımıyla farklı özellikler gösteren (hidrofilik, hidrofobik, biyouyumlu vb.) yüzeylerin elde edilebilmesi bu tekniği oldukça popüler yapmıştır. Bu çalışmada üç farklı monomer yardımıyla modifiye edilen mikroplak yüzeylerin, KNS'lerin oluşturduğu biyofilm formasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: Kan ve el kültüründen izole edilen toplam 60 adet KNS izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol suşları olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ile biyofilm oluşturmayan *S. epidermidis* ATCC 12228 suşları kullanılmıştır. Biyofilm oluşumu Christensen tarafından tarif edilmiş olan kantitatif plak test yöntemiyle belirlenmiştir. Plazma polimerizasyon yoluyla üç farklı monomerle modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş mikroplaklarda tüm suşların biyofilm oluşturma davranışı eş zamanlı ve karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: El ve kandan izole suşlar arasında biyofilm pozitifliği açısından fark belirlenmemiştir. Plazma tekniği ile modifiye edilmemiş mikroplakta %71.6 oranında biyofilm oluşumu gözlenirken, plazma ile modifiye edilmiş mikroplak yüzeylerde sırasıyla; %80 (monomer: 3-merkaptopropiyonik asit), %65 (monomer: 2-hidroksietilmetakrilat) ve %31.6 (monomer: etilen glikol dimetakrilat) oranında biyofilm oluştuğu gözlenmiştir. Üç monomer içinde etilen glikol dimetakrilatın diğer monomere kıyasla biyofilm oluşumunu belirgin olarak inhibe ettiği saptanmıştır.

Sonuç: Son yıllarda kateter infeksiyonlarında KNS'ler, özellikle *S. epidermidis*, en sık izole edilen bakteri olup nozokomiyal bakteremilerin %28'inden sorumludur. KNS sıklığındaki artışın nedeni olarak prostetik ve kalıcı cihazların kullanımının yaygınlaşması gösterilmektedir. *S. epidermidis* bakteremisi olan hastaların %90'ında intravasküler kateter öyküsü olduğu saptanmıştır. Biyofilm; su, protein, karbonhidrat içeren hücre dışı bir yapıdır ve mikroorganizmanın konak hücre ve yapay yüzeylere istenmeyen yapışmasından sorumludur. Biyofilm mekanizması, malzeme yüzeyi ve bakteri yüzeyi arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değiştirilebilir. Çalışmamızda uygun monomer seçimi ile modifiye edilmiş yüzeylerde mikroorganizma biyofilm oluşumunun ve buna bağlı olarak biyofilm ilişkili infeksiyon risklerinin azaltılabilme potansiyelini gösteren *in vitro* sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm; Koagülaz-negatif stafilocok; Kateter infeksiyonu; Plazma polimerizasyon; nanomalzeme

SUMMARY

Biofilm Formation Research of Coagulase-Negative Staphylococci Isolates' Isolated from Blood and Hand Culture at Nanofilm Covered Micro Plaques by Plasma Polymerization Technique: An Experimental Model

Jülide Sedef GÖÇMEN¹, Elvan HORTAÇ İŞTAR², Dilek ÇÖKELİLER³, Mehmet MUTLU⁴, Gizem KALELİ CAN⁴, Sezin ALPARSLAN⁵, Ceren ÇETİN⁵, Naz KARTAL⁵, Uğur Can ÖZÇELİK⁵, Çağrı AYCAN⁵

¹ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of TOBB Economics and Technology, Ankara, Turkey

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

³ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of Baskent, Ankara, Turkey

⁴ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, University of TOBB Economics and Technology, Ankara, Turkey

⁵ Student Working Group, Faculty of Medicine, University of Baskent, Ankara, Turkey

Introduction: Coagulase-negative staphylococci (CNS) can protect themselves from the effects of antibiotics by producing biofilms through breeding on biomaterials, medical equipment and devices. It is possible to influence biofilm formation with the aid of various surface modifications. In our study, plasma polymerization method, which is a surface modification technique, was used. The plasma polymerization technique is an environmentally-friendly technique that allows you to modify the nanometer level only at the surface without affecting the stack using the fourth state of the material. The possibility to generate surfaces with different properties (hydrophilic, hydrophobic, biocompatible etc.) by the help of various monomers and gases has made this technique more popular. In this study, the effect of the microplate surfaces modified by three different monomers on the biofilm formation of CNS was investigated.

Materials and Methods: A total of 60 isolated CNS isolates from blood and hand cultures were included into the study. As control strains, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, known to be biofilm positive, and *S. epidermidis* ATCC 12228 which do not form biofilm, were used. Slime formation was determined by the quantitative plaque assay method described by Christensen. In microplates, which were plain or modified by three different monomers, the biofilm formation behavior of all strains was investigated simultaneously and comparatively.

Results: There was no difference in biofilm positivity between strains isolated from hand and blood. A total of 71.6% biofilm formation was observed on microplates, which were not coated with plasma technique, and on plasma-modified microplated surfaces, 80% (monomer: 3- mercaptopropionic acid), 65% (monomer: 2-hydroxyethyl methacrylate) and 31.6% (monomer: ethylene glycol dimethacrylate) biofilm formation was observed, respectively. It was found that ethylene glycol dimethacrylate in three monomers significantly inhibited biofilm formation when compared to other monomers.

Conclusion: In recent years CNS, especially *S. epidermidis* has become the most frequently isolated bacteria in catheter infections and responsible for the 28% of nosocomial bacteremia. The widespread use of prosthetic and permanent devices has been shown as a reason for the increase in the frequency of this effect. In 90% of patients with *S. epidermidis* bacteremia, there is an intravascular catheter history. Biofilm is an extracellular structure containing water, proteins and carbohydrates and is responsible for the unwanted adhesion of microorganisms to host cells and artificial surfaces. The biofilm mechanism can be altered by the interaction between the material surface and the bacterial surface. In our study, *in-vitro* results were obtained showing the potential to reduce the risk of biofilm-associated infection by microorganism biofilm formation on modified surfaces with appropriate monomer selection.

Keywords: Biofilm; Coagulase-negative staphylococci; Catheter infection; Plasma polymerization; Nanomaterial

GİRİŞ

Koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) stafilokok ailesine mensup, hareketsiz, sporsuz, gram-pozitif, koagülaz-negatif özellikte bakteriler olup insan deri ve mukozasının doğal florasını oluşturur. Normal şartlar altında patojen olmayan bu bakteri özellikle immün sistemi baskılanmış, fizyolojik strese uğramış, deri bütünlüğü bozulmuş ve kateter gibi kalıcı cihaz takan hastalarda lokal veya sistemik infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bakteremi, endokardit, menenjit, perikardit, artrit, osteomyelit, cerrahi yara infeksiyonu, kateter infeksiyonu ve üriner sistem infeksiyonları bu infeksiyonlardan bazılarıdır^[1]. KNS infeksiyonlarının tedavisi zordur; çünkü bu bakteriler protez araçlar üzerinde üreyip biyofilm oluşturarak kendilerini konak immün sistem hücrelerinden ve diğer fiziksel, biyolojik ve kimyasal etkilerden koruyabilirler.

Biyofilmler bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu dinamik bir topluluk olarak tanımlanabilir^[2]. Biyofilm yapısı antimikrobialerin bakteriye ulaşmasını engelleyen bir bariyer görevi görerek bakterinin antibiyotiklere karşı direncini artırır.

İntravasküler kateterlerin varlığı hastane infeksiyonu gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür^[3]. Hastane infeksiyonları genellikle yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir ve hastanede yatan hastalarda gelişen bakteremilerin yaklaşık %40'ını katetere bağlı bakteremiler oluşturmaktadır^[4]. Kateter infeksiyonlarının morbidite ve mortalitede %10-20'lik bir artışa, hastanede kalış süresinde ise ortalama yedi günlük bir uzamaya neden olduğu bilinmektedir^[5].

Biyofilm; bakteriler tarafından üretilen ve biyofilm yapısının %90'ını kaplayan su, karbonhidrat, protein ve fosfolipid içeren ekstraselüler matriks içerisinde gömülü mikroorganizma topluluğudur ve mikroorganizmanın konak hücre ile yapay yüzeylere yapışmasında etken rol oynar^[6]. Biyofilm oluşumu ile ilgili yapılan pek çok çalışmada kateter ilişkili infeksiyonların en sık etkeninin KNS'ler olduğu görülmüş ve bakteremili hastalardan izole edilen KNS'lerdeki biyofilm pozitifliğinin %93'lere kadar çıktığı bildirilmiştir^[7,8]. Biyofilm oluşumu hastane infeksiyonlarının oluşumunda bu denli

önemli bir etken iken biyofilm oluşumunu azaltan faktörlerin infeksiyon riskini, buna bağlı olarak morbidite ve mortalite oranını azaltması beklenmektedir.

Biyofilm oluşum hızı ve kalınlığı, katı yüzey (biyofilmin olduğu yüzey) ve bakteri yüzeyi arasındaki statik ve dinamik etkileşimlere bağlı olması nedeniyle, katı yüzey yükü, katı yüzey kimyasal ve fiziksel yapısı ile yüzey enerjisinden etkilenmektedir. Bu nedenle çeşitli kaplamalarla, malzeme yüzeyinin özelliklerinin değiştirilmesiyle biyofilm oluşumunu etkilemek mümkündür^[9].

Çalışmada maddenin dördüncü hali olarak tanımlanan plazma yardımı ile üç farklı tipte monomer beslemesi yapılarak malzeme yüzeyinde ince film oluşturulması planlanmıştır. Oluşturulan ince filmlerin kalınlığı nanometre düzeyindedir. Kaplanmamış ve plazma polimerizasyon tekniğiyle üç farklı monomer ile kaplanmış polistiren 96 kuyucuklu mikroplaklarda kan ve el kültüründen izole edilen KNS izolatlarının biyofilm oluşturması arasındaki farkı gözlemlenmek amaçlanmıştır. Plazma polimerizasyon tekniğinin etkisinin incelenmesi özgünlüğü oldukça yüksek, yenilikçi ve önemli bir yaklaşımdır.

MATERYAL ve METOD

Bakteri İzolatları

Kan kültüründen izole edilen 30, el kültürlerinden izole edilen 30 KNS izolatı ile ATCC 12228 (biyofilm negatif) kodlu referans *Staphylococcus epidermidis* ve ATCC 35984 *S. epidermidis* (biyofilm pozitif) kontrol suşları olmak üzere toplam 62 bakteri bu amaçla kullanılmıştır. Kontrol suşları ve çalışmada test edilecek olan izolatlar -80°C'de saklanmaktayken iki kez %5 koyun kanlı agar plağına pasajlanmıştır.

Doksan Altı Kuyucuklu Mikroplaklarda Biyofilm Çalışması

Biyofilm kavramının net bir şekilde tanımlanmasından önce Christensen tarafından tarif edilmiş olan kantitatif plak testi yöntemine çeşitli modifikasyonlar yapılarak bakterilerdeki biyofilm oluşumu belirlenmiştir^[10,11].

Pasajları yapıp üretilen bakterilerin dilüsyonları için Triptik Soy Buyyon (TSB) (5 mL) (BD, ABD) besiyeri kullanılmıştır. MacFarland 0.5 ola-

çak şekilde sıvı besiyerine bakteri ekimleri yapılarak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün sıvı besiyerindeki bakterilerin 1/100 oranında dilüsyonları yapılmıştır. Düz tabanlı mikrop-laklar da bakteri içermeyen deney ortamları (200 µL) negatif kontrol olarak kullanılırken deney kuyucuklarına 20 µL bakteri, 180 µL deney ortamı konulmuştur. Her bir bakteri için üçer kuyucuk kullanılmıştır. TSB kontrol referans deney ortamı olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan mikrop-laklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılmış ve steril fosfat tampon solüsyonu (pH= 7.2) ile dört kez yıkanmıştır. Kuyucuklar metanol ile fiksasyona tabi tutulmuş (200 µL), %2'lik kristal viyole ile boyama işleminden sonra 200 µL etanol konulmuştur. Boşaltılan mikrop-lak kuyucuklarına tüm işlemlerin sonunda 200 µL distile su konarak 540 nm dalga boyunda plakların optik dansiteleri ELISA plak okuyucuda okunmuştur (BioTek Instruments, Inc., ABD). Her bir bakteri için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen değerlerin (OD) ortalamaları hesaplanmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarından elde edilen OD değerlerinin üç standart değer (SD) üstü o deney ortamı için sınır değer (cut-off) olarak belirlenmiştir.

Deney kuyucuklarından elde edilen değerler sınır değere göre değerlendirilmiştir. Sınır değerinde olan değerler slime pozitif, altında olan değerler ise negatif kabul edilmiştir. Slime pozitif olanlar da kendi aralarında hafif, orta, kuvvetli ve çok kuvvetli olmak üzere dört gruba ayrılmıştır^[11].

Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Mikrop-lak Yüzeylerin Kaplanması

Mikrop-lak yüzeyleri radyo frekans (13.56 MHz) düşük basınç plazma sistemi (Pico, Diener Electronic GmbH, Almanya) ile kaplanmıştır. Kaplama yapılacak mikrop-laklar reaktör ortasına yerleştirildikten sonra reaktör, vakum pompası (Trivac 2.5E, Leybold Vacuum GmbH, Almanya) yardımıyla vakumlanmıştır. Monomer besleme hattının açılmasıyla içeriye monomer buharının sürekli akışı sağlanarak reaktör içerisindeki atmosfer değiştirilmiştir. Beslenen monomer radyo frekans jeneratörü ile belirlenen güçte plazma fazına geçirilerek mikrop-lakların yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İşlem 60 Watt güç, 30 dakika maruz kalma süresi

ve 20 Pascal basınç plazma koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Plazma modifikasyonundan sonra mikrop-lak yüzeyinde oluşan reaktif grupların stabil hale geçmesi için vakum ortamında örnekler 15 dakika bekletilmiştir. Son olarak serbest radikallerin sönmümlendirilmesi için reaktör içerisine 30 dakika argon gazı beslenmiştir. Plazma polimerizasyon yöntemi ile kaplama esnasında uygulanan güç miktarı, süre ve basınç değişmeksizin her monomerle aynı şekilde kaplama yapılmıştır. Yöntemde anlatılan şekilde üç farklı monomerle [2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDM), 3-merkaptopropiyonik asit (MPA)] üç farklı kaplama yapılmıştır.

Çalışmamızdaki Mikrop-lak Grupları

Grup 1: Kaplama yapılmamış mikrop-laklar.

Grup 2: Plazma polimerizasyon tekniği ile kaplama, monomer: HEMA.

Grup 3: Plazma polimerizasyon tekniği ile kaplama, monomer: EGDM.

Grup 4: Plazma polimerizasyon tekniği ile kaplama, monomer: MPA.

Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Modifiye Edilen Polistiren 96 Kuyucuklu Mikrop-laklarda Biyofilm Testleri

Modifiye mikrop-laklardaki biyofilm deneyleri aynı izolatlarda üç farklı monomer ile kaplı polistiren 96 kuyucuklu mikrop-laklarda yine kantitatif plak yöntemine göre çalışılmıştır. Modifiye mikrop-lakların da OD değerleri ölçülerek hesaplama kaplamasız 96 kuyucuklu mikrop-laklarda biyofilm çalışmasında yapıldığı gibi hesaplanmıştır.

Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Modifiye Edilen 96 Kuyucuklu Mikrop-laklarda Biyofilm Çalışması Sonuçlarının Karşılaştırılması

Sonuçların ortalama, standart sapma, ortanca değeri hesaplanmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiler ikişerli ikişerli Spearman korelasyon katsayısı ile incelenmiştir. Spearman korelasyon katsayıları ve bu katsayılarla ilişkin önemlilik testi p değeri ile ifade edilmiştir. $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veri analizi SPSS 17.0 (SPSS Ver. 17.0, Chicago IL, USA) yazılımıyla gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Her mikroorganizma üç kuyucukta çalışılmış ve sonuçlar her üç kuyucuğun ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sadece besiyeri içeren kuyucukların optik dansitelerinin ortalaması alınmış ve üç standart deviasyonu hesaplanarak ODc değer belirlenmiştir. Elde edilen cut-off değerine göre biyofilm pozitiflikleri yorumlanmıştır. Suşların 0'dan 4'e kadar biyofilm oluşumu derecelendirilmiştir. Kaplanmamış plaktaki biyofilm derecelendirilmesi Tablo 1'de gösterilmiştir. Hem el hem de kandan izole suşlar içerisinde her dört kantitasyon derecesinde biyofilm oluşturan suşlara rastlanmıştır. El ve kan kültüründen izole suşlar arasında biyofilm oluşturma dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.5$).

Elden izole edilen suşların 21 (%70)'inde, kandan izole edilen suşların 22 (%73.2)'sinde biyofilm pozitifliği saptanmıştır. Kandan izole edilen suşlarda daha yüksek biyofilm pozitiflik oranı mevcuttur; ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Her iki klinik örnekten üreyen KNS'lerin toplam biyofilm oluşturma oranlarına bakıldığında; kaplanmamış mikroplakta 43 (%71.6) suşta biyofilm pozitifliği gözlenirken, kaplama yapılmış mikroplak yüzeylerde sırasıyla; MPA ile kaplı plakta 48 (%80), HEMA ile kaplı plakta 39 (%65), EGDM ile kaplı plakta 19 (%31.6) suşta biyofilm pozitifliği gözlenmiştir.

HEMA ve MPA monomerlerinin hem el hem de kandan izole KNS'lerde biyofilm oluşumunu inhibe edici özelliğinin olmadığı görülmüştür. HEMA monomerinin özellikle kan izolatlarının biyofilm oluşumunda azalma meydana getirdiği görülmekle

beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). MPA monomeri ise her iki kültür izolatında da biyofilm oluşumunu artırmıştır.

EGDM monomeri biyofilm oluşumunu elden izole suşlarda %62, kandan izole suşlarda %50 ve toplamda tüm izolatlarda %55.8 oranında azaltmıştır. EGDM'nin KNS suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe edici etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$).

Kullanılan monomerleri ikili olarak karşılaştırdığımızda sonuçlar bize kan ya da elden izole edilen KNS'lerin EGDM ile kaplanmış plaklarda biyofilm oluşturmalarının, kaplanmamış ve HEMA ve MPA ile kaplanmış plaklara göre engellendiğini göstermektedir.

Biyofilm pozitiflik derecelerine bakıldığında HEMA ve MPA ile kaplanmış plaklardaki biyofilm yoğunluğunda bir azalma meydana gelmezken; EGDM kaplı plakta biyofilm oluşturan 19 suştan 17'sinin biyofilm kantitasyonunun kaplanmamış plağa oranla en az 1 derece gerilediği görülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Şekil 1'de elden, Şekil 2'de kandan izole edilen KNS suşlarının biyofilm pozitifliğinin her bir izolat için kullanılan dört farklı ortamdaki değişimlerinin karşılaştırması görülmektedir. EGDM monomerinin diğer monomere oranla kaplanmamış mikroplaktaki biyofilm kantitasyon derecesini anlamlı olarak düşürdüğü görülmektedir.

İzole edildikleri bölgeye göre bakteriler karşılaştırıldığında el ve kandan izole suşlar arasında biyofilm pozitifliği açısından fark belirlenmemiştir.

Şekil 3'te kan ve el kültüründen üreyen KNS'lerde tüm plaklardaki (kaplanmamış, EGDM, HEMA, MPA asit ile kaplı) biyofilm pozitiflik ve negatiflik sayıları toplu olarak görülmektedir.

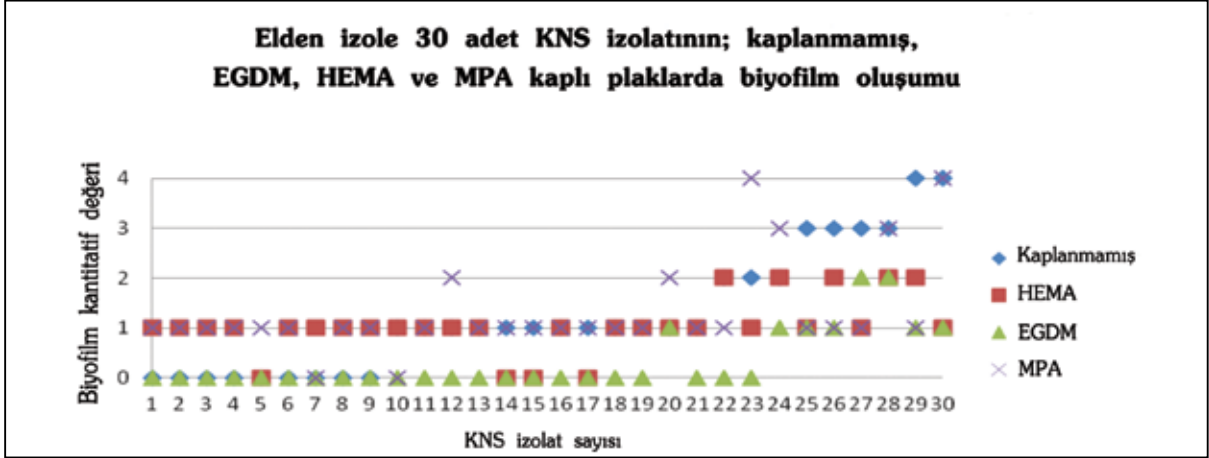
TARTIŞMA

Son yıllarda nozokomiyal bakteremilerin en sık etkenleri arasında KNS'ler, aerop gram-negatif basiller, *Candida* türleri, enterokok türleri ve *Staphylococcus aureus* gelmektedir. KNS'ler, özellikle de *S. epidermidis* kateter infeksiyonlarından en sık izole edilen bakteri olup nozokomiyal bakteremilerin %28'inden tek başına sorumludur^[3].

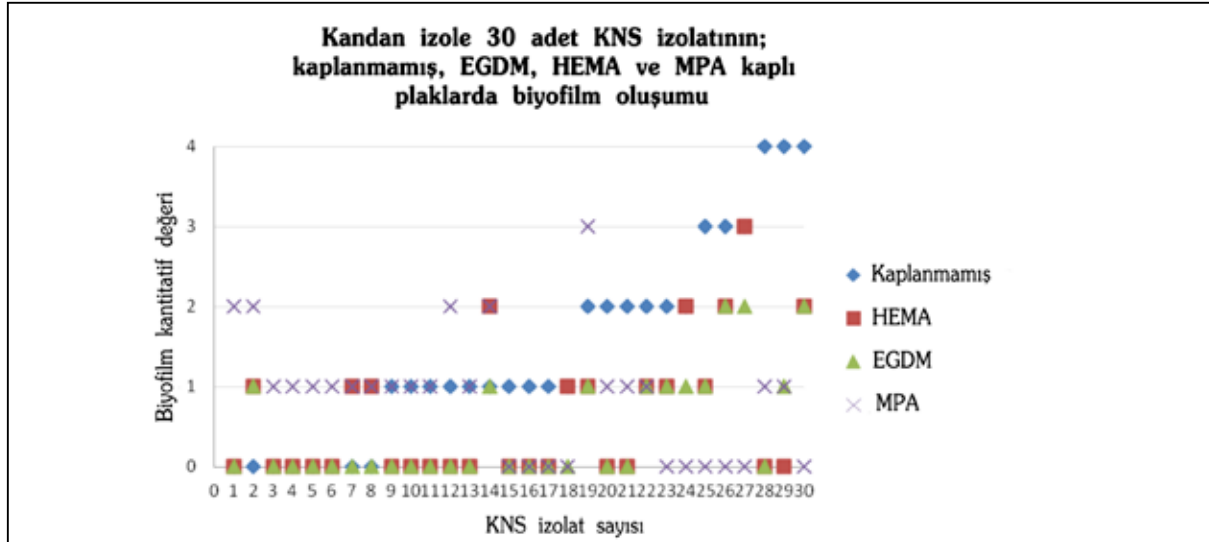
Çalışmalarda KNS sıklığındaki artışın nedeni olarak prostetik ve kalıcı cihazların kullanımının yaygınlaşması gösterilirken, *S. epidermidis* bakte-

Tablo 1. Koagülaz-negatif stafilokok izolatlarının kantitatif biyofilm düzeyleri

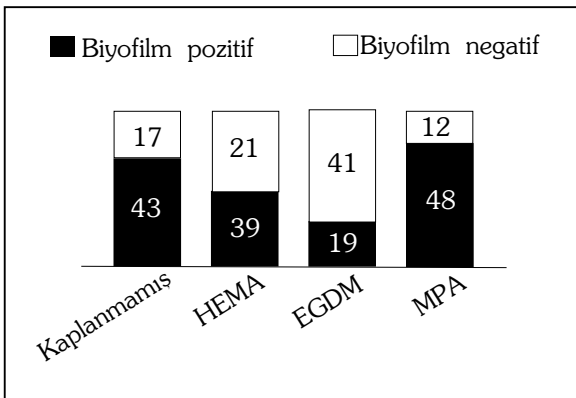
KNS izolatları	Kaplanmamış plak OD değerlerine göre biyofilm pozitiflik dereceleri					
	0	1+	2+	3+	4+	
El	9	12	3	4	2	30
Kan	8	10	6	3	3	30
Toplam	17	22	9	7	5	60



Şekil 1. El kültüründen izole edilen her bir suşta biyofilm pozitifliğinin karşılaştırılması.



Şekil 2. Kan kültüründen izole edilen her bir suşta biyofilm pozitifliğinin karşılaştırılması.



Şekil 3. Her iki klinik örnekten üreyen koagülaz-negatif stafilokoklarda tüm plaklardaki (kaplanmamış, EGDM, HEMA, MPA ile kaplı) biyofilm pozitiflik ve negatiflik sayıları.

remisi olan hastaların %90'ında intravasküler kateter öyküsü olduğu saptanmıştır^[7]. Kateter yüzeyi bakteri adezyonu için uygun bir ortam sağlayarak özellikle bakterinin biyofilm formasyonu oluşmasıyla vücut savunmasından ve antimikrobiyal ajanların etkilerinden korunmasını sağlar^[6].

Kateter ilişkili infeksiyonların önüne geçmek amacıyla son yıllarda bazı antimikrobiyal ajanlar ve biyofilm oluşumunu inhibe edici bir takım maddelerle kaplanmış kateterlerle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmaların bir kısmı antiseptik ve antimikrobiyal ajanlarla kaplanmış bu kateterlerin kullanımının mikroorganizma yapışmasını, dolayısıyla biyofilm oluşumu ve infeksiyon riskini

azalttığını göstermiştir^[12]. Bu tür kateterlerin kullanımı ilave edinim maliyetine rağmen infeksiyon riskindeki düşüş ve buna bağlı komplikasyonların azalmasından ötürü tedavi maliyetlerini düşürebilir; ancak yapılan birçok çalışma rutinde kullanılan klorheksidin-gümüş sülfadiyazin veya minosiklin-rifampin kaplı kateterlerin kullanımının kolonizasyon ve kan dolaşımı infeksiyonlarında istatistiksel olarak önemli bir azalma yaratmadığını göstermiştir^[13,14]. Platin veya karbon kaplamalı dahi olsa gümüş kaplı kateterlerin kolonizasyon ve kan dolaşımı infeksiyonlarında standart kateterlere kıyasla bir etkinin olmadığı görülmüştür^[14,15]. Beş yüz yetmiş yedi yoğun bakım hastası ve 617 santral venöz kateterin değerlendirildiği çok merkezli randomize bir çalışmada iyonize gümüşle emdirilmiş kateterlerin standart kateterlerle karşılaştırıldığında bakteri kolonizasyonu ve bakteremi üzerinde herhangi bir pozitif yönlü etkisi olmadığı görülmüştür^[15]. Görüldüğü gibi günümüzde kateter ilişkili infeksiyonlar halen önemini korumakta ve bu konuda etkin ve biyoyumlu malzeme arayışı devam etmektedir. Plazma maddenin (monomerin) dördüncü hali olarak tanımlanabilir. Genel olarak plazma yüksek sıcaklıkta kuvvetli elektrik veya manyetik alanların etkisiyle oluşur. Güçlü bir elektriksel boşalım da plazma oluşturabilir. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer eder. Bu atom ve moleküllerin birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller ve iyonlar oluşur. Plazma ısıması sıcak plazma ve soğuk plazma olmak üzere ikiye ayrılır. Çalışmamızda soğuk plazma sistemi kullanılmıştır. İki elektrot arasında ve vakum ortamında, farklı tipte monomerlerin beslenmesi ile elde edilen plazma ısıması içine konan bir katı materyal yüzeyinde (mikroplak), kopmalar veya birikmeler oluşturulmuştur. Soğuk plazma ısımasının katı malzeme yüzeyinde angström seviyesinden başlayan ince kaplamalar için kullanılmaktadır ve bu kaplamaların en önemli avantajı homojen ve ince olmasıdır. Plazma polimerizasyon yöntemiyle bir ön koşul olmaksızın tüm organik bileşiklerin (monomer), katı malzeme yüzeylerin üzerinde polimerleşebilmesi (kaplama) ve böylece yüzeyin biyoyumluluğunun artırılması mümkündür^[16-19]. Titanyum alaşım, silikon gibi farklı biyomalzemelerin yüzey modifikasyonları için

plazma polimerizasyon tekniğinin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur^[20-22].

Plazma polimerizasyon tekniği ile kaplamanın diğer geleneksel kaplama yöntemlerine göre en önemli avantajları; ince olması, kimyasal kararlılığı yani yüzeyden sıyrılmaması, biyoyumlu kaplama yapılabilmesi, diğer kaplama yöntemlerine göre daha az basamak içermesi, daha temiz bir teknoloji olarak değerlendirilmesi, farklı monomerlerin kullanılması ile çok farklı özellikte (hidrofilik ya da hidrofobik) kaplamaların yapılabilmesi ve kısa sürmesi sayılabilir.

Literatürde biyofilm oluşumunu artıran ve azaltan çeşitli maddeler bildirilmiştir. Daha önce üropatojen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* suslarında iki ayrı monomerle yaptığımız biyofilm çalışmasında HEMA monomerinin gram-negatif bakterilerde biyofilm oluşumunu %88.8 oranında azalttığı görülmüştür. EGDM monomeri ise gram-negatif bakterilerde biyofilm oluşumunu pozitif yönde etkilemiştir^[23]. Çalışmamızda gram-pozitif bir kok olan ve günümüzde kateter ilişkili infeksiyon etkenlerinin başında gelen KNS izolatlarının kaplanmamış ve plazma polimerizasyon tekniği ile MPA monomeri de eklenerek üç farklı monomer ile kaplanmış 96 kuyucuklu mikroplaklarda biyofilm oluşumu arasındaki farkı gözlemek amaçlanmıştır. Monomer yapılarla kaplanmış kateterlerin kullanılması kateter ilişkili infeksiyonların oranını azaltabilir fikrinden yola çıkarak bu çalışma planlanmıştır. Sonucunda da gram-negatif mikroorganizmalardakinin aksine KNS'lerde EGDM monomerinin kullanımıyla diğer monomerlere göre biyofilm oluşumunun belirgin olarak inhibe edildiği saptanmıştır.

Polimer üretiminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDM monomeri biyoyumlu bir malzeme olması, antimikrobiyal taşıyıcılık özelliği ve çapraz bağlanma yoğunluğunun değiştirilmesiyle ilaç salınım karakterinin etkileenebilmesi sebebiyle potansiyel bir tıbbi cihaz kaplama malzemesidir^[24]. Çalışmamızda EGDM monomerinin tek başına gram-pozitif bakterilerin biyofilm oluşumu üzerinde güçlü inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Bizim sonucumuza paralel olarak literatürde EGDM monomerinin gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkinliği olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır^[25,26].

HEMA dış hekimliği restoratif materyallerinde sıklıkla kullanılan bir monomerdır ve hem oral floradaki planktonik streptokok miktarını hem de bakteri adezyon ve agregasyonunu azaltarak biyofilm oluşumunu indirekt olarak inhibe ettiği bilinmektedir^[27]. Ayrıca *Pseudomonas* ve *E. coli* türlerinin biyofilm formasyonu üzerinde de anlamlı derecede inhibitör etkinliği olduğu gösterilmiştir^[23,28,29]. Literatürde biyouyumluluğu ve uygun bir antimikrobiyal taşıyıcı madde olması sebebiyle antibiyotik emdirilmiş HEMA ile yapılan çalışmalar bulunmakla beraber KNS izolatlarında tek başına HEMA'nın biyofilm oluşumundaki inhibitör etkisiyle ilişkili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda HEMA monomerinin KNS izolatları üzerinde biyofilm oluşumunda minimum inhibitör etkisi görülse de bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Polyester materyal endüstrisinde primer ve sekonder antioksidan ve renk sabitleyici olarak kullanılan MPA monomerinin *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ve bazı *Candida* türleri üzerinde antibakteriyel etkinliği olduğu bilinmektedir^[30,31]. Çalışmamızda MPA'nın KNS türlerindeki biyofilm formasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkinliği görülmemektedir; hatta bazı el ve kan izolatlarında biyofilm oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumundaki bu artış KNS hücre duvar komponentleriyle muhtemel elektrostatik etkileşim ve değişen yüzey hidrofobisitesi sebebiyle olabilir. Antimikrobiyal etkinliği olduğu bilinen bu monomerin biyofilm oluşumunu engelleyici etkisi üzerine yapılan çalışmalar halen çok kısıtlı sayıdadır.

Çalışmamızda sonuç olarak uygun monomer seçimi ile plazma ile modifiye edilmiş yüzeylerde, mikroorganizma biyofilm oluşumunun ve böylece ilişkili enfeksiyon risklerinin azaltılma potansiyelini gösteren in vitro sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmanın daha fazla sayıda farklı mikroorganizmayla ve in vivo deneylerle genişletilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Asai K, Yamada K, Yagi T, Baba H, Kawamura I, Ohta M. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms. *J Infect Chemother* 2015;21:55-61.

2. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: What healthcare professionals should know? *J Hosp Infect* 2006;64:313-25.
3. 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;49:1-45.
4. Orucu M, Geyik MF. Yoğun bakım ünitesinde sık görülen enfeksiyonlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;1:40-3.
5. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:299-303.
6. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:185-90.
7. Geffers C, Gastmeier P. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:87-93.
8. O'grady NP, Alexander M, Burns LA, Dellinger EP, Garland J, Heard SO, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 2011;52:162-93.
9. Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:15-46.
10. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996-1006.
11. 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;115:891-9.
12. Halton KA, Cook DA, Whitby M, Paterson DL, Graves N. Cost effectiveness of antimicrobial catheters in the intensive care unit: addressing uncertainty in the decision. *Crit Care* 2009;13:R35.
13. Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Mimos O. Prevention of central venous catheter-related infection in the intensive care unit. *Crit Care* 2010;14:212-7.
14. Ramritu P, Halton K, Collignon P, Cook D, Fraenkel D, Battistutta D, et al. A systematic review comparing the relative effectiveness of antimicrobial-coated catheters in intensive care units. *Am J Infect Control* 2008;36:104-17.
15. Kalfon P, de Vaumas C, Samba D, Boulet E, Lefrant JY, Eyraud D, et al. Comparison of silver-impregnated with standard multi-lumen central venous catheters in critically ill patients. *Crit Care Med* 2007;35:1032-9.
16. Bónová L, Zahoranová A, Kovácik D, Zahoran M, Micušik M, Cernák M. Atmospheric pressure plasma treatment of flat aluminum surface. *Appl Surf Sci* 2015;331:79-86.

17. Jiang B, Zheng J, Qiu S, Wu M, Zhang Q, Yan Z, et al. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chem Eng J* 2014;236:348–68.
18. Van Durme J, Dewulf J, Leys C, Van Langenhove H. Combining non-thermal plasma with heterogeneous catalysis in waste gas treatment: A review. *Appl Catal B: Environ* 2008;78:324-33.
19. Ebnesaajad S. Plasma treatment of polymeric materials. In: Ebnesaajad S (ed). *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*. 2nd ed. Oxford: William Andrew Publishing, 2014:227–69.
20. Çökeliler D, Göktaş H, Tosun PD, Mutlu S. Infection free titanium alloys by stabile thiol based nanocoating. *J Nanosci Nanotechnol* 2010;10:2583-9.
21. Çökeliler D. Enhancement of polycarbonate membrane permeability due to plasma polymerization precursors. *Appl Surf Sci* 2013;268:28-36.
22. Gulsen S, Çökeliler D, Goktas H, Kucukturhan A, Ozcil B, Caner H. Improved Bone Formation in Osteoporotic Rabbits with the Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) Coated Titanium Screws Which Were Coated By Using Plasma Polymerization Technique. *Maced J Med Sci* 2014;7:198-208.
23. Hortaç E, Kaleli G, Çökeliler D, Yavuzdemir Ş, Mutlu M, Demirbilek Ekici M ve ark. GSBL pozitif üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının plazma polimerizasyon tekniği ve nanomalzemeler ile modifiye edilmiş (mikroplak) yüzeylerde biyofilm oluşumunun incelenmesi: deneysel model. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2015;45:181-7.
24. Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Antimicrobial peptide incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for the prevention of *Staphylococcus epidermidis*-associated biomaterial infections. *J Biomed Mater Res A* 2012;100:1803-14.
25. Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Cameotra SS, Alzohairy MA. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2015;33:101-9.
26. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. *J Photochem Photobiol B* 2016;160:32-42.
27. D'Ercole S, Di Giulio M, Grande R, Di Campi E, Di Bartolomeo S, Piccolomini R, et al. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on *Streptococcus* spp. biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2011; 52:193-200.
28. Di Giulio M, D'Ercole S, Zara S, Cataldi A, Cellini L. *Streptococcus mitis*/human gingival fibroblasts co-culture: the best natural association in answer to the 2-hydroxyethyl methacrylate release. *APMIS* 2012;120:139-46.
29. Fazly Bazzaz BS, Khameneh B, Jalili-Behabadi MM, Malakeh-Nikouei B, Mohajeri SA. Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles. *Cont Lens Anterior Eye* 2014;37:149-52.
30. Nomiya K, Noguchi R, Ohsawa K, Tsuda K, Oda M. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activities of two isomeric gold(I) complexes with nitrogen-containing heterocycle and triphenylphosphine ligands, [Au(L)(PPh₃)] (HL = pyrazole and imidazole). *J Inorg Biochem* 2000;78:363-70.
31. Nomiya K, Yamamoto S, Noguchi R, Yokoyama H, Kasuga NC, Ohshima K, et al. Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold complexes with AuSP and AuNP cores showing selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of [Au(2-Hmpa)(PPh₃)] and [Au(6-Hmna)(PPh₃)] (2-H(2)mpa=2-mercaptopyruvic acid, 6-H(2)mna=6-mercaptopyruvic acid). *J Inorg Biochem* 2003;95:208-20.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Elvan HORTAÇ İŞTAR
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bağlıca Kampüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Ankara-Türkiye
E-posta: elvanhortac@gmail.com