

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**TİGESİKLİN VE VANKOMİSİN
ANTİBİYOTERAPİ ETKİNLİKLERİNİN
İN VİTRO METİSİLİNE DİRENÇLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) İLE
OLUŞTURULAN BİYOFİLM MODELİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

DR. HALİL ASLAN

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NUR YAPAR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**TİGESİKLİN VE VANKOMİSİN
ANTİBİYOTERAPİ ETKİNLİKLERİNİN
İN VİTRO METİSİLİNE DİRENÇLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) İLE
OLUŞTURULAN BİYOFİLM MODELİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. HALİL ASLAN

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. NUR YAPAR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİLER.....	5
MRSA'nın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	5
Biyofilm Tabakası ve Özellikleri.....	10
Kateter Enfeksiyonları.....	14
<i>Etiyopatogenez.....</i>	<i>17</i>
<i>Risk faktörleri.....</i>	<i>19</i>
<i>Etkenler.....</i>	<i>21</i>
<i>Tanı.....</i>	<i>21</i>
Tedavi.....	22
Tigesiklin.....	22
<i>Etki spektrumu.....</i>	<i>22</i>
<i>Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler.....</i>	<i>24</i>
<i>Klinik kullanımı.....</i>	<i>24</i>
<i>Yan etkileri.....</i>	<i>25</i>
MRSA Tedavisinde Kullanılan Diğer Antibiyotikler.....	25
<i>Vankomisin.....</i>	<i>25</i>
<i>Teikoplanin.....</i>	<i>27</i>
<i>Linezolid.....</i>	<i>27</i>
<i>Kinupristin/Dalfopristin.....</i>	<i>28</i>
<i>Daptomisin.....</i>	<i>29</i>
<i>Rifampisin.....</i>	<i>30</i>
GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	31
Antibiyotik Kilit Tedavisi Modeli.....	32
İstatiksel Analiz.....	32
BULGULAR.....	33
TARTIŞMA.....	36
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Kongo kırmızılı besiyerinde biyofilm oluşturan ve oluşturmayan kolonilerin görünümü.....33
- Şekil 2:** MRSA ile kateter üzerinde oluşturulmuş biyofilm tabakasının elektron mikroskopik görünümü.....33
- Şekil 3:** Yirmidört saatlik inkübasyon sonunda tigesiklin, vankomisin ve kontrol gruplarında oluşan üremeler.....34
- Şekil 4:** Antibiyotik kilit tedavisi modelinde tigesiklin, vankomisin ve kontrol gruplarında günlere göre üremeler.....35

KISALTMALAR

agr: Accessory gene regulator

AHL: Açıl Homoserin Lakton

AI2: Auto indükleyici 2 sistemi

arlS: Autolysis related locus sensor

cfu: Colony forming units

DNaz: Deoksiribonükleaz

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EPS: Ekzopolisakkarit

FDA: Food and Drug Administration

GSBL: Genişletilmiş spektrumlu betalaktamaz

IDSA: Infectious Diseases Society of America

KDYDE: Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

KİAE: Komplike intraabdominal enfeksiyonlar

KNS: Koagülaz negatif stafilokoklar

MHC: Major Histocompatibility Complex

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSCRAMM: Microbial surface component reacting with adherence matrix molecules

PAE: Post antibiyotik etki

PBP: Penisilin bağlayan protein

PCR: Polimeraz chain reaction

PPK: Polifosfokinaz

PRSP: Penisiline rezistan *Streptococcus pneumoniae*

PVL: Panton Valentine lökositini

QS: Quorum Sensing

sae: *S.aureus* ekzoproteinleri

SCCmec: Staphylococcal cassette chromosome *mec*

SF: Serum fizyolojik

TEST: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial

TPN: Total parenteral nutrisyon

TSS: Toksik şok sendromu

TSST: Toksik Şok sendrom toksini

TSST-1: Toksik Şok sendrom toksini-1

USG: Ultrasonografi

VISA: Vankomisin intermediate *S. aureus*

VIP: Ventilatörle ilişkili pnömoni

VRSA: Vankomisine rezistan *S. aureus*

VRE: Vankomisine rezistan enterokoklar

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Nedim Çakır' a, değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşe Yüce, Doç. Dr. Vildan Avkan Oğuz ve Öğr. Görev. Uzm. Dr. Ziya Kuruüzüm' e çok teşekkür ederim.

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan tez danışman hocam Doç Dr. Nur Yapar' a canı gönülden teşekkür ederim.

Tezimi hazırlamam için gerekli bakteriyel suşları ve laboratuvar olanaklarını sunan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' ndan Prof. Dr. Zeynep Gülay hocama çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Sema Alp Çavuş' a, asistan arkadaşlarım Dr. Oya Özlem Eren, Dr. Münir Hançer, Dr. Bengisu Ay, Dr. Sevil Sapmaz Karabağ, Dr. Eray Aktaş, Dr. Zeynep Karlıbaş, Dr. Kübra Demir , Dr. Yasemin Balbay, Dr. Gülhan Çallı ve Dr. Vecihe Dursun' a, kliniğimiz hemşire ve çalışanlarına tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu günlere gelebilmem için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme, tanıdığım günden itibaren hep yanımda ve destek olan canım eşim Hatice Aslan'a, hayatıma renk katan biricik oğlum İsmail Erdem'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET:

TİGESİKLİN VE VANKOMİSİN ANTİBİYOTERAPİ ETKİNLİKLERİNİN İN VİTRO METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) İLE OLUŞTURULAN BİYOFİLM MODELİNDE KARŞILAŞTIRILMASI

ASLAN Halil, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı/İZMİR

Günümüzde yüksek mortaliteye, uzun süreli hospitalizasyona (hastanede yatış) ve artan maliyete yol açan kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık sebebi damar içi kateterlerdir. Tüm kateter ile ilişkili enfeksiyonların %75-90'mını stafilokoklar oluşturur. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) bu enfeksiyonların %35-50'sinden sorumludur ve plastik kateterlere diğer mikroorganizmalardan daha kolay yapışır. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ise KNS'lerden sonra ikinci sırada (%15-20) en sık etkindir. Günümüzde antibiyotik direnci önemli bir sorundur. MRSA' ya bağlı kateter enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri ise kısıtlıdır. Tigesiklin geniş spektrumlu, iyi tolere edilebilen yeni damar içi glisilsiklin bir antibiyotiktir. Bu çalışmada, in vitro MRSA biyofilm modelinde tigesiklin ve vankomisinin etkinliğini karşılaştırmayı amaçladık. Bu amaçla silikon disklerde oluşturduğumuz biyofilm tabakası, 24 saat ve antibiyotik kilit tedavisi modelinde beş gün boyunca günlük dört saat süreyle, tigesiklin ve vankomisine maruz bırakıldı. Çalışmanın sonucunda silikon disklerde oluşturduğumuz biyofilm tabakasına, tigesiklinin vankomisinden istatistiksel olarak daha etkili olduğu bulundu. Bu sonuca göre kateter enfeksiyonları tedavisinde tigesiklinin iyi bir alternatif tedavi seçeneği olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Tigesiklin, vankomisin, biyofilm, MRSA, in vitro

SUMMARY:

COMPERATIVE ACTIVITIES OF TIGECYCLINE AND VANCOMYCIN AGAINST METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) IN VITRO BIOFILM MODEL

ASLAN Halil, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, School of Medicine, University of Dokuz Eylul, Izmir, Turkey.

Today, intravenous catheters, the most common cause of bloodstream infections, led to high mortality, prolonged hospitalization (staying in hospital), and increasing costs. Staphylococci constitute 75-90 % of all catheter-related infections. Coagulase-negative staphylococci (CNS) are responsible for 35-50 % of these infections and more adhesive to plastic catheters than other microorganisms. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is in the second place (15-20%) of the most common factors after the CNS. Today, antibiotic resistance is a major problem. Treatment options for catheter infections related to MRSA is restricted. Tigecycline is a broad-spectrum, well tolerated, injectable and new glycylycline antibiotic. In this study, in vitro MRSA biofilm model, we aimed to compare the efficacy of tigecycline and vancomycin. To this end, the silicone disks which we've created biofilm layer, were exposed tigecycline and vancomycin for 24 hours and 5 days of 4-hour daily in the model of antibiotic lock therapy. As a result, tigecycline was found to be more effective than vancomycin to the biofilm layer, statistically. According to these results, tigecycline might be a good alternative treatment options in the treatment of catheter infections.

Key words: Tigecycline, vancomycin, biofilm, MRSA, in vitro

GİRİS VE AMAC:

Giriş: *Staphylococcus aureus* insanda hastalık etkeni olarak sık rastlanan, virulansı yüksek bir mikroorganizmadır. Penisilin tedavisiye girdiği 1945'ten itibaren *S. aureus* suşlarında betalaktamaza bağlı penisilin direnci 5 yıl içinde %50'ye çıkmıştır. Bugün bu direnç % 95'in üstündedir. 1960 yılında penisilina dayanıklı semisentetik penisilin olan metisilin kullanıma girmesi ile birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S. aureus* suşları Avrupa'da saptanmaya başlanmıştır. MRSA 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. MRSA suşları tüm betalaktam antibiyotiklere dirençli olup, ayrıca betalaktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olduklarından bu etkenle oluşan ağır enfeksiyonların tedavisinde tek seçenek glikopeptid antibiyotiklerdir. Vankomisine dirençli koagülaz-negatif stafilokokların ve hemen ardından vankomisine dirençli enterokokların ortaya çıkmasından sonra, *S. aureus* suşlarında korkulan ve beklenen vankomisin direnci ile ilgili ilk bulgular Japonya'dan 1997 yılında gelmiş ve bunu ABD'de izole edilen suşlar takip etmiştir [1].

Biyofilm tabakası bir ekzopolisakkarit olup bakterilerin bazı yüzeylerde kolonizasyonuna yol açar. Bu tabaka ekzopolimer matrikse sahip kapalı bir yapıdır ve çeşitli maddelerin difüzyonunu kısıtlar ve antimikrobiyal ajanları bağlar. Bu durum biyofilm hücreleri için lizozim, kompleman ve antimikrobiyal proteinler gibi büyük moleküllere karşı etkili bir direnç sağlar.

Biyofilm tabakası, bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksis ve opsono-sitofagositozu önler, nötrofil etkisini inhibe eder ve lenfosit aktivitesini azaltır. Biyofilm oluşturan bakteriler tedavisi güç enfeksiyonlara yol açar. Biyofilm tabakasını ortadan kaldırmak son derece güç olup biyofilm oluşturan bakteriler oldukça inatçı enfeksiyonlara yol açarlar. Uygulanan antimikrobiyal ajanların bakteriye etki etmesi için biyofilm tabakasına difüze olması gerekir.

Glisilsiklinler, klasik tetrasiklinlerin semi-sentetik analoglarıdır. Tigesiklin, glisilsiklinler adı verilen bu yeni antibiyotik grubunun ilk üyesidir. Tetrasiklinlerin temel çekirdeğindeki 9. pozisyonunda yapılan N-alkyl-glycylamido modifikasyonu bu yeni moleküle çok geniş bir antibakteriyel spektrum ve tetrasiklin direnç mekanizmalarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Yapısal olarak tigesiklin, minosiklinin semisentetik bir derivativesidir[2]. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler, atipik bakteriler ve anaeroplarda dahil olmak üzere geniş bir etki alanına sahiptir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

(MRSA), penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), genişletilmiş spektrumlu betalaktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çoğul dirençli bakteriler de etki alanına girmektedir [3, 4].

Tigesiklin, geniş etki alanı, önemli yan etkilerinin olmayışı ve direnç sorunu nedeniyle tedavisinde sıkıntılar yaşanan ve hastanede yatırılarak tedavisi gereken komplike deri, yumuşak doku infeksiyonları ve intraabdominal infeksiyonlarda FDA tarafından Haziran 2005' te onaylanmıştır [5, 6]. Yapılacak daha fazla sayıda çalışma ile başka endikasyonlarda da kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ayrıca ülkemize yeni girmiş olan bir antibiyotik olup direnç oranlarının çok düşük olması beklenmektedir. Bu çalışmada in vitro biyofilm modelinde tigesiklin ile vankomisin etkinliklerinin karşılaştırılması planlanmaktadır.

Amaç: Vankomisin büyük ve hidrofobik molekül yapısı nedeniyle dokulara geçişi çok iyi değildir. Ayrıca ciddi nefrotoksik ve hepatotoksik yan etkileri mevcuttur. Geçici ve kalıcı işitme kaybı yapabilmektedir.

Tigesiklinin geniş etki alanı yanında, önemli yan etkilerinin olmayışı, dirençli organizmalara karşı yüksek etkinlik göstermesi ve dokulara vankomisinden daha iyi geçmesi gibi avantajları mevcuttur.

Bu bilgiler ışığında in vitro MRSA'ya bağlı biyofilm modelinde vankomisin ve tigesiklin antibiyoterapi etkinliklerini karşılaştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER:

MRSA' nın Mikrobiyolojik Özellikleri

Stafilokoklar hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren, 0,5-1,5 µm çapında gram pozitif koklardır. Tek, çift, dördlü veya kısa zincirler şeklinde görülebilirler. Bakterilerin çoğalırken üç boyutta da bölünebilmeleri ve bölünmeden sonra tam ayrılmanın olmaması nedeniyle mikroskopik görünümüleri üzüm salkımı şeklindedir. İsimleri de Yunan alfabesinde üzüm salkımı anlamına gelen “stafil” kelimesinden gelmektedir. Çoğu fakültatif anaeroptur. Dış çevre şartlarına, kuruluğa, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklıdır. İnsanda nazofarinks, deri, giysiler, vajina, rektum, perine ve burunda (özellikle *S. aureus*) yaygın kolonizasyon gösterirler. İnsanda enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizmalardan birini oluştururlar. İnsandan insana hava yoluyla ve direkt temasla bulaşabilirler. İnsanda en virulan türlerin başında *S. aureus* gelir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* yabancı cisim ve üriner sistem enfeksiyonlarında önemli etkenler olmasına rağmen, *S. aureus* kadar yıkıcı enfeksiyonlara yol açmazlar.

Kanlı agarda ve basit besiyerlerinde kolayca ürerler. Kolonileri düz, opak ve konvektir. Yirmi dört saat inkübasyonda koloni çapı 1-3 mm olur. İnkübasyon süresinin 48-72 saate uzatılması hem koloni morfolojisinin belirginleşmesi hem de küçük koloni varyantlarının atlanmaması açısından yararlı olabilir. *S. aureus* β-hemoliz yapar. Koloni rengi genellikle krem rengi ile altın sarısı arasındadır, S tipi koloniler oluşturur. Kapsüllü suşlar mukoid koloni yapabilir. Stafilokoklar katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Glikozdan anaerobik ortamda asit oluştururlar. Çoğu %7,5 NaCl içeren basit besiyerlerinde, 18-45°C’de kolaylıkla ürer. Furozolidon ve lizostafine (200 µg/mL) duyarlı; basitrasine dirençlidirler. Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturular. Koagülaz testinin pozitifliği, mannitolü fermente etmesi ve deoksiribonükleaz (DNaz) pozitif olması *S. aureus*’ u insanda bulunan diğer stafilokok türlerinden ayırır [1, 7].

S.aureus suşları içerisinde tanımlanmasında zorluk yaşanan bir grup küçük koloni varyantlarıdır. Özellikle kistik fibrozisli hastaların solunum yolu enfeksiyonları ile yabancı cisme (kateter, eklem protezleri, şant) bağlı enfeksiyonlarda artan sıklıkla izole edilmektedirler. Bu bakteriler timidin sentezinde veya elektron transport sistemindeki kusurlar nedeniyle oluşan doğal alt topluluklardır. Metabolizmadaki değişiklikler sonucunda bu suşlar hemoliz yapmaz ve mannitolü fermente etmez. Koagülaz üretimi ise diğer suşlara göre daha zayıftır. Bu özellikleri nedeniyle otomatize sistemlerin kullanıldığı pek çok laboratuvar

yanlış tanımlanabilmektedirler. Yavaş üremeleri, konvansiyonel yöntemlerle metisilin direncinin saptanmasını zorlaştırmaktadır. Özellikle sık tekrarlayan stafilokoksik enfeksiyonlarda pinpon topuna benzer, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen gram pozitif kok üremesi mevcut ise küçük koloni varyantı *S.aureus* suşları akla gelmelidir. Tür tanımlaması ve metisilin direncinin belirlenmesinde özel besiyerlerinin ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemlerinin kullanılmasının doğru sonuç alınmasında önemli katkısı bulunduğu belirtilmektedir. Küçük koloni varyantlarının ilk rapor edildikleri dönemlerde yavaş üremeleri nedeniyle diğer *S.aureus* suşlarına göre daha az virülan oldukları öne sürülse de, yapılan deneysel endokardit ve osteomyelit çalışmalarında bu varyantların en az, hızlı üreyen ana topluluklar kadar virülan olduğu gösterilmiştir. Küçük koloni varyantları ökaryotik hücrelerin içerisine invaze olup fagositer hücrelerden korunarak varlıklarını sürdürebilir. Bu durum latent enfeksiyonlara yol açmalarında ana nedendir [8].

Penisilinin kullanıma girmesinden hemen sonra tek tük saptanabilen penisilin direnci bugün insanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarının %95' inden fazlasında görülmektedir. Bu direnç β -laktamaz (penisilinaz) isimli bakteri enziminin β -laktam halkasını parçalayarak penisilini inaktive etmesine bağlıdır. β -laktamaz enzimi sıklıkla başka antibiyotiklere direnç genlerini de taşıyan bir plazmitte bulunan *bla* geni tarafından kodlanır ve hücre dışına salınır. 1960'lı yıllarda β -laktamaza dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin) kullanıma girmiştir. Bu antibiyotikler aslında penisiline duyarlı stafilokoklara penisilinden daha az etkilidir. β -laktamaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra bu antibiyotiklere dirençli suşların olduğu saptanmıştır. Antibiyotiğin hiç kullanılmadığı ülkelerde bile dirençli suşların saptanması, bu direnç şeklinin stafilokoklarda daha önceden var olduğunu göstermiştir. Bu direnç şekline intrensek direnç veya metisilin direnci adı verilmektedir. Bu direnci gösteren bakteriler sefalosporinler de dahil tüm β -laktam antibiyotiklere dirençlidirler ve bu suşlara metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları denmektedir. MRSA suşları diğer *S. aureus* suşlarının sahip olduğu tüm patojenik ve biyokimyasal özelliklere aynen sahiptir ve aynı şekilde virulandır. Bu suşların metisiline direncini sağlayan özellik, metisiline duyarlı stafilokok suşlarında bulunmayan farklı bir penisilin bağlayan protein (PBP) içermeleridir. Bu PBP, normal stafilokok suşlarında bulunan PBP-1,2 ve 3' ten farklıdır ve PBP-2 α olarak adlandırılır. Bu enzim, sefalosporinler ve karbapenemler de dahil olmak üzere tüm β -laktam antibiyotiklere düşük afinitesi nedeniyle, antibiyotik varlığında aktivitesini devam ettirir ve bakteri hücre duvarının peptidoglikan

çapraz bağlarını bağlayarak bakterinin parçalanmasını engeller. PBP-2 α enzimi MRSA suşlarında bulunan *mecA* geni tarafından kodlanır. *MecA* geni SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) adı verilen mobil genetik elemanın bir parçasıdır. Bu gen metisiline duyarlı stafilokok suşlarında bulunmaz. *MecA* geni kromozom üzerinde IS431 ve IS527 insersiyon sekans elementleri arasında yerleşmiştir. Bu özellik gene başka bakterilere geçme ve yanına başka ilaç dirençleri alabilme özelliği de verir. MRSA suşlarının β -laktam dışı bir çok antibiyotiğe de çoklu direnç göstermesinin altında bu özellik yatmaktadır [9, 10].

S.aureus suşu virülansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak enfeksiyon olup olmaması mikroorganizma virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. *S.aureus* virülans faktörleri;

1. *Hücre yüzeyi bileşenleri:*

- Kapsül: Stafilokokların %90'dan fazlasında bulunan polisakkarit kapsül bakteriyi fagositozdan koruduğu gibi, aşı çalışmalarında da bu özellikten yararlanılmaktadır.
 - Peptidoglikan ve teikoik asit: *S.aureus* hücre duvarında bulunan peptidoglikan, endotoksin benzeri bir özellik gösterir. Monositlerden interlökin-1 salınımını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimini indükler. Makrofajlardaki toll-like reseptörlerle etkileşime girerek fagositik hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır. Diğer bir hücre duvarı bileşeni olan teikoik asit de kompleman aktivasyonu ve mukozal hücrelere yapışmada rol oynar. Peptidoglikan ve teikoik asidin stafilokok enfeksiyonlarının patogeneğinde indirekt rol aldıkları düşünülmektedir.
 - Yüzey adezinleri: *S.aureus*' un deri ve mukozal yüzeylere kolonize olması, bakteri yüzeyinde bulunan MSCRAMM (microbial surface component reacting with adherence matrix molecules)' lerin konak proteinlerine yapışması ile ilişkilidir. Bunların başlıcaları "clumping factor", fibronektin bağlayan protein, kollojen bağlayan protein ve protein A'dır.
 - Biyofilm: "Slime", bazı stafilokoklar tarafından oluşturulan polisakkarit yapıli ekstrasellüler bir maddedir. Biyofilm, yabancı yüzeyde kendi oluşturduğu slime tabakası içinde gömülü vaziyette bulunan bakteri topluluğudur. Daha çok KNS' ler tarafından oluşturulur ve kateter vb yabancı cisim enfeksiyonlarında görülür.
2. *Enzimler:* Katalaz, fagosite edilmiş bakterilerin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar. Koagülaz, hücre dışına salınmış

veya hücre yüzeyine bağlı şekilde bulunur, trombinle bağlanarak onu aktif hale getirir ve fibrinojenden fibrinin polimerizasyonunu sağlar. “Clumping factor”, hücre duvarında fibrinojene bağlanarak *S.aureus*' un fibrinojen ve fibrine yapışmasının sağlayan bir reseptör görevi görür. Hyalüronidaz hücreler arası matrikste bulunan hyaluronik asidi parçalar. β -laktamaz, plazmidle kodlanır ve antibiyotik direncinden sorumludur. Ayrıca nükleaz ve lipaz enzimleri de vardır.

3. *Toksinler*: *S.aureus*' un ürettiği toksinler hemolizinler, lökositin, epidermolitik toksin, enterotoksinler ve toksik şok sendrom toksini-1 (TSST-1) 'dir. Hemolizinler (a-b-g-d) hücre membranını etkileyen sitotoksik toksinlerdir ve hemolizden sorumludurlar. β -hemolizin ayrıca sfingomyelinaz aktivitesine sahiptir. Panton Valentine lökositini (PVL) bir tür γ -hemolizin olup, türler arasında aktarılabilir. *S.aureus* suşlarının %2'sinde bulunur ve özellikle çocuk ve genç erişkinlerdeki cilt enfeksiyonları, pnömoniler ve toplum kökenli MRSA enfeksiyonlarında saptanır [1, 11].

Eksfoliyatif toksin A ve B, daha çok yenidoğanlarda görülen haşlanmış deri sendromuna yol açar. Derinin stratum granulozum tabakasında hücreler arası desmozomları parçalayarak etki gösterir. Dokuya spesifik bir serin proteaz enzimidir ve süperantijen olarak kabul edilir. Eksfoliyatif toksin A kromozom tarafından, eksfoliyatif toksin B plazmid tarafından kodlanır. Toksine karşı spesifik nötralizan antikorlar koruyucudur.

Toksik şok sendromu toksini (TSST) ateş, deskuamasyonlu deri döküntüleri, hipotansiyon ve çoklu organ yetmezliği ile seyreden toksik şok sendromuna yol açar. Aynı hastalık koagülaz negatif stafilokoklar ve *Streptococcus pyogenes* tarafından da oluşturulabilmektedir [1].

İnsandan izole edilen *S.aureus* suşlarının yaklaşık yarısı enterotoksin üretir. Serolojik olarak birbirinden farklı 15' ten fazla enterotoksin bulunur. Bunlar stafilokokal besin zehirlenmesinden sorumludur. İnsanda en sık rastlananlar enterotoksin A, B ve C' dir. Daha önce enterotoksin F olarak adlandırılan toksinin yukarıda bahsedilen stafilokokal TSST-1 olduğu anlaşılmıştır. Enterotoksin B ve C aynı zamanda TSST-1 ile beraber TSS' a da yol açar. TSST-1, eksfoliyatif toksin ve enterotoksinler süperantijenler olarak adlandırılır [1, 12].

Süperantijenler, monosit-makrofajlar üzerindeki MHC clas-II reseptörlerinin antijen bağlayan kısmının dışında bir bölgesine yüksek bir afinite ile bağlanır ve bu

kompleks T lenfositlerinin bazı alt gruplarının üzerinde bulunan T hücre reseptörlerinin variable (Vb) bölgesi tarafından nonspesifik olarak tanınır ve bu T hücrelerinin tümünün aktivasyonuna sebep olur. Sonuçta interlökin-1, TNF, interferon- γ salınımına yol açar. Normal bir antijen MHC class-II molekülü ile sadece kendisine spesifik T hücre moleküllerini uyarırken, çok az miktardaki süperantijen, belli bir alt gruptaki T hücrelerin tümünü antijen spesifikliğine bağlı olmadan uyararak aşırı sitokin salınımına neden olur ve sonuçta toksik şok sendromuna yol açar.

Tüm bu virülans faktörleri bir takım genetik düzenleyicilerin kontrolü altındadır. Bunların başlıcaları *agr* (accessory gene regulator), *sae* (*S.aureus* ekzoproteinleri) ve *arlS* (autolysis-related locus sensor)'dir. [13]

4. *Konağa bağlı faktörler: S.aureus* enfeksiyonundan önce bakterinin konak hücrelerine kolonizasyonu gereklidir. Burun mukoza hücrelerine yapışma teikoik asit ve diğer ligandlarla olur. *S.aureus*, bütünlüğü bozulmuş deri, yabancı cisim ve endotel üzerinde bulunan fibrinojen, fibronektin, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, kemik siyaloproteini ve kollojene bakteri yüzeyindeki fibronektin bağlayan protein A ve B, kollajen bağlayan protein, elastin bağlayan protein ile bağlanır. Fibrinojene "clumping factor" ile bağlanır [1, 7, 8].

S.aureus mukoza veya epitel tabakasını bir şekilde geçince polimorfonükleer lökositler ve monosit-makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bakteriye bağlı peptidoglikan, teikoik asit ve protein A'nın uyarımı sonucu kompleman sistemi aktive olur. Bunun sonucunda oluşan C5a'nın etkisi ile fagositik hücrelerin bakterilerin bulunduğu yere göçü gerçekleşir.

S.aureus'un fagositozu, spesifik IgG ve aktive olan kompleman sisteminin (C3b) opsonizasyonu ile artar. Bakteri tarafından üretilen, hücre yüzeyinde bulunan, aynı zamanda serbest olarak ortama salınan protein A, IgG molekülünün Fc parçasına bağlanarak hem komplemanın harcanmasına yol açar, hem de bakteriye bağlanan IgG'ye fagositlerin bağlanmasına engel olur. Ayrıca bakteri yüzeyindeki protein A'ya Fc kısmıyla ters olarak bağlanan IgG'ler yüzeyi kaplayarak kompleman ve diğer spesifik IgG'lerin bakteri yüzeyine bağlanmasını engelleyici etki yaratır, nonspesifik ve spesifik immün mekanizmaları bozar.

Kemotaksis fonksiyonunun bozuk olduğu Job's sendromu, Chediak-Higashi sendromu, Wiskott-Aldrich sendromu ve Down sendromu hastalarıyla romatoid artrit

ve ketoasidozdaki diabetes mellitus hastaları ağır *S.aureus* enfeksiyonlarına daha yatkındır. Agamaglobulinemi ve C3-C5 eksikliği de ağır *S.aureus* enfeksiyonlarına yatkınlığı arttırır. Fagositik hücre fonksiyon bozukluğuyla giden kronik granüloamatöz hastalıklarda ve lenfoblastik lösemi, akut ve kronik miyelositik lösemi durumlarında stafilokok enfeksiyonları daha sık ve ağır seyreder [1, 7].

Biyofilm Tabakası ve Özellikleri

Bakterilerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu oluşan, opak yapıda, ortalama 100-500 µm yükseklikte, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi çok zor olan yapıya biyofilm denir. İlk olarak 1978 yılında tanımlanmıştır. Daha önce bakterilerin sıvılar içinde tek tek bulunduğu (planktonik) düşünülürken tam aksine canlılıklarını sürdürmek için katı yüzeylere ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskopunun yaygınlaşması ve lazer mikroskoplarının kullanıma girmesi ile yapıları daha iyi anlaşılmıştır [14, 15].

Biyofilm tabakası, önceleri bakteri toplulukları ve etrafındaki ekzopolisakkarit (EPS) yapı olarak bilinirdi. Lazer mikroskopu ile daha heterojen ve karmaşık bir yapı olduğu anlaşıldı. Yaklaşık olarak %85 matriks ve %15 bakterilerden oluşmaktadır. Bakteriler, matriks içindeki kule ve mantar şeklinde yapılar içinde bulunur. Mikrokoloniler arasında açık su kanalları mevcuttur.

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri dört madde altında toplanabilir. Bunlar sırasıyla:

1. EPS çevreden besin maddelerini (C - N - PO₄ gibi) konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.

2. Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyal maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı direnç geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile up-regülasyon ya da down- regülasyon yöntemiyle modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.

3. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanısıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiallere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.

4. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler [14].

Biyofilmin mikrobiyal hücreler ve EPS ana iskeletinden oluştuğu, EPS'nin toplam organik karbonun % 50 – 90' ını barındırarak ana maddeyi (matriks) oluşturduğu kabul edilmiştir. EPS' nin kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik gösterse de öncelikli olarak polisakkaritten oluştuğu, polisakkaritlerden bir kısmının doğal, bir kısmının da anyonik yapıda olduğu ortaya konmuştur. Uronik asitlerin (D-glucuronic, D-galacturonic ve mannuronic asitler) ya da ketal bağlantılı piruvatların bu yapıya anyonik özellik kattığı bildirilmiştir [16, 17]. Biyofilmde gram pozitif bakterilerin varlığında EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur [18]. EPS'nin yüksek seviyede su içerdiği ve yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar barındırdığı bildirilmiştir [16]. Yapılan paralel bir çalışmadaysa hidrofilik bölümlerde yapının % 93' ünün su olduğu bildirilmiştir [19]. Hem hidrofilik, hem de hidrofobik yapıların bir arada olduğu EPS varlığı, çeşitli bakterilerce oluşturulan biyofilmde tanımlanmıştır [20].

Ekstrapolimerik matriks'i su (%90), ekzopolisakkaridler, protein, nükleik asitler ve diğer moleküller (eritrosit, trombosit, fibrin, mineral kristalleri, toprak, metal korozyon artıkları) oluşturur. Ekzopolisakkaridler, biyofilm yapısının ana iskeletini oluştururlar.

Oluşum aşamaları; tutunma yüzeyinin oluşumu, öncü bakterinin tutunması, "slime" (müköz yapı) oluşumu, sekonder kolonizasyon, olgun biyofilm şeklindedir. Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler; çevre koşulları (sıcaklık, pH, besin maddeleri, antibiyotik varlığı vb), bakteriyel faktörler (türü, miktarı, flagella, pili, fimbria veya glikokaliks yapılarının varlığı), tutunma yüzeyinin özellikleri ve hidrodinamik özelliklerdir.

Katı – sıvı etkileşim yüzeyi ve sıvı besi ortamın bakterilerin tutunması için ideal ortamı hazırladığı bildirilmiştir. Tutunma olgusunu açıkça ortaya koyabilmek için yüzey, yüzeyde hazırlayıcı film oluşumu, sıvı besi ortamının hidrodinamiği, sıvı ortamın özellikleri ve hücre yüzeyinin çeşitli özellikleri aşağıda verilmiştir:

1. Yüzey etkileri
2. Hazırlayıcı film
3. Sıvı besi ortamının hidrodinamiği
4. Sıvı ortamın özellikleri
5. Hücre yüzeyinin özellikleri

Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, EPS üretimi, fimbria, flagella varlığının tutunmayı etkileyen faktörlerden olduğu bildirilmiştir. Hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı, yüzeyin hidrofobik ve non-polar özelliği ile bir örneklik göstermesiyle tutunmanın sağlandığı ortaya konmuştur. Çoğu hücrenin negatif yük taşımakta olduğu, bunun da sıvı akışı ile şarj olan yüzeye yapışmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Fimbria ya da pilus gibi yapıların hücrelerin hidrofobik özellikte kalmasına yardımcı olduğu, hatta aynı çalışmada incelenen çoğu fimbria yapısının hidrofobik aminoasit kalıntılarına sahip olduğu bildirilmiştir. Fimbria'nın, yüzeye arada bulunan akıma karşı gelerek tutunmayı sağladığı bildirilmiştir [21].

Yüzeye tutunan hücrelerin genlerinde up-regülasyon ya da down- regülasyon olduğuna dair değişik çalışmalar bulunmaktadır. Akışın olduğu bir sistemde tutunan *Pseudomonas aeruginosa*' da ilk birkaç dakika içinde *algC* up-regülasyonu olduğu ve bu düzenlemenin, *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgü olmadığı, biyofilm yapısındaki bütün bakterilerde genetik bir up-regülasyon ya da down- regülasyon olduğu bildirilmiştir. *S. aureus* biyofilminde glikoliz ve fermentasyon ile ilgili genlerin up-regüle olduğunu bildirilmiş, bunu da oksijen azlığına bağlı olarak bakterinin canlılığını sürdürebilmesi için fermentasyona başlaması gerektiği düşüncesi ile açıklamaya çalışmışlardır. Başka bir çalışmada *algD*, *algU*, *rpoS* ve polifosfokinaz (PPK) sentezini kontrol eden genlerin, *P. aeruginosa* biyofilminde up-regülasyonu düzenlendiği ortaya konmuştur [14, 22].

Biyofilmin en küçük biriminin mikro koloni olduğu bildirilmiştir [23]. Mikro kolonideki hücrelerin yakınlığının; besin maddesi sentezi, gen değişimi ve Quorum Sensing (Mikrobiyal Populasyon Etkileşimi) için ideal ortamı sağladığı belirtilmiştir. Farklı mikroorganizmalardan oluşan mikro kolonilerde ise redoks reaksiyonlarına bağlı olarak, değişik elementlerin (nitrojen, sülfür, karbon, oksijen) alışverişinin görüldüğü bildirilmiştir [24].

Bakterilerin genetik yapısında meydana gelen değişikliklerin çok çeşitli olduğu, bunların hücrenin bulunduğu ortam, diğer hücrelerle etkileşimleri ve kendi içlerindeki değişimlere bağlı olarak, geniş bir perspektif sergiledikleri bildirilmiştir[25]. Biyofilmin ekstrakromozomal DNA (plazmid) değişimi için ideal yapı olduğu ortaya konmuştur. Konjugasyonun biyofilm hücrelerinde, planktonik yapıdakilerden daha fazla görüldüğü bildirilmiştir[26]. *Escherichia coli*' ye ait F plazmidinin aktive olarak sentezlettiği, F konjugatif pilusunun hem hücre yüzeyi hem de hücre ile başka bir hücre arasında yapışma faktörü olduğu ortaya konmuştur. Donör hücrelerden, alıcı hücrelere aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabileceği

bildirilmiş ve buna bağlı olarak, biyofilmin antibakteriyellere karşı gelişen direncin yayılmasında önemli rol oynayabileceği iddia edilmiştir [27].

Biyofilm oluşumunun genetik analizi sonucu ekstrasellüler sinyaller ve QS düzenleme sistemlerinin biyofilmin varlığı için önemli olduğu bildirilmiştir [28]. *P. aeruginosa*' ya ait biyofilm oluşumu ile ilgili genlerden *lasR-lasI* ve *rhlR-rhII* uyarım sistemleri gösterilmiştir. Bu genlerden herhangi birinin uyarımı sonucu, yeterli sayıda biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin önce mikro koloniler oluşturduğu, daha sonra ince bir biyofilm tabakası meydana getirdikleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, uyarılmış biyofilmin tutunma yüzeyinden surfaktanlar ile kolayca yerinden söküldüğü saptanmış bunu takiben mikro kolonilerin olduğu ortama Homoserin Lakton eklendiğinde, normal yükseklikte biyofilm oluştuğu gösterilmiştir [29].

Açıl Homoserin Lakton (AHL) sistemi bir grup gram negatif bakteride, auto indükleyici 2 sistemi (AI2) gram pozitif ve gram negatif bakterilerde, peptit bağlantılı sistem ise, gram pozitiflerde tanımlanmıştır. AHL temelli QS sisteminin hem biyofilm oluşumunu hem de bakterilerin iletişimini sağladığı ve topluluktaki hücrelerin QS ajanı olan AHL' nin yoğunluğu ile, çoğunluk oranlarını çözdükleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, AHL'nin diğer QS ajanlarından farklı olarak, kolonizasyondan da sorumlu olduğu ortaya konmuştur [28].

Bakterilerin biyofilm yapısında buldukları zaman çeşitli antimikrobiyal ajanlara, antiseptik ve endüstriyel biyositlere daha dirençli oldukları, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 10-1000 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir [30]. Bakterilerin antibiyotik direncinin bilinen mekanizmaları; dışarı atım pompaları (efflux pompaları), enzim modifikasyonları, belli hedeflerin mutasyonlarıdır. Ancak bu mekanizmaların biyofilm bakterilerinde gerekmediği ortaya konmuştur. *Klebsiella pneumoniae* 'ya ait β -laktamaz negatif suşun planktonik halinin 2 mg/ml ampisilin bulunan sıvı ortamda inhibe olduğu, aynı planktonik bakterinin biyofilm geliştirdikten sonra inhibisyonu için 5000 mg/ml ampisilin gerektiği ve bu miktarın planktonik hücrelerin yaklaşık % 66'sının inhibisyonuna yeterli olduğu bildirilmiştir [31]. Biyofilimde direnç için; bakteriler arası konjugasyon, plazmid, EPS varlığı ve QS çeşitli bakterilerin katılımı ile oluşan bir populasyonda bazı mikroorganizmaların yüzeye yerleşerek kalkan görevi görmesi gerektiği saptanmıştır [15, 32]. Bazı antibiyotikler oksijenli ortamda daha etkindir. Bu tür antibiyotiğin etkisinin biyofilmin anaerob ve mikroaerofilik alanlarında azalacağı, üst tabakalarda bulunan bakterilerinse antibiyotikten etkilenseler bile koruyucu özelliklerini koruyacakları ortaya konmuştur [33].

Sıklıkla biyofilm içeren enfeksiyonlar; doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit ve medikal araçlarda (prostatik kalp kapakları, santral venöz kateterler, üriner kateterler, kontakt lensler, intrauterin araçlar) gelişen enfeksiyonlardır.

Biyofilm tanısı için; tekrarlayan kan kültürleri ve kateter içinden kültür alınması, kateter kültürleri (roll-plate), lümen içi fırçalama tekniği, vorteks, florasan boyama ve elektron mikroskop yöntemleri önerilmektedir.

Tedavi stratejileri olarak ise; medikal araçlara kontaminasyonun engellenmesi, bu araçlara ilk mikrobiyal saldırı (bakteriyemi) miktarını minimal düzeye indirmek, biyofilm içine penetre olan antibiyotiklerle tedavi etmek ve antibiyotik kilit tedavisi, medikal aracın çıkarılması, ultrasound tedavisi, düşük akım elektrik tedavisi, enzim tedavisi (alginat lyase), Quorum-sensing sistem inhibisyonu, gen tedavisi, antibiyotik kaplı santral venöz kateterler ve üriner kateterler denenebilir.

Antibiyotik kilit tedavisi, komplike olmayan kateter enfeksiyonlarında yüksek konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu ile kateter lümeninin doldurulması ile kateteri sterilize etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Kateter Enfeksiyonları

Damar içi kateterler sıvı ve elektrolitlerin, kan ve kan ürünlerinin, ilaçların, parenteral besinlerin verilmesi, hemodinamik izleme, hemodiyaliz uygulamaları, kan örneklerinin alınması gibi pek çok nedenle uygulanır. Bu araçların çoğu periferik kateterlerdir. Santral kateterler özel amaçlar ile kullanılan ama kullanımları da giderek artan kateterlerdir. Santral venöz kateterlerin kullanım endikasyonları TPN, hemodiyaliz, aferez, hemoferez, santral venöz basınç ve O₂ ölçümü, özel ilaçların uygulanması ve basit venöz yollar sağlamak amacı ile özetlenebilir. Hastanelerde özellikle yoğun bakım ve yanık ünitelerinde, onkoloji-hematoloji kliniklerinde enfeksiyon kontrol önlemlerinin aksaması ile birlikte kateter enfeksiyonlarının sıklığı belirgin olarak artmaktadır. Kateter ile ilişkili enfeksiyonlar için risk faktörleri hastanenin tipi ve büyüklüğüne, ünitenin tipine, kateterin uygulama bölgesine, kateterin kalış süresine, kateter bakım işlemlerine, personelin eğitimine, hastanın altta yatan hastalığına göre değişebilir. Özellikle yoğun bakımdaki ve immunsuprese hastalarda olmak üzere kateter ile ilişkili gelişen bakteriyemilerde mortalite oranı %12–25 arasındadır. Kateter ile ilişkili bakteriyeminin bir atağının tedavi maliyeti 29 000–56 000 dolar iken 6,5–22 ek

yatış gününe neden olmaktadır. Kateter enfeksiyonları toplam sıklığı, kateter tipleri arasında değişmek ile birlikte %3–20 arasındadır. Yine kateterin yapıldığı materyal de enfeksiyon sıklığını etkilemektedir. Bu nedenle mortalite ve maliyeti bu kadar yüksek olan bir enfeksiyonun önlenmesi temel amaçtır. En üst düzeyde steril bariyerlerin kullanılması, kateter ekiplerinin kurulması, kateter giriş bölgesine optimal lokal bakım uygulanması, sürekli eğitim gibi pek çok önlemlerin birlikte alınması gereklidir. Ancak enfeksiyon geliştikten sonra doğru yönetimi de gereklidir [34, 35].

Kateter enfeksiyonlarında lokal ve sistemik bulgular saptanır. Lokal enfeksiyonlardan sistemik enfeksiyonlar gelişebilir. Periferik kateterler ile ilişkili bakteriyemili olguların yarısında lokal inflamasyon bulguları vardır. Kateter enfeksiyonlarının seyri sırasında endokardit, osteomyelit, septik artrit, menenjit gibi komplikasyonlar gelişebilir. Kateter kolonizasyonu, kateter giriş yerinde herhangi bir enfeksiyon belirtisi olmadan ve bakteriyemi olmadan kateter yüzeyinden (kateter ucu, subkutan kateter segmenti, kateter birleşme yeri-hub) uygun metot ile alınan kültürde mikroorganizmanın üremesi durumudur. Semikantitatif (roll plate) veya kantitatif yöntemler (vorteks ve sonifikasyon) ile alınan kateter yüzey kültürlerinde (hub, subkutan kateter segmenti, kateter ucu) semikantitatif kültürde ≥ 15 cfu, kantitatif kültürde $\geq 10^3$ cfu/mL bakteri üremesi durumu olarak tanımlanır [34-38].

Filebit, kateter takılı vendede inflamasyon olmasına bağlı olarak kateter çıkış yeri etrafında endürasyon veya eritem, sıcaklık ve ağrı/hassasiyet oluşmasıdır [34, 39-41].

Çıkış yeri enfeksiyonu, kateter çıkış yerinde deri kısmının < 2 cm mesafede kızarıklık, hassasiyet, şişkinlik, pürülan akıntı, ateş gibi klinik bulguların varlığında kantitatif veya semikantitatif kateter kültürlerinde üreme olması veya klinik bulgular eşliğinde kateter çıkış yeri eksüdasında mikroorganizmanın üremesidir [34-37, 42-44].

Cep enfeksiyonu, total implante kateterin rezervuarı üzerindeki deride hassasiyet, eritem, endürasyon, bazen nekroz olması veya rezervuarı içeren deri altı cepte pürülan eksudanın olmasıdır. Türk Hastane Enfeksiyonları ve Kontrolü Derneği'nin kılavuzuna göre eşlik eden kan dolaşımı enfeksiyonunun olmaması gerekmektedir. [34-37]

Tünel enfeksiyonu, tünelli bir kateterin giriş yerinden > 2 cm uzak bölgelerde, deri altındaki tünel boyunca kızarıklık, ağrı, şişlik belirtileri (sellülit) olması olarak tanımlanır. Birlikte kan dolaşımı enfeksiyonu olabilir ama olması şart değildir. Türk Hastane Enfeksiyonları ve Kontrolü Derneği'nin kılavuzunda çıkış yeri enfeksiyonu, cep enfeksiyonu

ve tünel enfeksiyonu tanımlaması için eşlik eden kan dolaşımı enfeksiyonu olmaması gerektiği vurgulanmaktadır [34-37].

Kateter ile ilişkili bakteriyemi (kan dolaşım enfeksiyonu), ateş, üşüme, titreme, hipotansiyon, taşikardi, lökositoz gibi bakteriyemi bulguları olan kateterli bir hastada başka bir enfeksiyon odağı saptanmaması, kateter parçasından semikantitatif veya kantitatif yöntem ile alınan kültürde veya kateterden alınan kan kültürü ve periferik venden alınan kandan benzer biyotip ve direnç paternine sahip bir bakteri veya mantarın izole edilmesi durumudur. Tanıda aşağıdakilerden birinin olması gereklidir [34, 44].

- Çıkarılan kateter segmentinde yarı kantitatif kültürle ≥ 15 cfu, kantitatif kültürle $\geq 10^3$ cfu/mL üreme olması
- Kantitatif kültürlerde, kateterden alınan kandaki üremenin, periferik venöz kana göre koloni sayısı bakımından beş kat fazla olması
- Otomatize kültür sistemlerinde, santral venöz kateterden alınan kanda, eş zamanlı alınan periferik kan örneğinden en az iki saat önce üreme olması
- Periferik kanda üreme olmadığında, kateter kanında $\geq 10^{2-3}$ cfu/mL üreme olması (Candida türleri için 25 cfu/mL)
- Bakteriyemi bulguları olan ama laboratuvar olarak doğrulanamayan bir hastada sorumlu tutulan kateterin çıkarılmasından sonra düzelme olması (indirekt bulgu)
- İnfüzyon sıvısı ilişkili olarak infüzyon sıvısı ve hemokültürde aynı bakterinin üremesi (saptanan başka bir enfeksiyon odağı olmaması koşuluyla)

Primer kan dolaşımı enfeksiyonu için sürveyans tanımları:

Laboratuvar olarak kanıtlanmış enfeksiyon: Başka bir bölgedeki enfeksiyon ile ilişkisi olmaması koşulu ile aşağıdaki kriterlere uyumluluk göstermesidir [36].

1. En az bir kan kültüründen patojen bir mikroorganizmanın izole edilmesi ve bu patojenin başka bir yerdeki enfeksiyon ile ilgisi olmaması
2. Hastada ateş, titreme veya hipotansiyon bulgularından en az birinin olması ve aşağıdaki kriterlerden en az birinin olması
 - a. Ciltten kontamine olabilecek bir mikroorganizmanın farklı zamanlarda alınmış iki veya daha fazla sayıda kültürde üremesi (Difteroidler, *Bacillus* türleri, *Propionibacterium* türleri, KNS veya mikrokoklar)

- b. IV kateteri olan bir hastada ciltten kontamine olabilecek yukarıda sayılan mikroorganizmaların en az bir kan kültüründe üremesi ve doktorun uygun antimikrobiyal tedaviye başlaması
 - c. Kanda patojene ait antijenin saptanması (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* veya grup B streptokoklar)
3. < 1 yaş olan bebeklerde başka bir yerdeki enfeksiyon ile ilgili klinik, laboratuvar bulguları olmadan ateş, hipotermi, apne, bradikardiden en az birinin olması ve ek olarak yukarıda sayılan a, b, c maddelerinden birinin olması durumudur.

Klinik sepsis: Kan kültürü alınmamış veya kan kültüründe üreme olmamış veya kanda patojen bakteriye ait antijen saptanmamış ve herhangi bir yerde gösterilmiş bir enfeksiyon olmaması ve kateterin çıkarılması veya değiştirilmesini takiben ampirik antimikrobiyal tedaviye klinik yanıt olmasının yanısıra aşağıdaki belirti ve bulgulardan birinin olması gereklidir [34, 36, 44].

- Ateş (> 38 °C)
- Hipotansiyon (sistolik kan basıncı \leq 90 mmHg)
- Oligüri (< 20 ml/h)

Septik tromboflebit, ven içi kateter yerinde enfekte pıhtı varlığıdır [34, 39].

Endarterit, arter kateteri distalinde doku iskemisi veya emboli bulguları ile gelişen durumdur [34, 39].

İnfüzyon sıvısına bağlı bakteriyemi, gösterilen başka bir enfeksiyon kaynağı olmadan infüzyon sıvısından ve perkutan yolla alınan kan kültüründen aynı mikroorganizmanın üremesi durumuna denir [34, 36].

Etiyopatogenez

Kateter enfeksiyonları kateter ve mikroorganizma arasındaki ilişki sonucu gelişir. Mikroorganizmalar için potansiyel giriş yolları deri, kateter giriş kapıları ve infüzyon sistemleridir. Başka bir deyişle cihazın intraluminal veya ekstraluminal yüzeylerinden girmelidir. Normal deri florası veya patojenik mikroorganizmalar tarafından giriş bölgesinin

kolonizasyonu en önemli faktördür. En önemli kaynak deridir. Bu nedenle hastanın veya sağlık personelinin derisinden gelen flora elemanların kontaminasyonu primer kaynaklardır. Kateterin girdiği yerlerde deri bütünlüğü bozulmuştur. Kontaminasyon, kateteri takma sırasında veya daha sonrasında olur. Kemoterapi veya graft versus host reaksiyonuna ikincil gelişen deri lezyonları derinin doğal koruyucu bariyerlerini bozarak da katkıda bulunur. Hemen tüm vasküler kateterler mikroorganizmalar ile kontaminedir. Biyofilm ile kateterin iç yüzeyinin endojen olarak kaplanması yaklaşık 24 saat alır. Bu mikroorganizma ve konak tarafından oluşturulan biyofilm tabaka polisakkarit, fibrin, fibronektin, lamininden oluşur. Mikroorganizmalar bu biyofilm tabakası içinde saklanarak konak savunma sisteminden ve antibiyotiklerden korunur. Biyofilm tabaka kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda en önemli patojenik mekanizmadır. Kateter yerleştirilmesi sırasında gelişen mikrotravma intravasküler kateter ucunda küçük trombusların gelişimine neden olur. Böylece bakterilerin yerleşebileceği bir zemin hazırlar. Kateterin kolonizasyonundan sonra organizma biyofilm içinde çoğalır ve göç etmeye başlar. Yabancı cisim etkisi gösteren kateter, nötrofillerin fagositoz ve mikroorganizma öldürme gücünün azalmasına yol açarak bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etkide bulunur. Silikon kateterler komplemanı aşırı olarak aktifleştirerek enfeksiyon gelişimini arttırır [34-36, 39, 45].

Mikroorganizmaların katetere yapışması, kateterin fizyolojik ve bakterinin yüzey özelliklerine (yüzeyin kalitesi, elektrik şarjı, hidrofobi) bağlıdır. Hidrofobik stafilokok ve kandida türleri PVC ve silikon kateterleri teflon ve poliüretandan yapılan kateterlere göre daha fazla kolonize ederler. Bakterilerin kateter üzerine yapışma kabiliyetleri, yüzeylerinde bulunan fibronektin ve diğer konak proteinlerine bağlıdır. *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* slime faktörü ile katetere yapışır. Yine gram negatif bakteriler fimbriaları ile konak hücre glikoprotein veya glikolipidlerine yapışır. Bakterilerin protein maddelere yapışmasında elektromanyetik güçler de rol alır [34, 36].

Kanül ve infüzyon setinin birleşim yerine hub denir. Bu bölge özellikle santral venöz kateterde enfeksiyon kaynağı olabilir. Bu bölge, kateter bakımı veren personelin ellerinden veya hematogen yolla kontamine olabilir. Endemik KNS enfeksiyonlarının önemli bir kaynağı olabilir. İnfüzattan manüplasyonlar veya kateter hareketleri ile, kan akımına karışır ve sistemik enfeksiyona neden olur. Kısa süreli (≤ 8 gün) periferik kateterlerde esas olarak kateterin dış yüzeyinden ekstraluminal yayılım olur. Başka bir deyişle kateterlerde derideki mikroorganizmaların göç etmesi sonucu enfeksiyon gelişmesi en sık geçiş yoludur. Bu

kateterlerin % 75-90' ında giriş yerinin kolonizasyonu 24 saat içinde başlar. Bu tür kateterlerde kolonizasyonun diğer kaynakları kateter hub/lümen (%10–50), kan akımı (%3–10) ve infüze edilen sıvılar (%2-3) dır. Uzun süreli kateterlerde ise özellikle intraluminal yayılım en siktır. Kateter hub/lümen (%66) kontaminasyonu ve deri (%26)'den kolonizasyon en sık yollardır. Kateterlerde intraluminal kolonizasyona neden olur. Nadiren başka bir odaktan hematogen yol ile kateterlere bakterilerin ulaşması ile enfeksiyon gelişir. Santral venöz kateter ile ilişkili enfeksiyona neden olan *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyonların %50'sinde kaynak sindirim sistemidir. Nötropenik hastalarda *Enterobacter* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmalar translokasyon ile geçebilir [34-36, 40, 42].

Yine daha az oranda infüzetin kontaminasyonu ile enfeksiyon gelişebilir. Epidemik intravenöz kateter ile ilişkili bakteriyemilerin en önemli nedenidir. İnfüzetin kontaminasyonu ya üretim aşamasında veya kullanıma hazırlanırken olur. İnfüzetin içeriği de patogeneizde rol oynayabilir. Distile su bile bu anlamda kaynak olabilir (*Burkholderia cepacea complex*). Bu nedenle gelişen sepsislerde sorumlu genelde tek bir etken olur. Parantral beslenme solusyonları belli mikroorganizmaların üremesi için uygun ortam oluşturabilir. Örneğin kazein hidrolizat bakteriler ve mantarların, lipid emülsiyonlar *Malessezia furfur*'un bulaşına neden olabilir. Yine yenidoğanlarda KNS bakteriyemilerinden lipid solusyonları sıklıkla sorumlu tutulabilir. Bazı *Candida* türleri ise glikoz içeren sıvılarda slime faktör oluşumunu arttırabilir. İnfüzetin içeriği, sıvının giriş yerinde vasküler intimanın zedelenmesinde primer rol oynayabilir. Sıvı izotonik değildir. Nonfizyolojik pH ve partikül içeren sıvılar vasküler duvarı irrite edebilir ve trombüs oluşumuna neden olabilir. Bu gibi trombüsler mikroorganizmaların hem hematogen hem de direkt yolla etrafa saçılmasına neden olurlar [34-36, 39, 40, 42].

Risk faktörleri

Kateter ve konağa ait bazı faktörler kateter ile ilişkili enfeksiyonların gelişimine katkıda bulunur. Hastanın altta yatan hastalığı ve bağışıklık sisteminin baskılanması en önemli risk faktörüdür. Yine kateterin süresi, sık sık manipüle edilmesi, kateterin konduğu bölge, kateterden verilen materyal önemlidir. Multilumen kateterin kullanımının enfeksiyon için bir risk olup olmadığı belli değildir. Bu nedenle tek lumenliler tercih edilir ama açıklaması yeterli değildir. Ancak lumen sayısı ve çapı en az tutulmalıdır [34]. Santral venöz kateterlerin hepsinin olanak dahilinde ultrasonografi eşliğinde uygulanması önerilir fakat hastanenin

olanakları da göz önüne alınmalıdır. Yine tünelli kateterlerin de uygulanmasında görüntüleme yöntemlerinin yeri önemlidir. Kateterin ameliyathane ortamında veya benzer temiz bir ortamda takılması gereklidir. Yatak başı uygulama acil durumlar dışında tercih edilmemelidir.

Konağa Ait Faktörler:

- Yaş (< 1 yaş ve > 60 yaş)
- Granülositopeni
- İmmüsupresif tedavi
- Deri bütünlüğünün bozulması (yanık, psoriasis vb)
- Altta yatan hastalığın şiddeti
- Diğer bölgelerde aktif enfeksiyon varlığı
- Hastanın deri mikroflorasında değişiklik olması
- Hastanın el yıkama alışkanlığının yeterli olmaması

Hastane ve Sağlık Çalışanlarına Ait Faktörler:

- Kateterin acil yerleştirilmesi
- Kateterin temiz olmayan bir ortamda yerleştirilmesi
- Tecrübesiz personel
- Yetersiz sayıda personel, iş yükünün fazla olması
- El yıkama alışkanlığının yeterli olmaması
- Pansumanda yetersizlik
- Eğitim veren büyük hastaneler
- Hastanın yattığı birim (yoğun bakım, onkoloji, yanık vb)

Katetere Ait Faktörler

- Kateterin tipi (plastik > çelik, polinivil > teflon ve poliüretan)
- Uzun, kalın, sert, çok lümenli kateterler > Kısa, ince, fleksibl, tek lümenli
- Kateterin yeri (santral > periferik, jugular > femoral> subklavian, alt ekstremitte > üst ekstremitte)
- Kateterin yerleşme şekli (cutdown > perkutan, perkutan yerleşmiş santral

venöz > implant santral venöz kateter)

- Kateterin süresi (> 72 saat)

Etkenler

Oldukça geniş spektrumda mikroorganizma kateter ile ilişkili enfeksiyonlara yol açar. Stafilokoklar (koagülaz negatif ve pozitif), aerobik gram negatif basiller ve *Candida albicans* öne çıkar. Stafikoloklar tüm kateter ile ilişkili enfeksiyonların %75-90' ını oluşturur. Koagülaz negatif stafilokoklar bu enfeksiyonların %35-50'sinden sorumludur ve plastik kateterlere diğer mikroorganizmalardan daha kolay yapışır. *S.aureus* ise KNS'lerden sonra ikinci sırada (%15-20) en sık etkindir ama bazı merkezlerde *Enterococcus* türleri ikinci sırayı alabilir. Her iki durum da direnç paternleri (MRSA, VRE) nedeni ile tehlikeli enfeksiyonlara yol açarlar. Diğer gram pozitif bakteriler *Corynebacterium* türleri (özellikle *C.jejkeium*), *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* türleri, *Micrococcus* türleridir. Gram negatif bakterilerden gram negatif enterik bakteriler (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* türleri, *Citrobacter* türleri, *Pantoea agglomerans*), nonfermentatif gram negatif bakteriler (*P.aeruginosa*, diğer psödomonas türleri, *Acinetobacter* türleri, *Stenotrophomonas maltophilia*) etken olabilir. Mikobakteriler özellikle atipik olanlar enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilir. Mantarlardan *Candida* türleri ve *Fusarium*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* türleri vb özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda önemlidir [34, 35, 37, 41, 45].

Kateterin takılma yeri ve tipine göre de etken sıklıkları değişebilir. Ancak KNS'ler tüm kateter tiplerinde en sık etkindir. Kasıkta uygulanan santral venöz kateter enfeksiyonlarında en sık etken gram negatif basiller ve enterokoklardır. Uzun süreli santral venöz kateterlerde de KNS' yi takiben *S .aureus*, gram negatif basiller ve *Candida* türleri enfeksiyon etkenleri olarak öne çıkar. Kısa süreli tünelsiz santral venöz kateterler ve pulmoner kateterlerde KNS, *S.aureus*, ve enterokoklar en sık etkenlerdir. Uzun süreli tünelli kateterlerde KNS, *S.aureus*, entokoklar, gram negatif basiller, *Candida* türleri ve küfler öne çıkar. İnfüzyon sıvılarında da *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Serratia* türleri sıklıkla ve sepsise yol açarlar[34, 36].

Tanı

Klinik bulgular tek başına yeterli olmayabilir. Bu nedenle akılcı ve uygun yöntemlerden oluşan laboratuvar desteği çok önemlidir. Lokal bulgular oldukça az (bakteriyemili olgularda %3) sıklıkta görülür. Yine KNS'nin neden olduğu kateter enfeksiyonlarında da oldukça nadirdirler. Deriden alınan giriş yeri sürüntüsü veya eksüda kültürleri kolonizasyon ile patojenik mikroorganizmayı ayırmada yeterli değildir. Febril nötropenik hastalarda kateter ile

ilişkili enfeksiyondan şüphe edildiğinde, aynı nedeni bilinmeyen ateş gibi tanısal yaklaşım gerçekleştirilmelidir. Bunun için yapılması gerekenlerin minimumu ayrıntılı fizik muayene, akciğer grafisi, mikrobiyolojik testlerdir. Tüneli kateterlerin enfeksiyonundan şüphe ediliyorsa kateter boyunca USG dalgaları yardımcı olabilir. Diğer tanısal yaklaşımlar hastanın klinik görünümüne göre ayarlanmalıdır. Ayrıca kan dolaşımı enfeksiyonu olup kültürlerde üreme saptanamayan ama kateter çekildikten sonra klinik olarak düzelen hastada da kateter enfeksiyonu tanısı konabilir [45].

Tedavi:

Tigesiklin

Glisilsiklinler, klasik tetrasiklinlerin semi-sentetik analoglarıdır. Tigesiklin, glisilsiklinler adı verilen bu yeni antibiyotik grubunun ilk üyesidir. Tetrasiklinlerin temel çekirdeğindeki 9. pozisyonunda yapılan N-alkyl-glycylamido modifikasyonu bu yeni moleküle çok geniş bir antibakteriyel spektrum ve tetrasiklin direnç mekanizmalarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Yapısal olarak tigesiklin, minosiklinin semisentetik bir derivativesidir. Ancak, minosiklin ve tetrasikline oranla ribozomlara beş kat daha güçlü bağlanır [46-48]. Bakterilerde tetrasiklin direncinden sorumlu iki farklı genetik mekanizmaya (ribozomal korunma ve efluks mekanizmalarına) karşı dirençli olması en önemli özelliğidir. Tigesiklinin bu özelliği, 9. pozisyonundaki modifikasyonun sağladığı üç boyutlu engellemeye bağlanmaktadır [46, 47, 49]. Tigesiklin bakterilerde protein sentezini ribozom düzeyinde inhibe eden tek antibiyotik grubudur. Tigesiklin, 30S ribozomal alt ünitesine bağlanır ve amino-acyl transfer RNA'nın hedefine girişini engelleyerek etkisini gösterir. Böylece protein sentezi engellenir ve bakteriyel üreme durur [2, 4, 46-49].

Etki spektrumu

Gram pozitif ve gram negatif bakteriler, atipik bakteriler ve anaeroplara dahil olmak üzere geniş bir etki alanına sahiptir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*, vankomisine dirençli enterokoklar, GSBL üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çoğul dirençli bakteriler de etki alanına girmektedir [46-51]. Tigesiklinin in vitro etkinliği 1997-2004 yılları arasında yapılan çok sayıda çalışmada ve çok sayıda klinik izolat ile araştırılmıştır. Test edilen tüm stafilokok kökenleri 2 mg/L ve altındaki tigesiklin konsantrasyonlarında inhibe olmuştur. MSSA ve

MRSA kökenlerine karşı tigesiklinin MİK90 değerleri sırasıyla 0.12 ve 0.25 mg/L olarak bulunmuştur. Metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus epidermidis* kökenleri için MİK90 değerleri iki grup için de 0.5 mg/L olarak saptanmıştır. Penisiline duyarlı, orta düzey dirençli ve yüksek düzey dirençli tüm *S.pneumoniae* kökenleri için tigesiklinin MİK90 değerleri 0.06 mg/L olarak saptanmıştır. *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus agalactiae* dahil tüm streptokoklar için tigesiklin MİK90 değerleri 0.06 mg/L olarak bulunmuştur. Tigesiklin tüm enterokok türlerine karşı aktif olup, vankomisine duyarlı ve dirençli *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türleri için MİK90 değerleri 0.12 mg/L'dir [46].

Tigesiklin enterik gram negatif bakteriler ve nonfermentatif bakteriler dahil birçok gram negatif bakteriye karşı çok iyi in vitro etkinliğe sahiptir. GSBL üreten ve üretmeyen *E.coli* kökenleri için MİK90 değerleri 0.5 mg/L olarak bulunmuştur. *AmpC* ve GSBL pozitif kökenler dahil olmak üzere *K.pneumoniae* kökenlerine karşı MİK90 değerleri 2 mg/L olarak saptanmıştır. *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae* için MİK90 değerleri sırasıyla 1 ve 0.5 mg/L'dir. *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia* için tigesiklinin MİK90 değerleri 2 mg/L olarak saptanmıştır. Tigesiklinin *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkinliği ise daha düşüktür. Bu bakteri için MİK90 değeri 16 mg/L olarak saptanmıştır. Solunum yolu patojenlerinden *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* için MİK90 değerleri sırasıyla 0.5 ve 0.12 mg/L olarak belirlenmiştir [46].

Tigesiklin ayrıca, peptostreptokoklar, *Clostridium* türleri, *Prevotella* türleri ve birçok *Bacteroides* türü dahil olmak üzere gram pozitif ve negatif anaerob bakterilere karşı da in vitro etkinliğe sahiptir. Bunların dışında *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*'ye karşı in vitro etkinliği gösterilmiştir. Hızlı üreyen mikobakterilere karşı etkili olduğu bildirilen çalışmalar da bulunmaktadır [4, 46, 48].

The Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) çalışması 2004 yılında ABD'de farklı coğrafi bölgelerden soyutlanmış 3989 gram negatif ve gram pozitif klinik kökenin incelendiği ve tigesiklinin 13 farklı antibiyotikle in vitro etkinliğinin karşılaştırıldığı yeni bir çalışmadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tigesiklin, *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı imipenem kadar etkili bulunmuştur. Aynı çalışmada tigesiklinin metisilin ve vankomisin duyarlılığına bakılmaksızın *S.aureus* kökenlerine ve enterokoklara, penisilin duyarlılığına bakılmaksızın pnömokoklara etkinliğinin çok iyi olduğu sonucuna varılmıştır [50].

Tigesiklinin aktivitesi oksijenden etkilendiğinden aerob bakteriler için duyarlılık testlerinin taze (12 saati geçmeyecek şekilde) Mueller-Hinton sıvı besiyerinde, anaerob

bakteriler içinse Brucella agarda standart dilüsyon testleri kullanılarak yapılması gerekmektedir. Disk difüzyon testi için 15 mikrogramlık diskleri kullanılmaktadır. 19 mm ve üzerindeki zon çapına sahip olan kökenler duyarlı, 14 mm ve altı ise dirençli olarak kabul edilir. Dilüsyon testlerinde ise MİK değeri 2 mg/L ve daha düşük olan kökenler duyarlı, 8 mg/L ve üstündeki değerler dirençli olarak kabul edilir [2, 46].

Farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler

Tigesiklin; enterokoklar, stafilokoklar, *E.coli* ve *K.pneumoniae*' ye karşı bakteriyostatik etki gösterir. *S. pneumoniae*' ye karşı hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir [48, 49]. İn vitro çalışmalarda 3 mg/kg tigesiklin dozundan sonra *S. pneumoniae* için 8.8 saat, *E.coli* için 4.9 saat süren post antibiyotik etkiye (PAE) sahip olduğu gösterilmiştir. Yarılanma ömrü 36 saat olup, proteinlere % 68 oranında bağlanır. Hemen tüm vücut sıvılarına iyi dağılım gösterir. Tigesiklin belirgin olarak vücutta metabolize olmaz. Çok yavaş olarak dışkı ile atılır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerekmez. İleri dönem hariç, karaciğer yetmezliğinde de doz ayarlaması gerekmez. Yaş ve cinsiyet tigesiklinin farmakokinetik özelliklerini etkilememektedir [4, 46-49].

Klasik tetrasiklinlerden farklı olarak sadece intravenöz yoldan uygulanmaktadır. İnfüzyon süresi bir saattir. Günlük doz iki defada uygulanmakla beraber, uzun yarılanma ömrü ve PAE'si nedeniyle günde tek doz kullanılabilmesinin olası olduğunu düşünenler vardır [2, 47, 49].

Klinik kullanımı

Tigesiklinin iki tane faz II, bir tane faz III çalışması gerçekleştirilmiştir. Biri komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (KDYDE), diğeri komplike intraabdominal enfeksiyonlarda (KİAE) olmak üzere iki faz II çalışması bulunmaktadır. KDYDE çalışmasında 25 ve 50 mg'lık iki farklı tigesiklin dozunun klinik ve mikrobiyolojik etkinlikleri, farmakokinetik özellikleri ve tolerabilitesi araştırılmıştır. Bu çalışmada 160 hospitalize hasta, tigesiklinin her 12 saatte bir 25 mg ve 50 mg (başlangıçta sırasıyla 50 ve 100 mg yükleme dozunun takiben) dozları için randomize edilmişlerdir. 50 mg doz uygulanan hastalarda tedavi sonu klinik kür ve mikrobiyolojik eradikasyon oranları, 25 mg doz uygulanan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla klinik kür % 85 - % 78, mikrobiyolojik eradikasyon % 74 - % 62). Bulantı ve kusma en sık raslanan yan etkiler olarak

göze çarpmıştır [4, 5]. KİAE çalışmasında 111 hastaya 100 mg IV yükleme dozunu takiben 50 mg/gün, 14 gün süre ile tigesiklin uygulanmıştır. Tedavi sonu gerek klinik kür, gerekse mikrobiyolojik eradikasyon oranları, %75.8 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada da bulantı ve kusma en sık görülen yan etkiler olmuştur [52]. Tigesiklinin, KDYDE' de vankomisin ve aztroenam kombinasyonu ile karşılaştırıldığı faz III çalışmasında klinik etkinlik yönünden eşdeğer olduğu bulunmuştur [6]. İlk olarak 15 Haziran 2005 tarihinde Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA onayı almıştır [5, 6].

Yan etkileri

Üç çalışmanın sonuçlarına bakıldığında tigesiklinin en önemli yan etkisi bulantı ve kusma olarak belirlenmiştir [5, 6, 52]. Ancak, daha önemlisi bu yan etkinin hiçbir hastada tedavinin yarıda bırakılmasına neden olmamasıdır. Bir tane tigesikline bağlı olması muhtemel *Clostridium difficile* infeksiyonu bildirilmiştir. Gebelerde kullanımı kontrendikedir. Onsekiz yaş altında ve laktasyonda kullanımı hakkındaki bilgiler yetersizdir. Amfoterisin-B, klorpromazin, metilprednizolon ve vorikonazol ile birlikte kullanılmamalıdır [51]. Preklinik çalışmaların sonuçlarına göre, tigesiklin ciddi infeksiyonu olan yatan hastaların intravenöz tedavisi için uygun bir antibiyotik olarak konumlanmaktadır. Tigesiklin, geniş etki alanı, önemli yan etkilerinin olmayışı ve direnç sorunu nedeniyle tedavisinde sıkıntılar yaşanan ve hastanede yatırılarak tedavisi gereken komplike deri, yumuşak doku infeksiyonları ve intraabdominal infeksiyonlarda iyi bir seçenek olarak görünmektedir. Yapılacak daha fazla sayıda çalışma ile başka endikasyonlarda da kullanılabileceği düşünülmektedir [2].

MRSA Tedavisinde Kullanılan Diğer Antibiyotikler

Vankomisin

Vankomisinin primer etkisi bakteri hücre duvarı sentezinin inhibisyonudur. Bunun yanında RNA sentezinin ve *S. aureus* izolatlarının stoplazmik zarının inhibisyonu da etki mekanizmasını oluşturur. Vankomisinin bakterisidal aktivitesi konsantrasyona bağlıdır. İn vitro post antibiyotik etkisi kısa sürelidir. Vankomisin aktivitesi yabancı cisimle ilişkili enfeksiyonlarda sıklıkla izlenen biyofilm varlığından etkilenir.

Vankomisin sistemik *S. aureus* enfeksiyonlarında IV yoldan verilir. Bunun yanı sıra oral, intraperitoneal, intratekal, intraventriküler veya intraoküler de kullanılabilir. Oral kullanımda bağırsak lümeninde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen serum

konsantrasyonu tespit edilemez. Bu nedenle *S. aureus* enfeksiyonlarında oral kullanımı söz konusu değildir. Ayrıca ciddi lokal ağrıya neden olduğu için IM kullanılamaz.

Vankomisin BOS'a geçişi meningeal inflamasyonun olmadığı durumlarda minimaldir. Ventriküliti olan erişkinlerde IV uygulama sonrası BOS' a penetrasyonu %5-10'dur. Böbrek, karaciğer, aort, akciğer, kalp dokusu ve abse sıvısına geçişi iyidir. Vankomisin göz sıvısına ve kemik dokuya geçişi azdır.

Vankomisin primer olarak böbreklerden değişmeden glomerüler filtrasyon ile atılmaktadır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerekli iken, karaciğer yetmezliğinde gerekmemektedir.

Böbrek fonksiyonları normal olan kişilerde olağan veriliş şekli toplam 30 mg/kg/gün iki veya dört doza bölünmüş olarak (genellikle 4x500 mg veya 2x1 gr), 30-60 dakikada infüzyon şeklinde olmalıdır. Serum ilaç düzeylerinin takip edilmesi gereken durumlar; aminoglikozidler gibi başka bir nefrotoksik ajan ile birlikte kullanımı, yüksek doz vankomisin kullanımı, böbrek fonksiyonlarında hızlı değişiklik olması ve hemodiyaliz uygulamasıdır.

En sık görülen yan etkiler infüzyon ile ilişkili yan etkilerdir. İnfüzyon sırasında baş, boyun ve gövdenin üst kısmında, bazen anjiyoödem ve hipotansiyon ile birlikte olan, eritematöz döküntü ve kaşıntı ("red-neck" veya "red man syndrome") görülebilir. İnsidansı %3,4-11,2 arasında bildirilmiştir. Bu yan etki genellikle yüksek doz vankomisin hızlı infüzyonu sırasında ortaya çıkar ve infüzyonun sonlandırılması ile çoğunlukla düzelir. Bunun yanı sıra flebit gibi lokal reaksiyonlar da görülebilir. Nefrotoksisite, ototoksisite, kemik iliğinin baskılanması vankomisin tedavisi sırasında karşılaşılabilecek diğer yan etkilerdir.

Son yıllarda MRSA insidansının artmasına paralel olarak özellikle nozokomiyal enfeksiyonların ampirik tedavisinde vankomisin yaygın kullanımı, vankomisine orta düzeyde duyarlı ve dirençli [vankomisin intermediate *S. aureus* (VISA) ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA)] suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu durum gelecek yıllarda VRSA suşlarının önemli problem olarak karşımıza çıkacağını düşündürmektedir. Vankomisine orta düzeyde duyarlı suşlardaki direnç mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bu suşlarda enterokoklarda olduğu gibi vankomisine dirençli genler bulunmamıştır. Klinik izolatlardaki duvar kalınlığı ile MİK değerleri arasındaki pozitif korelasyon, duvar kalınlaşmasının duyarlılıktaki azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir. Hücre duvar prekürsörlerinin sentezindeki artış veya hücre duvar döngüsündeki azalma sonucu D-alanin-D-alanin rezidülerinde artış meydana gelmekte ve bu

ekstra rezidüer glikopeptidlerin hedef bölgeye ulaşmasını engelleyerek etkinliklerini azaltmaktadırlar. Vankomisine dirençli suşlarda enterokoklardaki *vanA* geni tespit edilmiştir. Bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde çok fazla seçenek olmaması nedeniyle enfeksiyon kontrol önlemleriyle yayılımın önlenmesi en akılcı yoldur [53-58].

Teikoplanin

Vankomisin gibi etkisini hücre duvar sentezini inhibe ederek gösterir. Uygulama şekli IV bolus tarzında veya IM yoldandır. Önemli miktarlarda emilim olmadığı için oral kullanımı söz konusu değildir. Kemik konsantrasyonları vankomisinden daha iyidir. Aynı zamanda kalp, perikard, mediastinal doku, akciğer, sinovyal, plevral ve perikardiyal sıvıya geçişi yeterlidir. Meningeal inflamasyonda dahi BOS'a ve vitröz dokuya geçişi yoktur.

Normal böbrek fonksiyonu olan erişkinlerde üç kez 12 saatte bir 6 mg/kg yükleme dozundan sonra 24 saatte bir 6 mg/kg idame doz önerilmektedir. Ağır *S. aureus* enfeksiyonlarında 12 mg/kg gibi yüksek dozların kullanımı önerilmektedir. Ancak *S. aureus*'a bağlı endokardit veya intravasküler enfeksiyonlarda klinik cevap vankomisine göre daha kötüdür. Kronik osteomyelitlerin idame tedavisinde IM form uzun süreli kullanılabilir. Deri ve yumuşak doku, alt solunum yolu ve idrar yolu enfeksiyonlarında etkilidir. İntraperitoneal ve intraventriküler kullanımı da bildirilmiştir.

Uygulanan doz 12 mg/kg/gün'ün altında ise serum düzeylerinin takibi gerekmemektedir. IV ilaç bağımlılarında klirens artışından dolayı serum düzeylerinin takibi önerilir. Bunun yanında tedaviye cevap vermeyenlerde, ağır yanık hastalarında, böbrek fonksiyonlarında hızlı değişiklik olanlarda ve hemodiyaliz hastalarında serum düzeylerinin takibi önerilmektedir.

Teikoplanin yan etki açısından güvenilir bir ilaçtır. Nefrotoksisite vankomisine göre daha nadir görülür. En sık görülen yan etkiler, makülopapüler veya eritematöz döküntü ve ilaç ateşidir. Ototoksisite ve hematolojik yan etkiler nadiren izlenir [53, 58].

Linezolid

Oksazolidinonlar tamamen organik sentez ile oluşturulan yeni antibiyotik grubudur. Protein sentezini inhibe ederek etki gösterir ve stafilokoklar dahil pek çok mikroorganizmaya karşı bakteriyostatik etkilidir.

Oral emiliminin iyi olması nedeniyle parenteral tedaviden oral tedaviye geçişin olabilmesi linezolid için bir avantajdır. Oral yoldan alındığında emilimi hızlıdır ve tepe serum düzeylerine bir-iki saatte ulaşır. Linezolidin 12 saat arayla 400-600 mg dozda oral ya da IV yolla (30-60 dakika infüzyon) kullanımı önerilmektedir. Linezolid, karaciğerde oksidasyon ile metabolize olmakta ve sitokrom p450 enzim sistemi ile etkileşime girmemektedir. İlacın %85'i idrarla, geri kalanın önemli bir kısmı ise dışkıyla atılmaktadır. Böbrek ve karaciğer yetmezliği durumlarında doz ayarlaması gerekmemektedir. Yapılan çeşitli farmakokinetik çalışmalarda linezolidin gerek plazma düzeyi gerekse doku dağılımı çok iyi bulunmuştur. Linezolidin plazma proteinlerine düşük oranda bağlanması ve dağılım volümü, vücut sıvılarına etkin dağılımında rol oynayan başlıca faktörlerdir. Sağlıklı gönüllülerde oral biyoyararlanımı %100 olarak belirlenmiştir.

Linezolidin akciğerde yüksek konsantrasyonlara ulaşması ve gram pozitif mikroorganizmalara karşı yüksek düzeydeki etkinliği ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP)'de vankomisine alternatif bir tedavi seçeneği haline gelmesini sağlamıştır. Linezolid, FDA tarafından MRSA'ya bağlı nozokomiyal pnömoni, komplike ve komplike olmayan deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanım onayı almıştır. MRSA'ya bağlı deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında ve idrar yolu enfeksiyonlarında klinik başarı yüksektir. Kemik ve eklem enfeksiyonları, parotit, menenjit, ventrikülit, epidural abse, bakteriyemi ve lokalize enfeksiyonlarda başarılı sonuçların alındığı olgu raporları da mevcuttur. MRSA'nın neden olduğu nozokomiyal pnömoni tedavisinde klinik olarak vankomisinden daha başarılı bulunmuştur [54-63].

Kinupristin/Dalfopristin

Streptogramin grubu antibiyotiklerdir. 30/70 oranında iki siklik peptid antibiyotik kombinasyonudur. Bakterisidal etki oluşturur ve bu etkilerini ribozomdaki 50S ünitesinde protein sentezini engelleyerek gösterir. Postantibiyotik etki söz konusudur. İlacın yaklaşık %90'ı plazma proteinlerine bağlıdır. Karaciğerde metabolize edilir ve metabolitleri antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Vücuttan eliminasyonunun %75'i karaciğerden ve safra yolu ile olmaktadır. Diğer kısmı ise böbreklerden atılır.

FDA tarafından MRSA'ya bağlı komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi için onay almıştır. Ayrıca, kemik ve eklem enfeksiyonlarında da başarılı sonuçlar alınmıştır. Ağır enfeksiyonlarda yeterli klinik deneyim olmaması nedeniyle vankomisini

tolere edemeyen hastalarda alternatif tedavi olarak ve diğer antibiyotiklerle kombine kullanımı önerilmektedir. Kinupristin ve dalfopristin vejetasyon içerisinde farklı dağılmaktadır. Kinupristin homojen dağılırken, dalfopristin sadece vejetasyonun periferine dağılmaktadır. Oysaki sinerjizm ve bakterisidal etki için iki antibiyotiğin birlikte olması gereklidir. Dolayısıyla bakterisidal etkinin önemli olduğu akut bakteriyel endokarditte tek başına kullanımı önerilmemektedir.

Ağır enfeksiyonlarda 3x7,5 mg/kg, komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında 2x7,5 mg/kg önerilen uygulama dozlarıdır. İnfüzyon bölgesinde görülen yan etkiler, en sık görülen yan etkilerdir. Bunun yanında artralji (%9), miyalji (%7), gastrointestinal sisteme ait yan etkiler (bulantı, kusma, ishal gibi), baş ağrısı ve kaşıntı görülebilir. Kinupristin/dalfopristin, sitokrom p450 3A4 enzim sistemini inhibe ettiği için bu yoldan metabolize olan pek çok ilacın (diazepam, verapamil, statinler, nevirapin, delavirdin, ritonavir gibi antiretroviral ilaçlar, antineoplastik ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri vb.) seviyesini artırır.

Kinupristin ve dalfopristin kimyasal olarak farklı bileşikler olduklarından ve 50S ribozomal subünitteki hedef bölgeleri farklı olduğundan direnç gelişme mekanizması her biri için özgüldür. Üç genel direnç mekanizması vardır; hedef bölgede yapısal değişiklik ile ilacın bağlanmasının azalması (kinupristin), enzimatik inaktivasyon (kinupristin ve dalfopristin) ve hücre dışına bileşenlerin aktif transportu (kinupristin ve dalfopristin) [53, 58, 64-66].

Daptomisin

Daptomisin lipopeptid grubundan, bakterisidal etkinliği olan antibiyotiktir. Daptomisinin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak sitoplazmik membranda kalsiyuma bağlı olarak elektrik potansiyelinde değişiklik göstermektedir. Ayrıca, membran bütünlüğünü bozarak protein, DNA ve RNA sentezlerini hızla baskılayarak ve lipoteikoik asit sentezini önleyerek birkaç basamakta etkilidir.

Daptomisin plazma proteinlerine %91,7 oranında bağlanır. Ancak doku proteinlerine afinitesi düşüktür. Önemli oranda böbreklerden değişmeden atılır.

Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında 2-4 mg/kg/gün dozunda önerilir. Endokardit tedavisinde ise 6 mg/kg/gün dozunda başlanmalıdır. IV yoldan %0,9 NaCl solüsyonu içerisinde 30 dakikada uygulanmalıdır. Daptomisin dozu hafif/orta derecede böbrek yetmezliklerinde (kreatinin klirensi > 30 mL/dakika) aynıdır ancak kreatinin klirensi

< 30 mL/dakika'da 48 saatte bir 4 mg/kg/gün veya 6 mg/kg/gün dozunda verilmelidir. Daptomisin uygulanması sırasında en sık görülen yan etkiler; bulantı, kusma, ishal, kabızlık gibi gastrointestinal yan etkiler, uygulama bölgesinde flebit, döküntü, baş ağrısı ve kaşıntıdır.

Daptomisine direnç gelişmesi nadirdir. Direnç gelişmesi daha çok düşük dozlarda bildirilmiştir [53, 58].

Rifampisin

Rifampisin antimikrobiyal etkisini DNA-bağımlı RNA polimerazın beta-subünitini inhibe ederek gösterir. Rifampisin stafilocoklara karşı inhibitör ve bakterisidal aktivite gösterir. Yağda çözünürlüğü nedeniyle hücre zarından geçerek hücre içerisinde çok yüksek konsantrasyonlara ulaşır.

Rifampisin direnci, beta-subüniti kodlayan *rpoB* genindeki mutasyon sonucu gelişir. Tedavide tek başına kullanıldığı zaman 24-48 saat içerisinde direnç gelişir. Bu nedenle stafilocok enfeksiyonlarında diğer antistafilokoksik ajanlarla beraber kullanımı önerilir. Kombinasyon tedavisi sırasındaki direnç gelişimi ise yüksek bakteri yüküne ve düşük antibiyotik konsantrasyonuna bağlıdır (örneğin; endokardit ve büyük abseler).

İn vitro çalışmalarda rifampisinin diğer antistafilokoksik ajanların inhibitör ve bakterisidal etkinliğine katkısı kanıtlanmıştır. Bazı çalışmalarda ağır stafilocok enfeksiyonlarında, antistafilokoksik ajana rifampisin eklenmesiyle bakteriyolojik kür oranının arttığı gözlenmekle birlikte, her zaman klinik başarı ile ilişkili bulunmamıştır. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında rifampisin ile kombinasyon tedavisi rutin olarak önerilmemektedir; ancak santral sinir sistemi enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit, septik artrit ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi ağır MRSA enfeksiyonlarında diğer antistafilokoksik ajanlarla rifampisinin birlikte kullanımı önerilmektedir. Enfeksiyonun şiddetine göre günlük kullanım dozu 600-1200 mg olmalıdır [58, 67, 68].

GEREC VE YÖNTEMLER:

Çalışma suşu olarak hastanemizde kateter enfeksiyonu etkeni olarak saptanmış on MRSA suşu alındı. Elde edilen suşlar Gram boyası ile boyanarak üzüm salkımı şeklinde gram pozitif koklar görüldü. Katalaz ve koagülaz pozitif oldukları doğrulandı. Metisilin (oksasilin) direnci CLSI önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Suşlardan 0.5 McFarland bulanıklık standardına uygun (10^8 bakteri/ml) olarak steril serum fizyolojik içinde süspansiyonlar hazırlanıp % 4 NaCl içeren Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyerine ekildi. 1 µg oksasilin (Oxoid) diski konularak 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 11 mm'nin altında zon çapı oluşturanlar dirençli kabul edildi. Kontrol suşu olarak oksasilin için inhibisyon zon çapları bilinen *S. aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanıldı. On adet suşun hepsinin oksasiline dirençli olduğu gösterildi [69, 70].

Stafilokok suşlarının biyofilm yapma özellikleri Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak araştırıldı. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 10 g agar, 50 g sükröz, 37 g beyinkalp infüzyon buyyonu ve 0.8 g Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlandı. Bu besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 37°C'de bir gece inkübe edildi; koyu kırmızı-siyah koloni oluşturan suşlar biyofilm pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi. Suşların hepsinde koyu kırmızı-siyah koloniler gösterilerek biyofilm oluşturduğu gösterildi [71]. Ayrıca biyofilm oluşumu kendi imkanlarımız ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tınaztepe Yerleşkesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde Scanning Elektron Mikroskobu kullanılarak da gösterildi.

Çalışma için 90 adet steril silikon disk üç gruba ayrılarak insan plazması içeren üç adet steril tüpte sallanarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra plazmadan çıkarılarak Mueller-Hinton Buyyon içinde hazırlanmış 1 ml bakteriyel inokulum ile değiştirildi ve 24 saat inkübe edildi. Bakteriyel inokulum 10 adet MRSA suşunun 10^5 hücre/ml karışımı ile hazırlandı. İnokulum uzaklaştırıldı ve diskler %0,9 SF ile yıkandı [69].

Silikon disklerden bir grup Mueller-Hinton Buyyon içine, bir grup 2 mg/ml tigesiklin (Tygacil[®], Wyeth) içeren tüplere ve bir grup 2 mg/ml vankomisin (Vankomisin HCl[®], Abbott) içeren tüplere konularak inkübe edildi.

24 saat sonra diskler 5 ml % 0,9 luk SF içine konuldu ve 15 dk bekletildi. Son olarak tüpler 30 sn vortekslenildi ve tüplerden alınan 100-µL solüsyon % 5 koyun kanlı tripticase soy agara ekildi. Plaklar bir gece 37°C'de inkübe edildi [69].

Dilüsyon faktörü göz önüne alınarak koloniler sayıldı ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

Antibiyotik Kilit Tedavisi Modeli

Yetmişbeş adet steril silikon disk üç gruba ayrılarak insan plazması içeren üç adet steril tüpte sallanarak 37°C' de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra plazmadan çıkarılarak Mueller-Hinton Buyyon içinde hazırlanmış 1 ml bakteriyel inokulum ile değiştirildi ve 24 saat inkübe edildi. Bakteriyel inokulum 10 adet MRSA suşunun 10⁵ hücre/ml karışımı ile hazırlandı. İnokulum uzaklaştırıldı ve diskler %0,9 SF ile yıkandı [69].

Silikon disklerden bir grup Mueller-Hinton Buyyon içine, bir grup 2 mg/ml tigesiklin (Tygacil[®], Wyeth) içeren tüplere ve bir grup 2 mg/ml vankomisin (Vankomisin HCl[®], Abbott) içeren tüplere konularak günlük 4 saat antibiyotikli solüsyon içinde bekletildi. Daha sonra diskler tekrar 20 saat Mueller-Hinton Buyyon içinde inkübe edildi. Ardışık beş gün boyunca, hergün antibiyotikli solüsyondan sonra beşer disk çıkarılarak yukarıda belirtilen şekilde ekim yapıldı [69].

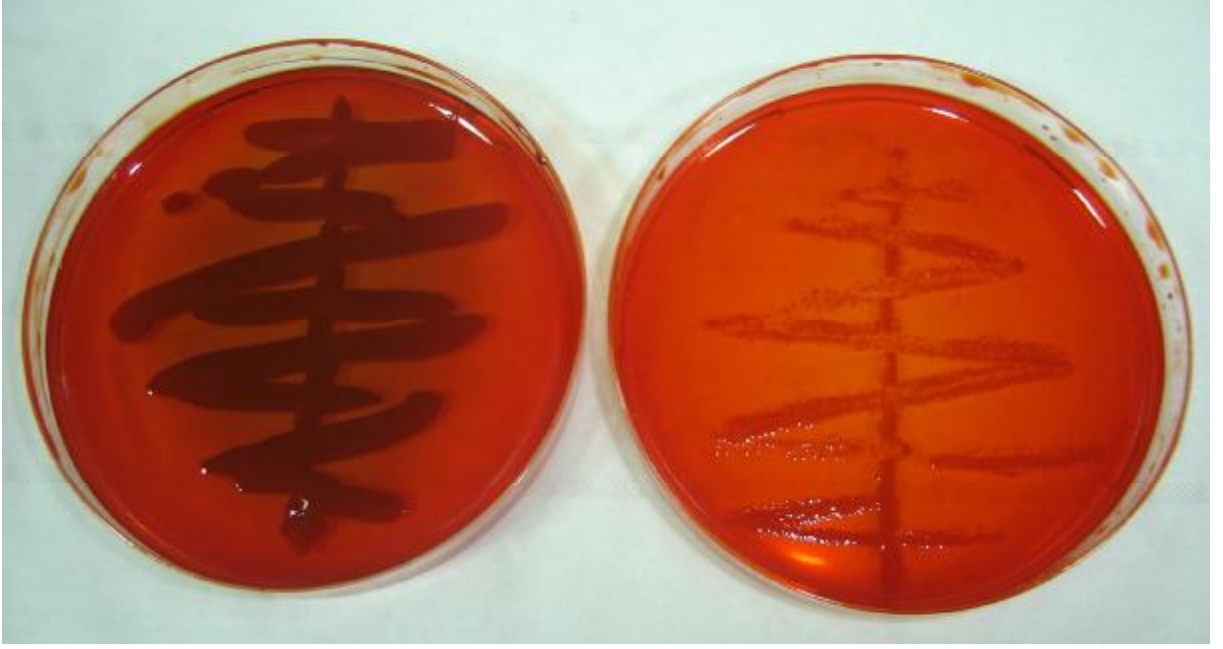
Dilüsyon faktörü göz önüne alınarak koloniler sayıldı ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

İstatiksel Analiz

Antibiyotiklerin biyofilm tabakası üzerine inhibitör etkilerini göstermek için sonuçlar Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. p<0,05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu testte anlamlı fark bulunduğunda, Mann-Whitney U test ve Wilcoxon W testi ile ileri testler yapılarak farkın nereden kaynaklandığı gösterildi. Bütün hesaplamalar için Statistical Package for Social Sciences (SPSS 15.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL) kullanıldı.

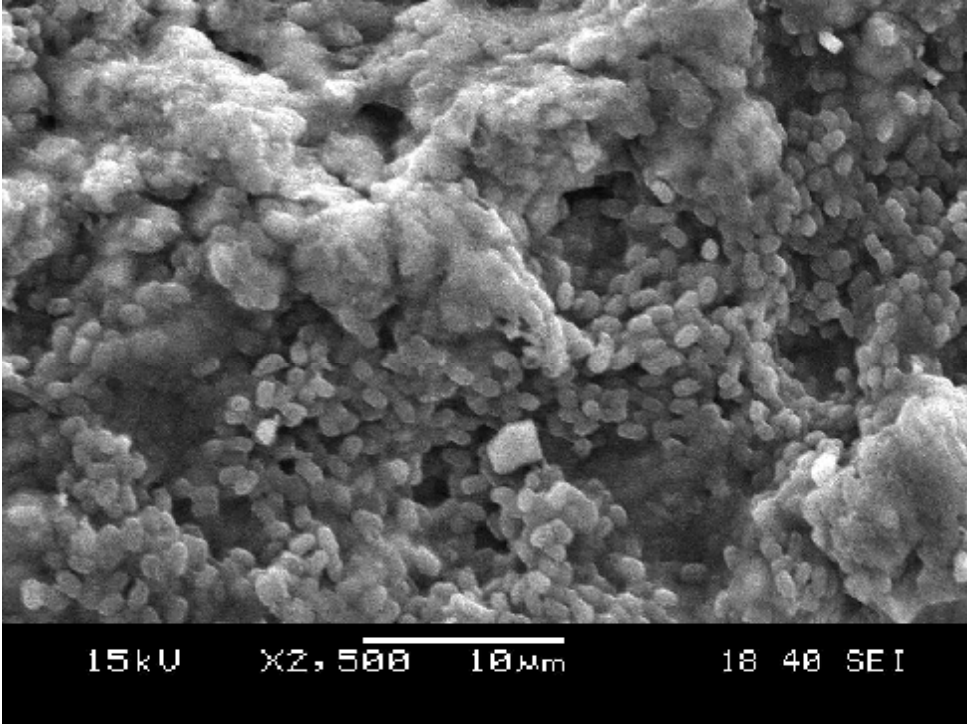
BULGULAR:

Çalışmamızda seçilen biyofilm pozitif suşların Kongo kırmızılı besiyerinde koyu kırmızı-siyah koloni oluşturmaları Şekil-1’de gösterilmiştir.



Şekil-1: Kongo kırmızılı besiyerinde biyofilm pozitif ve negatif koloniler

Çalışmamızda oluşan biyofilm tabakasının elektron mikroskopik görünümü Şekil-2’ de gösterilmiştir.

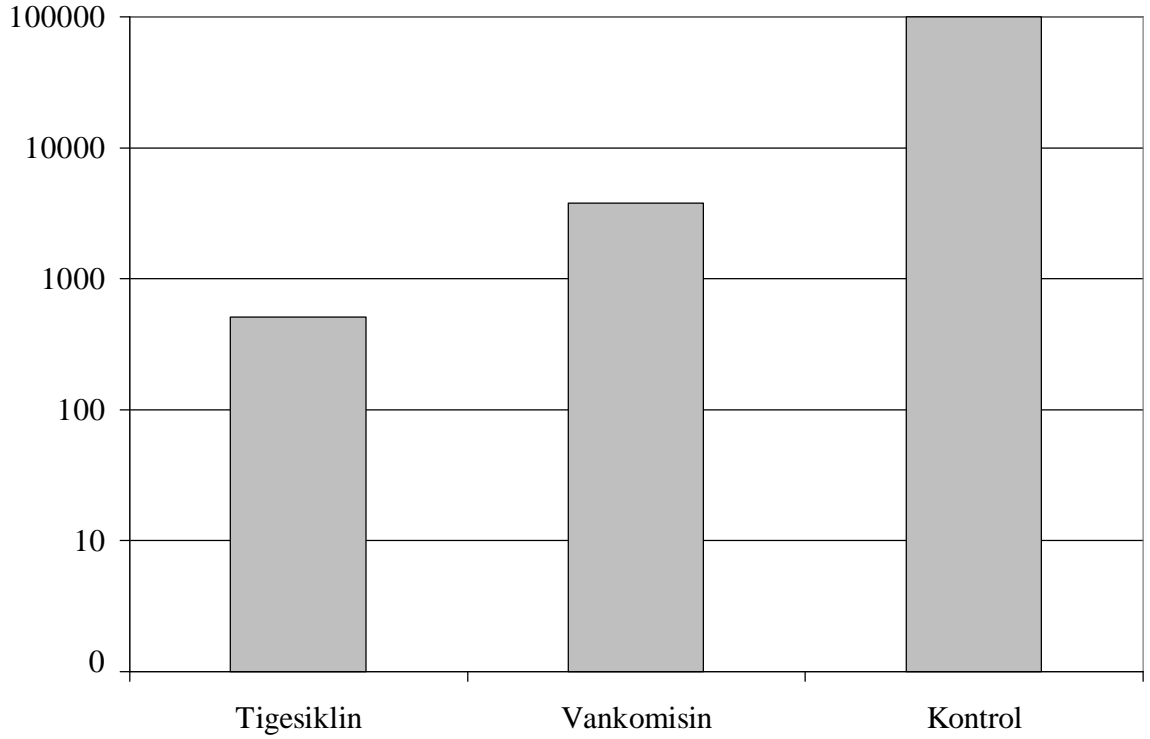


Şekil-2: MRSA ile kateter üzerinde oluşturulmuş biyofilm tabakası

Bu çalışmada, silikon disklerin 24 saatlik antibiyotik ile inkübasyonu sonucu tigesiklin grubunda 100000 cfu/mL' den ortalama 510 cfu/mL' ye düşerken, vankomisin grubunda ise ortalama 3800 cfu/mL' ye düşmüştür. Kontrol grubunda ise 100000 cfu/mL olarak kalmıştır.

Bu sonuçlara göre tigesiklin ve vankomisin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Diğer yandan vankomisin ve tigesiklin grupları arasında da tigesiklinin vankomisine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha etkili olduğu bulundu ($p<0,001$). Sonuç olarak, biyofilm tabakasına 24 saatlik inkübasyon sonrasında tigesiklin vankomisine göre daha etkili bulunmuştur.

Yirmidört saatlik inkübasyon sonunda tigesiklin, vankomisin ve kontrol gruplarında oluşan üremeler Şekil-3' te verilmiştir.

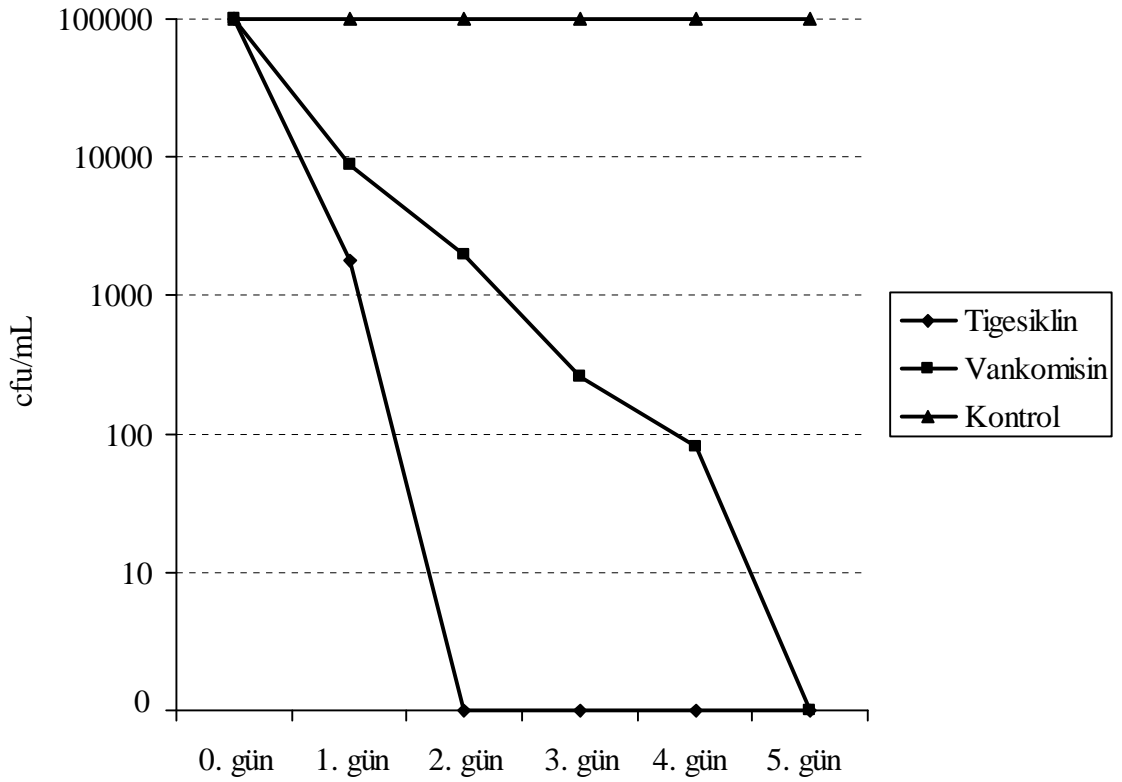


Şekil-3: Yirmidört saatlik inkübasyon sonunda tigesiklin, vankomisin ve kontrol gruplarında oluşan üremeler

Çalışmada antibiyotik kilit tedavi modelinde günlük dört saat antibiyotikle inkübasyon sonrası ise birinci günde tigesiklin grubunun ortalaması 1800 cfu/mL olurken, vankomisin grubunun ortalaması 8700 cfu/mL idi ve iki grup arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). İkinci günde tigesiklin grubunda hiç üreme olmadı (0 cfu/mL geriledi); vankomisin grubu ise

ortalama olarak 2000 cfu/mL'ya geriledi. Yine ikinci günde tigesiklinin vankomisininden daha etkili olduğu bulundu ($p<0,001$). Vankomisin grubu üçüncü gün ortalama 260 cfu/mL olurken, tigesiklin grubunda üreme olmadı. Üçüncü günün sonunda iki grup arasındaki anlamlı fark devam etti ($p<0,001$). Vankomisin grubu dördüncü günde ortalama olarak 80 cfu/mL'ya geriledi. Tigesiklin grubunda üreme olmadı. Aradaki anlamlı fark azalmakla birlikte devam etti ($p=0,013$). Vankomisin grubunda ancak beşinci günde hiç üreme olmadı; tigesiklin grubunda da üreme olmayınca iki grup arasında fark yoktu ($p=1,000$).

Şekil-4' te her üç grupta günlere göre üreme miktarları görülmektedir.



Şekil-4: Antibiyotik kilit tedavisi modelinde tigesiklin, vankomisin ve kontrol gruplarında günlere göre üremeler

TARTISMA:

Biyofilm tabakası, bir ekzopolisakkarit olup bakterilerin bazı yüzeylerde kolonizasyonuna yol açar. Biyofilm tabakasını ortadan kaldırmak oldukça güçtür. İnatçı enfeksiyonlara kaynak teşkil etmesi açısından oldukça önem taşır. Biyofilm tabakası ekzopolimer matrikse sahip kapalı bir yapıdır; çeşitli maddelerin difüzyonunu kısıtlar ve antimikrobiyal ajanları bağlar. Bu durum biyofilm hücreleri için lizozim, kompleman ve antimikrobiyal proteinler gibi büyük moleküllere karşı etkili bir direnç sağlar. Enfeksiyon tedavisi için antibiyotik seçiminde in vitro difüzyon ve dilüsyon yöntemleri kullanılıp biyofilm oluşumu göz önüne alınmaz ise bu durum tedavi başarısızlığına yol açabilir. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler, besiyerlerinde çok düşük MİK değerlerine sahip olsalar bile antibiyotiklere karşı çok dirençli olmaktadır. Bu direnç normal MİK değerlerinin 10-1000 katına kadar çıkmaktadır.

Bu çalışma, in vitro koşullarda biyofilm tabakasına tigesiklinin vankomisininden daha etkili olduğunu göstermiştir. Yirmidört saatlik inkübasyonda tigesiklin grubu ile vankomisin grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur. Tigesiklin grubunda bakteri yoğunluğu 100000 cfu/mL' den ortalama 510 cfu/mL' ye düşerken, vankomisin grubunda ortalama 3800 cfu/mL' ye düşmüştür. Kontrol grubunda ise 100000 cfu/mL olarak kalmıştır (p<0,001).

Antibiyotik kilit tedavisi modelinde günde dört saatlik inkübasyonda ilk dört gün boyunca iki grup arasında yine anlamlı fark olduğu gösterilmiştir. Birinci günde tigesiklin grubunun ortalaması 1800 cfu/mL olurken, vankomisin grubunun ortalaması 8700 cfu/mL (p<0,001); ikinci günde tigesiklin grubunda hiç üreme olmazken (0 cfu/mL), vankomisin grubu ortalama olarak 2000 cfu/mL (p<0,001); üçüncü gün vankomisin grubu ortalama 260 cfu/mL olurken, tigesiklin grubunda üreme olmadı (p<0,001); dördüncü günde vankomisin grubu ortalama olarak 80 cfu/mL'ya geriledi, tigesiklin grubunda ise üreme olmadı (p=0,013).

Ayrıca tigesiklin grubunda ikinci günde hiç üreme saptanmazken vankomisin grubunda ancak beşinci günde bu yanıt elde edilmiştir.

IDSA (Infectious Diseases Society of America) rehberi, kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında santral kateterleri kurtarma tedavisi olarak antibiyotik kilit tedavisini önermektedir [39]. Ancak hangi antibiyotiğin daha etkili olduğu ve ne kadar süreyle kullanılacağı belirtilmemiştir. Antibiyotik tercihleri genellikle laboratuvarında bakteri süspansiyonları ile yapılan duyarlılık testlerine göre seçilmektedir. Halbuki duyarlı olan bir bakteri biyofilm tabakası içinde dirençli hale gelebilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda

minosiklin ve daptomisin, vankomisin ve linezolid tedavilerine göre daha başarılı bulunmuştur [69].

Vankomisin, metisiline dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis* enfeksiyonlarında standart tedavi olmasına rağmen bakteriyel biyofilm tabakasına etkisi minimaldir. Bu etki ancak yüksek konsantrasyonlarda artırılabilir. Yüksek dozlarda kullanımı ise nefrotoksik ve ototoksik yan etkilere neden olmaktadır ve bu nedenle klinikte kullanımı kısıtlanmaktadır.

Biyofilm tabakasında bulunan MRSA'ya vankomisinin sınırlı aktiviteye sahip olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [72-74]. Bazı çalışmalarda, stafilokokkal kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında vankomisin ile beraber heparinin antibiyotik kilit tedavisinde kullanıldığı ancak kateterlerin az bir kısmının kurtarılabildiği belirtilmiştir [75-77]. Diğer yandan, uzamış vankomisin tedavisinde vankomisine dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıktığını gösteren çalışmalar mevcuttur [78]. Bu nedenle vankomisin kateter kurtarma tedavisinde en iyi seçenek olamamıştır.

Vankomisin tedavisinin başarısız olması üzerine vankomisinle birlikte çeşitli antibiyotiklerin kombinasyonları denenmiştir. Vankomisin ile rifampisin, vankomisin ile birlikte tigesiklin kombinasyonları, bakterilerin biyofilm tabakasına bağlanmasını azaltarak tek başına vankomisin tedavisine göre MRSA'ya bağlı biyofilm tabakasına daha etkili bulunmuştur [79, 80]. Ayrıca klaritromisin ile vankomisin kombinasyonunun da MRSA biyofilm tabakasına sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir [81].

Başka bir çalışmada daptomisinin, metisiline dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis*'e bağlı biyofilm tabakasına çok etkili olduğu ve alternatif tedavi seçeneği olarak kullanılabilceği belirtilmektedir [82]. Ancak bu ajanın klinik kullanıma kısa süre önce girmesi nedeniyle bu konuda klinik deneyimin az olduğu ve toksisite yönünden izlem gerektiği belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada daptomisinin düşük dozlarda biyofilm tabakasına etkili olmadığı, çok yüksek dozlarda (30 mg/kg) etkili olabildiği, klinik kullanımda önerilen dozun 6 mg/kg olduğu ve maksimum 8 mg/kg dozunda kullanılabilceği belirtilmiştir [82].

Daptomisin ile yapılan başka bir çalışmada biyofilm tabakasına etkili olduğu bildirilmiştir. Daptomisinin vankomisin ve linezolidten daha hızlı bakterisidal etki gösterdiği belirtilmiştir [83]. Ancak bu etki için yüksek kalsiyum konsantrasyonuna ihtiyaç duyduğu ve EDTA gibi kalsiyum şelatörleri ile etkinliğin azalacağı vurgulanmıştır. Alternatif olarak

heparin ile kullanılabileceği fakat heparinin de MRSA suşlarında biyofilm oluşumunu arttırabileceği bildirilmiştir [84].

Linezolid ile silikon disklerde MRSA biyofilm tabakasına karşı yapılan etkinlik çalışmaları başarısız olmuştur. Bazı çalışmalarda linezolid *S. epidermidis*' in oluşturduğu biyofilm tabakasına etkili bulunmuştur [72]. Ancak bu etki 72 saatten sonra ortaya çıkmakta ve her zaman klinik olarak bu kadar beklemek mümkün olmamaktadır. Ayrıca günlük antibiyotik kilit tedavisi ile MRSA suşlarında linezolide karşı duyarlılığın azaldığı bildirilmiştir [74]. Linezolid tedavisine rifampisin eklenerek MRSA ile oluşan biyofilm tabakasına karşı sinerjistik etki sağlanabilir [85].

Rifampisin ile yapılan çalışmalarda, rifampisinin günlük dört saat ve 24 saatlik uygulamalarının biyofilm tabakasına etkili olduğu gösterilmiştir [86]. Ancak günlük tekrarlayan dozlarda tek başına kullanıldığında çok kısa sürede direnç geliştiği bildirilmiştir [87]. Kombinasyon tedavisinde diğer antibiyotiklerin antistafilokoksik etkisini arttırdığı gösterilmiştir. MRSA ile oluşan biyofilmin tedavisinde, kombinasyonu tamamlayıcı rolü kesinleşmiştir. Kombinasyon tedavisinin direnci azalttığı belirtilmiştir. Bunlardan dolayı rifampisin, MRSA ile oluşan biyofilm tabakasına karşı kombinasyon tedavisinde diğer antistafilokokkal antibiyotiklerle birlikte en çok tercih edilen antibiyotik olmuştur [80, 88].

Minosiklin daha önceki çalışmalarda biyofilm tabakasına karşı oldukça etkili bulunmuştur. Ayrıca in vitro yapılan bir çalışmada *S. aureus* ve *S. epidermidis* ile kateter yüzeylerindeki biyofilm tabakasına vankomisin veya vankomisin + heparinden daha etkili bulunmuştur [89]. Yine aynı çalışmada minosikline EDTA eklenerek etkinliği arttırılmıştır. Bu sayede biyofilm tabakasını daha etkin biçimde ortadan kaldırmak mümkün olmuştur [89]. Takip eden klinik çalışmalarda hemodiyaliz hastaları ve pediatrik kanserli hastalarda minosiklin + EDTA, heparine göre kateter kolonizasyonu ve kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında anlamlı şekilde daha etkin bulunmuştur [90, 91]. Minosiklin, EDTA ve %25' lik etanol üçlü kombinasyonu ile MRSA ile oluşan biyofilm tabakasının 15 dakika gibi kısa sürede ortadan kaldırabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [92].

Bir minosiklin türevi olan tigesiklinin biyofilm tabakası içerisinde MRSA ve glikopeptid-intermediate *S. aureus* suşlarına etkili olduğu bildirilmiştir [69]. Farelerle yapılan deneylerde tigesiklin, vankomisinden üstün ve daptomisin kadar etkili bulunmuştur [73].

Dört prospektif randomize kontrollü klinik çalışmada kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarını önlemede minosiklin ve rifampisin ile kaplı santral venöz kateterlerin

antibiyotik kaplı olmayan veya diğer antiseptik kaplı kateterlere üstün olduğu gösterilmiştir [93-96].

Başka bir çalışmada tigesiklin ve minosiklinin, *S. epidermidis* biyofilm modelinde bakterilere planktonik bakterilere olduğu kadar etkili olabildiği gösterilmiş ve tigesiklinin biyofilm tabakası içine çok iyi geçebildiği belirtilmiştir [97]. Tigesiklinin günlük 100 mg'lık doz ile 2 mg/L serum konsantrasyonu sağlandığı ve 8-32 MIC gibi orta düzey konsantrasyonlarda biyofilm tabakasına etkili olduğu belirtilmiştir [82].

Her ne kadar tigesiklin biyofilm tabakasına iyi geçse de daha hızlı etki elde etmek için tigesiklin de çeşitli kombinasyon tedavilerinde denenmektedir. N-acetylcysteine ile yapılan kombinasyon tedavisinde MRSA'ya bağlı biyofilm tabakasına sinerjistik etki elde edilebileceği bildirilmiştir [98].

Bizim çalışmamızda da tigesiklin vankomisine göre in vitro koşullarda MRSA ile oluşan biyofilm tabakasına belirgin olarak daha etkili bulunmuştur. Bu sonuca göre kateter enfeksiyonları tedavisinde tigesiklinin iyi bir seçenek olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUC VE ÖNERİLER:

Biyofilm ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde dört ana strateji mevcuttur. Birincisi kateterin optimal aseptik koşullarda takılması, kontaminasyonun önlenmesi ve kateterin mümkün olduğunca kısa süreli vücutta bırakılmasıdır. İkincisi mikroorganizmaların katetere ataklarını en aza indirmektir. Bunu sağlamak için antibiyotik kaplı santral venöz kateterler kullanılabilir. Üçüncüsü enfeksiyonun tedavisi için biyofilm içerisine geçebilen antibiyotiklerin, yüksek doz antibiyotik kilit tedavisinde kullanılmasıdır. Sonuncu ve kesin çözüm ise enfekte kateterin çıkarılarak uzaklaştırılmasıdır. Ancak her zaman kateterin çıkarılması mümkün olmamaktadır.

MRSA' ya bağlı biyofilm tabakasını ortadan kaldırmak oldukça güçtür ve klinikte karşımıza oldukça inatçı enfeksiyonlar olarak çıkmaktadır. MRSA' ya bağlı kateter enfeksiyonlarında kateter kurtarma tedavisi gerekebilmektedir. Bu gibi durumlarda ciddi yan etkileri olan ve biyofilm tabakasına etkisi az olan vankomisin tedavisine alternatif tedaviler gerekmektedir.

Tigesiklinin önemli yan etkilerinin olmayışı, dirençli organizmalara karşı yüksek etkinlik göstermesi ve dokulara vankomisinden daha iyi geçmesi gibi avantajlarının olması nedeniyle kateter kurtarma tedavisinde vankomisine iyi bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak antibiyotik kilit tedavisinde kullanılacak antibiyotikler biyofilm tabakasına etkili olmalıdır. Tigesiklin vankomisine göre in vitro koşullarda MRSA ile oluşan biyofilm tabakasına belirgin olarak daha etkili bulunmuştur. Ancak klinik olarak kullanılabilmesi için bu konuda yapılacak çok sayıda klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Mandell, G.L., J.E. Bennet, and R. Dolin, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)*. Pliladelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p. 2321-2351.
2. Ulusoy, S., *Tigesiklin*. ANKEM Derg, 2006. 20(Ek 2): p. 117-119.
3. Sorlozano, A., et al., *A comparison of the activity of tigecycline against multiresistant clinical isolates of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. 58(4): p. 487-9.
4. Pankey, G.A., *Tigecycline*. J Antimicrob Chemother, 2005. 56(3): p. 470-80.
5. Postier, R.G., et al., *Results of a multicenter, randomized, open-label efficacy and safety study of two doses of tigecycline for complicated skin and skin-structure infections in hospitalized patients*. Clin Ther, 2004. 26(5): p. 704-14.
6. Sacchidanand, S., et al., *Efficacy and safety of tigecycline monotherapy compared with vancomycin plus aztreonam in patients with complicated skin and skin structure infections: Results from a phase 3, randomized, double-blind trial*. Int J Infect Dis, 2005. 9(5): p. 251-61.
7. Willke Topçu, A., G. Söyletir, and M. Doğanay, *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Stafilokoklar*. 3. Baskı, 2008: p. 2065-2077.
8. Murray, P., et al., *Klinik Mikrobiyoloji. Staphylococcus, Micrococcus ve Diğer Katalaz Pozitif Koklar*. . 9. baskı, 2007: p. 390-411.
9. Lowy, F.D., *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2003. 111(9): p. 1265-73.
10. Chambers, H.F., *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev, 1997. 10(4): p. 781-91.
11. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin*. Lab Invest, 2007. 87(1): p. 3-9.
12. Balaban, N. and A. Rasooly, *Staphylococcal enterotoxins*. Int J Food Microbiol, 2000. 61(1): p. 1-10.
13. Novick, R.P., et al., *Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule*. EMBO J, 1993. 12(10): p. 3967-75.
14. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. 8(9): p. 881-90.
15. Watnick, P. and R. Kolter, *Biofilm, city of microbes*. J Bacteriol, 2000. 182(10): p. 2675-9.
16. Sutherland, I.W., *The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment*. Trends Microbiol, 2001. 9(5): p. 222-7.
17. Branda, S.S., et al., *Biofilms: the matrix revisited*. Trends Microbiol, 2005. 13(1): p. 20-6.
18. Hussain, M., M.H. Wilcox, and P.J. White, *The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence*. FEMS Microbiol Rev, 1993. 10(3-4): p. 191-207.
19. Leriche, V., P. Sibille, and B. Carpentier, *Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2000. 66(5): p. 1851-6.
20. Donlan, R.M., *Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process*. Clin Infect Dis, 2001. 33(8): p. 1387-92.
21. Bullitt, E. and L. Makowski, *Structural polymorphism of bacterial adhesion pili*. Nature, 1995. 373(6510): p. 164-7.
22. Fitzpatrick, F., H. Humphreys, and J.P. O'Gara, *The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?* Clin Microbiol Infect, 2005. 11(12): p. 967-73.
23. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. 284(5418): p. 1318-22.
24. Stewart, P.S., *Diffusion in biofilms*. J Bacteriol, 2003. 185(5): p. 1485-91.
25. Davison, J., *Genetic exchange between bacteria in the environment*. Plasmid, 1999. 42(2): p. 73-91.
26. Hausner, M. and S. Wuertz, *High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis*. Appl Environ Microbiol, 1999. 65(8): p. 3710-3.
27. Patel, R., *Biofilms and antimicrobial resistance*. Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 41-7.
28. Kjelleberg, S. and S. Molin, *Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?* Curr Opin Microbiol, 2002. 5(3): p. 254-8.
29. Davies, D.G., et al., *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, 1998. 280(5361): p. 295-8.

30. Douglas, L.J., *Candida biofilms and their role in infection*. Trends Microbiol, 2003. 11(1): p. 30-6.
31. Teale, C.J., *Antimicrobial resistance and the food chain*. J Appl Microbiol, 2002. 92 Suppl: p. 85S-9S.
32. Donlan, R.M., *Biofilms and device-associated infections*. Emerg Infect Dis, 2001. 7(2): p. 277-81.
33. Mah, T.F. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol, 2001. 9(1): p. 34-9.
34. Öztürk, R., *Damari içi kateterlere bağlı enfeksiyonlar ve korunma*. Hastane Enfeksiyonları. Ed. Doğanay M, Ünal S, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara: p. 489-518.
35. CDC, *Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections*. MMWR 2002; 51 (no. RR-10).
36. *Hastane Enfeksiyonları ve Kontrolü Derneği. Damariçi kateter enfeksiyonlarının önlenmesi kılavuzu*. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 2005. 9: p. 5-28.
37. Bouza, E., A. Burillo, and P. Munoz, *Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment*. Clin Microbiol Infect, 2002. 8(5): p. 265-74.
38. Bouza, E., *Intravascular catheter-related infections: a growing problem, the search for better solutions*. Clin Microbiol Infect, 2002. 8(5): p. 255.
39. Mermel, L.A., et al., *Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections*. Clin Infect Dis, 2001. 32(9): p. 1249-72.
40. Fatkenheuer, G., et al., *Central venous catheter (CVC)-related infections in neutropenic patients--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)*. Ann Hematol, 2003. 82 Suppl 2: p. S149-57.
41. Mandell, G.L., J.E. Bennet, and R. Dolin, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Infections Caused by Percutaneous Intravascular Devices*. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p. 3347-3362.
42. Eggimann, P. and D. Pittet, *Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs*. Clin Microbiol Infect, 2002. 8(5): p. 295-309.
43. Pascual, A., *Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs*. Clin Microbiol Infect, 2002. 8(5): p. 256-64.
44. Garner, J.S., et al., *CDC definitions for nosocomial infections, 1988*. Am J Infect Control, 1988. 16(3): p. 128-40.
45. Pearson, M.L., *Guideline for prevention of intravascular device-related infections*. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. 17(7): p. 438-73.
46. Bradford, P.A., *Tigecycline: A first in class tygecycline*. Clin Microbiol Newsletter, 2004. 26(21): p. 163-8.
47. Garrison, M.W., J.J. Neumiller, and S.M. Setter, *Tigecycline: an investigational glycylycline antimicrobial with activity against resistant gram-positive organisms*. Clin Ther, 2005. 27(1): p. 12-22.
48. Noskin, G.A., *Tigecycline: a new glycylycline for treatment of serious infections*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 5: p. S303-14.
49. Nathwani, D., *Tigecycline: clinical evidence and formulary positioning*. Int J Antimicrob Agents, 2005. 25(3): p. 185-92.
50. Bouchillon, S.K., et al., *In vitro activity of tigecycline against 3989 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the United States Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program; 2004)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. 52(3): p. 173-9.
51. <http://www.tygacil.com>.
52. Murray J, Wilson S, and Klein S, *The clinical response to tigecycline in the treatment of complicated intra-abdominal infections in hospitalized patients, a phase 2 clinical trial (Abstract L-739)*. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Program and Abstracts, Chicago, 2003: p. 416.
53. Mandell, G.L., J.E. Bennet, and R. Dolin, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Glycopeptides (Vankomycin and Teicoplanin), Streptogramins (Quinupristin-Dalfopristin), and Lipopeptides (Daptomycin)*. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p. 417-34.
54. Wunderink, R.G., et al., *Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus nosocomial pneumonia*. Chest, 2003. 124(5): p. 1789-97.
55. Weigelt, J., et al., *Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(6): p. 2260-6.
56. Weigelt, J., et al., *Linezolid eradicates MRSA better than vancomycin from surgical-site infections*. Am J Surg, 2004. 188(6): p. 760-6.

57. Kollef, M.H., et al., *Clinical cure and survival in Gram-positive ventilator-associated pneumonia: retrospective analysis of two double-blind studies comparing linezolid with vancomycin*. Intensive Care Med, 2004. 30(3): p. 388-94.
58. Mandell, G.L., J.E. Bennet, and R. Dolin, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Tables of Antimicrobial Agent Pharmacology*. Pliladelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p. 635-700.
59. Conte, J.E., Jr., et al., *Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(5): p. 1475-80.
60. Gee, T., et al., *Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(6): p. 1843-6.
61. MacGowan, A.P., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections*. J Antimicrob Chemother, 2003. 51 Suppl 2: p. ii17-25.
62. Shorr, A.F., G.M. Susla, and M.H. Kollef, *Linezolid for treatment of ventilator-associated pneumonia: a cost-effective alternative to vancomycin*. Crit Care Med, 2004. 32(1): p. 137-43.
63. Wilcox, M.H., *Update on linezolid: the first oxazolidinone antibiotic*. Expert Opin Pharmacother, 2005. 6(13): p. 2315-26.
64. Drew, R.H., et al., *Treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group*. J Antimicrob Chemother, 2000. 46(5): p. 775-84.
65. Loeffler, A.M., et al., *Safety and efficacy of quinupristin/dalfopristin for treatment of invasive Gram-positive infections in pediatric patients*. Pediatr Infect Dis J, 2002. 21(10): p. 950-6.
66. Rotschafer, J.C., D.H. Wright, and G.H. Brown, *Gram-positive infections: pharmacy issues and strategy for quinupristin/dalfopristin*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999. 33(2): p. 95-9.
67. Mandell, G.L., J.E. Bennet, and R. Dolin, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Rifamycins*. Pliladelphia, Pennsylvania, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p. 374-88.
68. Gottlieb, T. and D. Mitchell, *The independent evolution of resistance to ciprofloxacin, rifampicin, and fusidic acid in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Australian teaching hospitals (1990-1995)*. Australian Group for Antimicrobial Resistance (AGAR). J Antimicrob Chemother, 1998. 42(1): p. 67-73.
69. Raad, I., et al., *Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant Staphylococcus bacteremic isolates embedded in biofilm*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(5): p. 1656-60.
70. <http://www.clsi.org>.
71. Arciola, C.R., et al., *Congo red agar plate method: improved accuracy and new extended application to Staphylococcus aureus*. New Microbiol, 2001. 24(4): p. 355-63.
72. Curtin, J., et al., *Linezolid compared with eperezolid, vancomycin, and gentamicin in an in vitro model of antimicrobial lock therapy for Staphylococcus epidermidis central venous catheter-related biofilm infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(10): p. 3145-8.
73. Petersen, P.J., et al., *In vitro and in vivo activities of tigecycline (GAR-936), daptomycin, and comparative antimicrobial agents against glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus and other resistant gram-positive pathogens*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(8): p. 2595-601.
74. Wiederhold, N.P., et al., *Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an in vitro pharmacodynamic model of gram-positive catheter-related bacteraemia*. J Antimicrob Chemother, 2005. 55(5): p. 792-5.
75. Bailey, E., N. Berry, and J.S. Cheesbrough, *Antimicrobial lock therapy for catheter-related bacteraemia among patients on maintenance haemodialysis*. J Antimicrob Chemother, 2002. 50(4): p. 615-7.
76. Krishnasami, Z., et al., *Management of hemodialysis catheter-related bacteremia with an adjunctive antibiotic lock solution*. Kidney Int, 2002. 61(3): p. 1136-42.
77. Longuet, P., et al., *Venous access port--related bacteremia in patients with acquired immunodeficiency syndrome or cancer: the reservoir as a diagnostic and therapeutic tool*. Clin Infect Dis, 2001. 32(12): p. 1776-83.
78. Chang, S., et al., *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene*. N Engl J Med, 2003. 348(14): p. 1342-7.
79. Rose, W.E. and P.T. Poppens, *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(3): p. 485-8.

80. Saginur, R., et al., *Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(1): p. 55-61.
81. Fujimura, S., et al., *Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming Staphylococcus aureus*. J Orthop Sci, 2009. 14(5): p. 658-61.
82. Hajdu, S., et al., *Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecycline, and ceftriaxone on Staphylococcus epidermidis biofilms*. J Orthop Res, 2009.
83. Fuchs, P.C., A.L. Barry, and S.D. Brown, *In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci*. J Antimicrob Chemother, 2002. 49(3): p. 467-70.
84. Shanks, R.M., et al., *Heparin stimulates Staphylococcus aureus biofilm formation*. Infect Immun, 2005. 73(8): p. 4596-606.
85. Grohs, P., M.D. Kitzis, and L. Gutmann, *In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(1): p. 418-20.
86. Jones, S.M., et al., *Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms*. Lancet, 2001. 357(9249): p. 40-1.
87. Munson, E.L., S.O. Heard, and G.V. Doern, *In vitro exposure of bacteria to antimicrobial impregnated-central venous catheters does not directly lead to the emergence of antimicrobial resistance*. Chest, 2004. 126(5): p. 1628-35.
88. Raad, I., et al., *Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. 39(11): p. 2397-400.
89. Raad, I., et al., *In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(11): p. 3580-5.
90. Bleyer, A.J., et al., *A randomized, controlled trial of a new vascular catheter flush solution (minocycline-EDTA) in temporary hemodialysis access*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. 26(6): p. 520-4.
91. Chatzinikolaou, I., et al., *Minocycline-ethylenediaminetetraacetate lock solution for the prevention of implantable port infections in children with cancer*. Clin Infect Dis, 2003. 36(1): p. 116-9.
92. Raad, I., et al., *Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(1): p. 78-83.
93. Chatzinikolaou, I., et al., *Antibiotic-coated hemodialysis catheters for the prevention of vascular catheter-related infections: a prospective, randomized study*. Am J Med, 2003. 115(5): p. 352-7.
94. Darouiche, R.O., et al., *A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters*. Catheter Study Group. N Engl J Med, 1999. 340(1): p. 1-8.
95. Hanna, H., et al., *Long-term silicone central venous catheters impregnated with minocycline and rifampin decrease rates of catheter-related bloodstream infection in cancer patients: a prospective randomized clinical trial*. J Clin Oncol, 2004. 22(15): p. 3163-71.
96. Raad, I., et al., *Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections. A randomized, double-blind trial*. The Texas Medical Center Catheter Study Group. Ann Intern Med, 1997. 127(4): p. 267-74.
97. Labthavikul, P., P.J. Petersen, and P.A. Bradford, *In vitro activity of tigecycline against Staphylococcus epidermidis growing in an adherent-cell biofilm model*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(12): p. 3967-9.
98. Aslam, S., et al., *Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(4): p. 1556-8.