

Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumunun Çeşitli Kongo Kırmızısı Besiyerlerinde Değerlendirmesi

Evaluation of Biofilm Formation in Coagulase Negative Staphylococci on Various Congo Red Agar Medium

© Duygu Öcal, © Alper Tekeli, © İştah Dolapçı

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

Öz

Amaç: Bu çalışmada koagülaz negatif stafilokok (KNS) izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin saptanmasında kullanılan Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyeri ve modifikasyonlarının performanslarının mikropak yöntemi ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 24'ü (%30) kateter kolonizanı, 13'ü (%16,25) kan dolaşım enfeksiyonu (KDE) etkeni, 20'si (%25) kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu (KİKDE) etkeni ve 23'ü (%28,75) hastane çalışanlarının burun boşluklarından elde edilen olmak üzere toplam 80 KNS izolatı değerlendirilmiştir. Biyofilm özelliklerinin incelenmesinde KKA besiyerleri [KKA G (%2 glukoz ilaveli), KKA GN (%2 glukoz ve %1,5 NaCl ilaveli), KKA GNV (%2 glukoz, %1,5 NaCl 0,5 µg/mL vankomisin ilaveli)] ve mikropak yöntemi kullanılmıştır. Mikropak yöntemi ile kıyaslanarak KKA besiyerleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır.

Bulgular: İzolatların %36,25'i *Staphylococcus hominis*, %35'i *Staphylococcus epidermidis*, %13,75'i *Staphylococcus haemolyticus*, %11,25'i *Staphylococcus capitis*, %2,5'i *Staphylococcus saprophyticus* ve %1,25'i *Staphylococcus warnerii* olarak tiplendirilmiştir. KKA yöntemi ile 34'ü (%42,5), mikropak yöntemi ile 57'si (%71,25) [18'i (%22,5) zayıf, 24'ü (%30) orta kuvvette ve 15'i (%18,75) kuvvetli], biyofilm pozitif olarak saptanmıştır. KDE etkeni olan KNS'lerin 6'sı (%7,5), KİKDE etkeni olan KNS'lerin 20'si (%25), kateter kolonizanı olanların 18'i (%22,5), burun boşluklarından izole edilenlerin 13'ü (%16,25) çeşitli kuvvetlerde biyofilm oluşturmuştur. KKA, KKA G ve KKA GN ve KKA GNV yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %59,6, %59,6, %59,6 ve %58,2, özgüllükleri ise %100'dür.

Sonuç: Stafilokok türlerinde biyofilm oluşumu çeşitli çevresel koşullardan ve besiyeri içeriğinden etkilenmektedir. Çalışmamızda stafilokok izolatlarında biyofilm oluşumunu değerlendirmek için, modifiye KKA besiyerlerinin orijinal KKA besiyerine göre üstünlüğü saptanmamıştır. Biyofilm üreten bakterilerin saptanmasında KKA ve modifiye formlarına kıyasla, mikropak yönteminin kullanılması daha uygundur.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Koagülaz Negatif Stafilokok, Kongo Kırmızısı Agar ve Modifikasyonları, Mikropak Yöntemi

Abstract

Objectives: In this study, it was aimed to evaluate the performance of different Congo red agar (CRA) media and its modifications in comparison with the microplate method in the demonstration of biofilm formation in coagulase negative staphylococcus (CoNS) isolates.

Materials and Methods: A total of 80 CoNS isolates, including 24 (30%) catheter colonizers, 13 (16.3%) bloodstream infection (BSI) agents, 20 (25%) catheter-related bloodstream infection (CR-BSI) agents and 23 (28.8%) obtained from the nasal cavities of hospital staff, were evaluated in the study. In the determination of biofilm formation, CRA mediums (CRA G (2% glucose added), CRA GN (2% glucose and 1.5% NaCl added), CRA GNV (2% glucose, 1.5% NaCl 0.5 µg/mL vancomycin added) and microplate method were used. Sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values were calculated by comparing with the microplate method.

Results: *Staphylococcus hominis* was the most frequently detected species (36.25%), followed by *Staphylococcus epidermidis* (35%), *Staphylococcus haemolyticus* (13.75%), *Staphylococcus capitis* (11.25%), *Staphylococcus saprophyticus* (2.5%), and *Staphylococcus warnerii* (1.25%). Thirty-four (42.5%) isolates were detected by CRA method, 57 (71.25%) [18 (22.5%) weak, 24 (30%) medium strength, 15 (18.75%) strong biofilm] isolates

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Duygu Öcal

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

Tel.: +90 506 621 48 51 E-posta: drduygunil@hotmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0001-9929-267X

Geliş Tarihi/Received: 26.09.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 27.10.2021

©Telif Hakkı 2022 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



were detected by microplate method. Six (7.5%) of CoNS agents of BSI, 20 (25%) of CoNS agents of CRBSI, 18 (22.5%) of those with catheter colonization, 13 (16.3%) of those isolated from nasal cavities formed a biofilm of varying strengths. The sensitivities of the CRA, CRA G, CRA GN and CRA GNV methods were 59.6%, 59.6%, 59.6% and 58.2%, and their specificities were 100%, respectively.

Conclusion: Biofilm formation in staphylococcal species is affected by various environmental conditions and media content. To assess biofilm formation in all staphylococcal isolates, no superiority of modified CRA media was found over the original CRA. Microplate method can be recommended as a general screening method for the detection of biofilm-producing bacteria, compared to CRA and its modified forms.

Key Words: Biofilm, Coagulase Negative Staphylococci, Congo Red Agar and Modified Forms, Microplate Method

Giriş

Stafilokoklar doğada çok yaygın olarak bulunan Micrococcaceae familyası içinde yer alan gram pozitif koklardır. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) deri ve mukoz membranların normal florasında bulunan, hareketsiz, sporsuz bakterilerdir (1).

Vücut savunma mekanizmalarının bozulması, deri bütünlüğünün hasara uğraması, iç ve dış stres faktörleri KNS'lerin hastalık oluşturmalarını artırıcı faktörlerdir. KNS'ler kan dolaşım enfeksiyonu (KDE), endokardit, menenjit, perikardit, artrit, cerrahi yara enfeksiyonu ve kateter ilişkili enfeksiyonlara neden olabilmektedir (2). Stafilocokların, *in vivo*, katı yüzeylere yapışarak biyofilm oluşturma özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Bu özelliğe sahip stafilokoklar protez ya da kateter gibi yabancı cisimler üzerine tutunduktan sonra salgıladıkları hücre dışı polisakarit yapıda madde içerisinde çoğalırlar. "Slime tabakası" adı da verilen bu yapı içerisinde kendilerini konağın bağışıklık yanıtından korurlar, antibiyotiklere dirençli hale gelirler ve bu nedenlerle oluşturdukları enfeksiyonlar daha zor tedavi edilir (2-4).

Biyofilm, genel olarak bir yüzey üzerinde çeşitli türde bakterilerin oluşturduğu mikrokoloniler ve bu kolonilerin ürettikleri ekstrasellüler polisakaritler (EPS), proteinler, çevreden aldıkları organik ve inorganik maddelerden oluşan polimerik yapıda jelsi bir tabaka olarak tanımlanmaktadır (2,5).

Biyofilm oluşumunun gösterilmesinde Christensen yöntemi (kalitatif tüp testi), Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyerine ekim yöntemi, kantitatif mikropalak yöntemi, standart cam tüp deneyi gibi fenotipik yöntemlerin yanı sıra, elektron mikroskopu, konfokal lazer taramalı mikroskopun kullanıldığı çeşitli görüntüleme yöntemleri ve moleküler yöntemler de kullanılabilir. Biyofilm ilişkili protein (*bap*), kemik sialoproteinini bağlayıcı protein (*bbp*), elastin bağlayıcı protein (*ebpS*), laminin bağlayıcı protein (*eno*), fibrinojen bağlayıcı protein (*fib*), fibronektin bağlayıcı protein A ve B (*fnbA* ve *fnbB*), hücreler arası adezin protein A ve D'yi (*icaA* ve *icaD*) kodlayan biyofilm oluşumu ile ilişkili genler, polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilebilmektedir (6-12).

Potansiyel olarak patojenik stafilokokların erken tespiti ve yönetimi, invaziv araç ilişkili hastane enfeksiyonlarının önlenmesi ve yönetimine yönelik temel adımlardan biri olabilir.

Bu süreçte biyofilm üreten mikroorganizmaların tespiti için basit bir yöntem de ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın amacı KNS izolatlarında biyofilm oluşumunu saptamak amacıyla kullanılan tüm yöntemler arasında ucuzluğu ve kolaylığı ile ön plana çıkan KKA yönteminin geçerliliğini besiyerinin çeşitli modifikasyonlarını da kullanarak değerlendirmektir. Bu amaçla KKA besiyerinin içeriğinde değişiklikler yapılarak, modifiye KKA besiyerleri [KKA G (%2 glukoz ilaveli)], KKA GN (%2 glukoz ve %1,5 NaCl ilaveli), KKA GNV (%2 glukoz, %1,5 NaCl 0,5 µg/mL vankomisin ilaveli) oluşturulmuş ve KKA yönteminin duyarlılığının artırılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar mikropalak yöntemi ile karşılaştırılarak, stafilokok izolatlarında biyofilm oluşumunun ucuz ve kolay bir yöntem ile saptanması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin Toplanması

Araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Ocak-Aralık 2014 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya kateter kolonizasyonu (n=24), hastane çalışanlarının burunlarından elde edilen (n=23), kateter ilişkili KDE (KİKDE) etkeni (n=20) ve KDE etkeni (n=13) olmak üzere toplam 80 KNS dahil edilmiştir.

Bakterilerin Tanımlanması

İzolatlar, konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra BD Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ve Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) otomatize sistemleri kullanılarak tanımlanmıştır. %16'lık gliserollü buyyon besiyerine alınarak çalışma gününe kadar -20 °C'de saklanan izolatların %5 koyun kanlı agara ekimi yapılmış, 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilerek, saf kültürleri elde edilmiştir.

Mikropalak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi

İzolatlardan 0,5 McFarland (10⁸kob/mL) standartında bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonunun 20 µl'si steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalak kuyucuklarına aktarılmıştır. Üzerlerine %1 glukoz içeren 180 µl triptik soy buyyon eklenerek 24 saat süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün mikropalak boşaltılıp, 3 kez 200 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkanarak tutunmayan bakteriler

uzaklaştırılmıştır. Plaklar ters çevrilerek havada kurumaya bırakılmış, sonrasında kuyucuklara 200 µl metanol konularak 20 dakika süre ile biyofilm oluşturan bakterilerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyonu takiben metanol boşaltılmış ve plaklar oda ısısında bir gece süre ile ters çevrilerek havada kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün kuyucuklara tutunan bakteriler %0,5'lik kristal viyole ile boyanmış, sonrasında pipetle üzerlerindeki boya çekilerek, steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkanmıştır. Havada kurutulan plakların üzerine %95'lik etanol konularak, oda ısısında 30 dakika, çalkalama olmaksızın inkübe edilmiş ve son olarak kuyucukların absorbanası spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm'de okutulmuştur (13).

Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 kullanılmıştır, sterilite kontrolü için sadece besiyeri içeren, mikroorganizma ilave edilmemiş kuyucuklar hazırlanmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış, sonuçlar üç deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sadece besiyeri içeren kuyucukların optik dansitometrelerinin ortalaması alınmış ve üç standart derivasyonu hesaplanarak OD_c değeri belirlenmiştir. Elde edilen cut-off değerine göre biyofilm pozitiflikleri (OD<OD_c: negatif, OD_c<OD<2xOD_c: +, 2xOD_c<OD<4xOD_c: ++, 4xOD_c<OD: +++) yorumlanmıştır (13).

Biyofilm Oluşumunun KKA ve Modifiye Edilmiş KKA Besiyerlerinde Fenotipik Olarak Gösterilmesi

İzolatların biyofilm özelliklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesi amacıyla KKA besiyeri ve bu besiyerinin vankomisin, NaCl ve %2 glukoz ilave edilerek oluşturulmuş modifikasyonları kullanılmıştır.

KKA besiyeri; beyin kalp infüzyon buyyonu (37 gr/L), sükröz (50 g/L), agar (10 g/L) ve Kongo kırmızısı boyası (0,8 g/L) içerecek şekilde hazırlanmıştır. KKA besiyerinin modifikasyonu için glukoz, NaCl ve vankomisin filtre ile süzülerek steril edilmiş ve otoklavdan çıkartılan besiyeri 55 °C'ye kadar soğuduktan sonra eklenmiştir (14). Modifiye edilmiş KKA besiyerleri; KKA G (%2 glukoz ilaveli), KKA GN (%2 glukoz ve %1,5 NaCl ilaveli), KKA GNV (%2 glukoz, %1,5 NaCl ve 0.5 µg/mL vankomisin ilaveli) besiyerleri olarak adlandırılmıştır (15).

Pozitif kontrol olarak *S. epidermidis* ATCC 35984 kullanılmıştır. Her plak besiyerine en az bir pozitif, bir negatif kontrol ekimi yapılmıştır. KKA besiyerine ekim için iki yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde izolatların besiyerine tek koloni ekimleri yapılmış, ikinci yöntemde seçilen koloniler 5 mL FTS içinde süspanse edilmiş ve 20 µl'si damlatma yöntemi ile plak üzerine aktarılmıştır. Ekim işlemini takiben plaklar 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Yirmi dört saat sonunda etüvden çıkarılan plaklar değerlendirildikten sonra, oda sıcaklığında 24 saat daha bekletilmiş ve 48. saatte yeniden değerlendirilmiştir. Değerlendirme işlemleri iki ayrı araştırmacı tarafından, birbirinden bağımsız olarak yapılmıştır. Kuru kristal

kıvamında koyu kırmızı-siyah renkli koloni oluşturan izolatlar biyofilm pozitif; açık pembe-kırmızı ya da bordo renkte koloni oluşturanlar biyofilm negatif olarak yorumlanmıştır (14).

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi ki-kare ve Fisher's exact testleri kullanılarak yapılmıştır. İki yöntemin sınıflanmış değerleri arasındaki uyumun araştırılmasında Kappa uyum katsayısı ve anlamlılığı hesaplanmıştır. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu'ndan onay (karar no: 03-98-13) ve sağlıklı gönüllülerden "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" alınmıştır.

Bulgular

Bakteri İzolatlarının Tanımlanması

KNS olarak izole edilen izolatların %36,25'i *Staphylococcus hominis* (n=29), %35'i *S. epidermidis* (n=28), %13,75'i *Staphylococcus haemolyticus* (n=11), %11,25'i *Staphylococcus capitis* (n=9), %2,5'i *Staphylococcus saprophyticus* (n=2) ve %1,25'i *Staphylococcus warnerii* (n=1) olarak tiplendirilmiştir. Stafilocok izolatlarının tür düzeyinde bilgileri ve izole edildikleri yerlere göre dağılımları Tablo 1'de verilmiştir.

Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Mikroplak yönteminde OD_c değeri 0,28'in altında değer veren kuyucuklarda biyofilm oluşmadığı; 0,28-0,56 değerleri arasındaki kuyucuklarda zayıf (+); 0,57-1,12 değerleri arasındaki kuyucuklarda orta (++) ; 1,13 ve üzerinde değer veren kuyucuklarda kuvvetli (+++) biyofilm oluştuğu kabul edilmiştir. Buna göre mikroplak yönteminde KNS'lerin 23'ü (%28,75) biyofilm oluşturmamış, 18'i (%22,5) zayıf, 24'ü (%30) orta kuvvette ve 15'i (%18,75) kuvvetli olmak üzere izolatların 57'sinin (%71,25) biyofilm oluşturduğu saptanmıştır.

İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesinde kullanılan KKA besiyerleri 24. ve 48. saatte değerlendirilmiş, 48. saat sonunda dört izolatın biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir (bir adet *S. haemolyticus*, üç *S. hominis*). Sonuçların yorumlanması için 24 saatlik sürenin daha uygun olduğuna karar verilmiştir. KKA besiyerlerine ekim yapılmasında uygulanan tek koloni ekimi ve damlatma yöntemleri arasında biyofilm oluşumunu saptama açısından fark bulunamamakla birlikte, sonuçları değerlendirirken damlatma yöntemi ile yapılan ekimlerin daha kolay yorumlandığı görülmüştür. On iki *S. epidermidis*, 12 *S. hominis*, 5 *S. haemolyticus*, 4 *S. capitis* ve bir *S. saprophyticus* izolatı olmak

üzere çalışılan toplam 80 KNS izolatın 34'ü (34/80; %42,5) KKA besiyerinde biyofilm pozitif olarak saptanmıştır. Bu verilere dayanarak mikrop plak yönteminin biyofilm oluşumunu KKA yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla saptadığı belirlenmiştir ($p < 0,001$).

KNS izolatlarının türlere göre mikrop plak yönteminde ve KKA'da saptanan biyofilm oluşturma oranları Tablo 2'de gösterilmiştir.

KKA besiyerinde toplam 34 izolatta biyofilm oluşumu saptanırken modifiye KKA besiyerlerinden, KKA G ve KKA GN besiyerlerinde yine 34 (%42,5), KKA GNV besiyerinde ise 32 (%40) KNS'de biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Rakam olarak bakıldığında biyofilm oluşumu saptama açısından besiyerleri arasında az farklılık görülmekle birlikte, modifiye KKA besiyerlerinde üremeleri ve biyofilm oluşturmaları ile ilgili izolot bazında farklılıklar bulunmuştur. İki kateter kolonizasyonu (*S.*

epidermidis), ikisi KİKDE etkeni (*S. hominis*) olan 4 adet KNS izolatı KKA GNV besiyerinde üretilmemiştir. İki KDE etkeni (*S. hominis* ve *S. epidermidis*) KKA'da biyofilm oluşturmazken, modifiye besiyerlerinde (KKA G, KKA GN ve KKA GNV) biyofilm oluşturmuştur. İki kateter kolonizasyonu (*S. epidermidis*) KKA'da biyofilm oluştururken, modifiye besiyerlerinde (KKA G, KKA GN ve KKA GNV) biyofilm oluşturmamıştır (Tablo 3). KKA besiyeri ve modifikasyonlu besiyerlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) Tablo 4'te görülmektedir.

KNS izolatlarının elde edildikleri bölgelere göre KKA ve mikrop plak yönteminde oluşturdukları biyofilm oranları Tablo 5'te verilmiştir. İzolatlar elde edildikleri bölgelere göre tek tek ele alınarak yöntemler arası fark değerlendirilmek istendiğinde, sayılarının azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı fark vermeye uygun bulunmamıştır. Ancak rakamlar incelendiğinde, burun boşluğundan izole edilenler dışında tüm KNS'lerde

Tablo 1: KNS türlerinin izole edildikleri yerlere göre dağılımı

Tür	Burun n (%)	Kateter kolonizasyonu n (%)	KDE* n (%)	KİKDE** n (%)	Toplam n (%)
<i>Staphylococcus hominis</i>	11 (13,8)	10 (12,5)	4 (5)	4 (5)	29 (36,25)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (1,25)	9 (11,3)	8 (10)	10 (12,5)	28 (35)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	4 (5)	1 (1,25)	6 (7,5)	11 (13,75)
<i>Staphylococcus capitis</i>	8 (10)	1 (1,25)	-	-	9 (11,25)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2 (2,5)	-	-	-	2 (2,5)
<i>Staphylococcus warnerii</i>	1 (1,25)	-	-	-	1 (1,25)
Toplam	23 (28,75)	24 (30)	13 (16,3)	20 (25)	80 (100)

*KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu

**KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu

KNS: Koagülaz negatif stafilocoklar

Tablo 2: KNS izolatlarının KKA besiyeri ve mikrop plak yöntemi ile saptanan biyofilm oluşturma oranlarının karşılaştırılması

Türler	KKA	Mikrop plak Yöntemi			
		Biyofilm yok n (%)	Zayıf (+) biyofilm n (%)	Orta (++) biyofilm n (%)	Kuvvetli (+++) biyofilm n (%)
<i>Staphylococcus hominis</i> (n=29)	KKA (+)	-	5 (17,24)	6 (20,68)	1 (3,44)
	KKA (-)	8 (27,58)	1 (3,44)	6 (20,68)	2 (6,89)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=28)	KKA (+)	-	1 (3,57)	7 (25)	4 (14,28)
	KKA (-)	6 (21,42)	5 (17,85)	-	5 (17,85)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=11)	KKA (+)	-	-	3 (27,27)	2 (18,18)
	KKA (-)	3 (27,27)	2 (18,18)	1 (9,09)	-
<i>Staphylococcus capitis</i> (n=9)	KKA (+)	-	3 (3,3)	-	1 (1,1)
	KKA (-)	4 (4,4)	-	1 (1,1)	-
Diğerleri* (n=3)	KKA (+)	-	1 (33,3)	-	-
	KKA (-)	2 (66,6)	-	-	-
Toplam (n=80)		23 (28,75)	18 (22,5)	24 (30)	15 (18,75)

Yüzde oranları tür üzerinden verilmiştir.

KKA (+): Kongo kırmızısı agar besiyerinde biyofilm oluşturan

KKA (-): Kongo kırmızısı agar besiyerinde biyofilm oluşturmayan

*Diğerleri: *S. warnerii* (n=1) ve *S. saprophyticus* (n=2)

KNS: Koagülaz negatif stafilocoklar

mikroplak yönteminin biyofilm oluşumunu ortaya koymadaki üstünlüğü dikkat çekmektedir.

Mikroplak yöntemi temel alınarak izolatların izole edildikleri bölgelere göre biyofilm oluşturma oranları incelendiğindeyse, KİKDE etkenlerinin, diğer izolatlara göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturmaları anlamlı olarak kabul edilmiştir ($p<0,001$). Kuvvetli biyofilm oluşturan 20 izolatın büyük çoğunluğunun KİKDE etkenlerinden oluşması da (8/20) istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p<0,001$). KKA'da biyofilm oluşturmamayan ama modifiye besiyerlerinde biyofilm oluşturan iki KDE etkeninden *S. hominis* orta kuvvette biyofilm, *S. epidermidis* ise zayıf biyofilm oluşturmuştur. KKA'da biyofilm oluşturan ama modifiye besiyerlerinde biyofilm oluşturmamayan iki kateter kolonizanı *S. epidermidis*'in biri orta kuvvette biyofilm, diğeri ise zayıf biyofilm oluşturmuştur.

Tartışma

Micrococcaceae familyası üyesi olan stafilocoklar, toprakta, suda, havada yaygın olarak saptanan ayrıca insan ve hayvanların

derileri üzerinde doğal flora elemanı olarak bulunabilen mikroorganizmalardır (1).

Stafilocoklar, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biridir. Stafilocokların virülans faktörlerinden birisi olan biyofilm tabakası oluşturmaları, bu mikroorganizmaların hastalık oluşturma yeteneklerini artırmaktadır (2).

Tek veya farklı türlerde bakteriler, canlı veya cansız yüzeylerde adezyon sonrası çoğalarak mikroorganizma toplulukları oluşturabilir. Bu bakteriler, polisakkaritler, protein, ekstrasellüler DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içeren EPS ile birlikte biyofilm yapısını oluştururlar. Bir biyofilm içinde olmak bakteriye, konakçı bağışıklık sisteminden ve antimikrobialardan korunma, su tutma ve kuruma toleransı, besin emilimi ve depolama, yüksek hücre dışı enzimatik aktivite, enfeksiyon bölgesine yapışma ve quorum sensing yoluyla iletişim gibi bir dizi avantaj sağlar (16,17).

Çalışmamızda en sık izole edilen stafilocoklar *S. hominis* (n=29) ve *S. epidermidis*'tir (n=28). Adaptasyon yeteneği ve insan derisi ve mukozası üzerindeki yüksek hakimiyeti nedeniyle (18),

Tablo 3: KKA ve modifiye KKA besiyerleri ve mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumu oranları

	KKA	KKA G	KKA GN	KA GNV	Mikroplak yöntemi
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=28)	16	15	15	15	22
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=11)	3	3	3	3	8
<i>Staphylococcus hominis</i> (n=29)	11	12	12	10	21
Diğerleri (n=12)	4	4	4	4	6
Toplam	34	34	34	32	57

KKA: Kongo kırmızısı agar, KKA G: KKA glukoz, KKA GN: KKA glukoz NaCl, KKA GNV: KKA glukoz NaCl vankomisin

Tablo 4: KKA besiyerlerinin mikroplak yöntemi ile karşılaştırılarak belirlenen duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

	KKA besiyeri	KKA G besiyeri	KKA GN besiyeri	KKA GNV besiyeri
Duyarlılık	%59,6	%59,6	%59,6	%58,2
Özgüllük	%100	%100	%100	%100
Pozitif prediktif değer	%100	%100	%100	%100
Negatif prediktif değer	%50	%50	%50	%47,7

KKA: Kongo kırmızısı agar, KKA G: KKA glukoz, KKA GN: KKA glukoz NaCl, KKA GNV: KKA glukoz NaCl vankomisin

Tablo 5: KNS'lerin izole edildikleri bölgelere göre KKA ve mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi

KKA (+) n (%)	İzolasyon bölgesi	Mikroplak yöntemi n (%)	Mikroplak Yöntemi		
			Zayıf (+) biyofilm n	Orta (++) biyofilm n	Kuvvetli (+++) biyofilm n
3 (23,07)	KDE (n=13)	6 (46,15)	3	3	-
13 (65)	KİKDE (n=20)	20 (100)	4	8	8
6 (25)	Kateter kolonizanı (n=24)	18 (75)	3	10	5
12 (52,17)	Burun boşluğu (n=23)	13 (56,52)	8	3	2
34 (42,5)	Toplam (n=80)	57 (71,25)	18	24	15

KKA: Kongo kırmızısı agar, KNS: Koagülaz negatif stafilocoklar, KDE: Kan dolaşım enfeksiyonu, KİKDE: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu

biyofilm oluşumu ile ilgili birçok çalışmada da *S. epidermidis*'in en sık izole edilen stafilocok türü olduğu bildirilmiştir (19-21).

Kongo kırmızısı, benzidin ve naftionik asit kombinasyonundan oluşan boyar bir maddedir ve KKA besiyerine ekim yöntemi ile biyofilm oluşumu saptanma yönteminin temeli; sentezlenen EPS'nin Kongo kırmızısı tarafından boyanmasına bağlıdır. Yöntem çeşitli ortam koşullarından etkilenmektedir ve değerlendirimi subjektiftir. Çalışmamızda mikroplak yöntemiyle biyofilm pozitif olduğu saptanan 4 izolatın, KKA besiyerlerinin 24. saat değerlendirmesinde pozitif iken, 48. saatte negatife dönmesi nedeniyle, plakların 24. saatte değerlendirmenin uygun olduğuna karar verilmiştir. Yirmi dördüncü saatte 39 (%51,3) olan biyofilm pozitif izolat sayısının 48. saatte değerlendirildiğinde 20'ye (%26,3) düştüğünü gösteren çalışmalar da vardır (15). Kateter ve kan izolatu olan KNS'lerin biyofilm oluşturma özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada 3 ile 5 nesil sonrasında KKA üzerinde kolonilerin siyahtan bordo ve pembe renklere doğru değişim gösterdiği ve bu durumun biyofilm oluşumu değerlendirmelerini etkilediği belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu bulguları destekler nitelikte veriler elde edilmiştir. Koloni rengindeki bu değişimin açıklanmasına yönelik iki hipotez öne sürülmektedir. Bunlardan ilki biyofilm oluşumu için *in vivo* ve *in vitro* koşullar arasındaki besin bileşenleri, pH, oksijen radikalleri ve antibiyotikler gibi farklı çevresel koşulların yarattığı pozitif seçici ortam varlığı; ikincisi ise biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu kesin bilinen *icaA* ve *icaD* genlerinin kaybı ya da mutasyona uğramasıdır (22).

KKA besiyerlerine ekim yapılmasında tek koloni pasajı ve damlatma yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır. Aynı besiyerinde bazen iki farklı plakta oluşan kolonilerin zaman zaman farklı renkte röfleler vermesinden dolayı tek koloni ekiminin değerlendirmesinde zorluk yaşanmıştır. Bu nedenle damlatma ekimi yapılmasının uygun olacağı düşünülmüş, çeşitli yayınlarda da uygulama ve değerlendirim kolaylığı nedeniyle önerildiği görülmüştür (15,23).

Biyofilm oluşumunun gösterilmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması ile ilgili çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda toplam 80 KNS izolatının KKA besiyeri ile 34'ünde (%42,5), mikroplak yöntemi ile de 57'sinde (%71,25) biyofilm oluşumu gösterilmiş ve biyofilm oluşumunu saptama açısından iki yöntem arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Kitti ve ark. (24) metisilin dirençli 55 KNS izolatında KKA yöntemi (%87,3) ve mikroplak yöntemi (%61,7) ile biyofilm oluşumunu incelemiş ve KKA yöntemi ile daha yüksek oranda biyofilm oluşumu tespit edildiğini göstermiştir. Kırmusaoğlu (25) çalışmasında 121 stafilocokun (%54 *S. epidermidis* ve %46 *Staphylococcus aureus*) biyofilm özelliklerini incelemiş ve KKA ile 48'inde (%40), mikroplak yöntemi ile 62'sinde (%51) biyofilm oluşumu saptamıştır.

Manandhar ve ark. (19) 375 *stafilocokun* [214 (%57) KNS ve 161 (%43) *S. aureus*] biyofilm özelliklerini araştırmış ve izolatların %5,3'ünde ($n=20$) KKA ile, %22,1'inde ($n=83$) mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunu göstermiştir. Mathur ve ark.'nın (26) 152 KNS izolatının biyofilm özelliklerini tüp metodu, KKA ve mikroplak yöntemlerini kullanarak araştırdıkları çalışmalarında; KKA ile 8'inde (%5,2), mikroplak yöntemi ile 82'sinde (%53,9) biyofilm oluşumu gösterilmiş ve mikroplak yönteminin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Mikroplak yöntemi ve KKA arasında zayıf bir uyum olduğunu, KKA duyarlılığının az olduğunu gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır (27,28). Kord ve ark. (27) 41 *S. epidermidis* izolatının %53,6'sında tüp ve mikroplak metodu ile, %24,4'ünde KKA yöntemi ile biyofilm oluşumunu göstermiştir. Manandhar ve ark.'da (28) çalışmalarında mikroplak yöntemi (%42,1) ile tüp metodu (%31,8) ve KKA yöntemine (%20,1) göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu saptamıştır. Bizim çalışmamızda da KKA yönteminde mikroplak yöntemine göre daha az oranda biyofilm oluşumu gösterilmiştir.

Çalışmamızda mikroplak yöntemi ile 18'i (%22,5) zayıf, 24'ü (%30) orta, ve 15'i (%18,8) kuvvetli olmak üzere toplam 57 KNS'de biyofilm oluşumu saptanmıştır. Mathur ve ark. (26) modifiye mikroplak yöntemi kullandıkları çalışmalarında biyofilm oluşturmayan/zayıf biyofilm oluşturan 70 (%46,0), orta kuvvette biyofilm oluşturan 60 (%39,4), güçlü biyofilm oluşturan 22 (%14,4) izolat saptamıştır. Hassan ve ark.'nın (20) çalışmalarında kullanılan izolatlar üriner kateter, intravenöz kateter ucu gibi örneklerden elde edilmiş, invaziv araç ilişkili enfeksiyon etkenleridir, orta ve kuvvetli biyofilm oranı yüksektir. Mathur ve ark.'nın (26) çalışmalarında kullandıkları stafilocoklar kandan, enfekte araç ve deri yüzeylerinden elde edilmiştir ve biyofilm oluşum oranı yüksektir. Çalışmamızda da değerlendirilen izolatlar arasında KİKDE etkeni izolatlar olması nedeniyle, orta ve kuvvetli biyofilm oluşturma oranı yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0,001$).

KKA besiyerininin duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD değerlendirildiği çalışmalarda; Manandhar ve ark. (19) sırasıyla bu değerleri %14, %88,2, %26,1, %77,5; Kırmusaoğlu (25) %77, %100, %100, %81; Hassan ve ark. (20) %11, %92, %73, %37 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD sırasıyla, %59,6, %100, %100 ve %50 olarak bulunmuştur. Modifiye KKA besiyerlerinde KKA besiyerine oranla elde edilen değerlerde çok farklılık görülmemiş, besiyerine yapılan ilavelerin duyarlılık ve özgüllüğü artırmadığı saptanmıştır. Gerek KKA gerekse modifiye KKA besiyerlerine ekim yöntemine göre her ne kadar uygulama zorluğu içerse de, bireysel olmayan, görsel koloni morfolojisinden etkilenmeyen, kantitatif sonuç vermesi açısından değerli olan mikroplak yönteminin biyofilm oluşumunu değerlendirmek açısından kullanımının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Mathur ve ark. (26) biyofilm oluşumu için kullandıkları tüp metodunda besiyerine çeşitli şeker (glukoz ve sukroz) takviyeleri eklendiğinde biyofilm pozitif izolat sayısında artış olduğunu belirtmişlerdir. Mikroplak yönteminde de %1 glukoz ve/veya %2 sukroz eklenmesinin biyofilm oluşumunu %18'den %34'e kadar artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (19,27,29). *S. epidermidis* izolatlarının biyofilm özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada en iyi sonucun daha yüksek NaCl (%4 ve %5) ve glukoz konsantrasyonlarında (%1,5 ve %2) alındığı belirtilmiştir (30). Kaiser ve ark. (15) çalışmalarında %1,5 NaCl eklenmesi sonucunda *S. epidermidis* ATCC 35984'ün boyanma yoğunluğunda artış olduğunu, %2'nin üzerindeki NaCl konsantrasyonlarının eklenmesinin ise biyofilm oluşumu üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığını göstermiştir (15). Çalışmamızda KKA besiyerinde biyofilm oluşturmayan iki izolat [*S. hominis* ve *S. epidermidis* (KDE etkenleri)] KKA besiyerine glukoz ve NaCl eklendiğinde (KKA G ve KKA GN besiyerlerinde) biyofilm oluşturmuştur. KKA'da biyofilm oluşturan iki kateter kolonizanı *S. epidermidis* izolatı ise fazla glukoz ve NaCl varlığında biyofilm oluşturmamıştır. Bir çalışmada *S. epidermidis* izolatlarının faz varyasyonuna gidebildiği ve biyofilm oluşturan bir koloninin pasajından sonra EPS üretiminin kaybına bağlı olarak biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir (31). Çalışmamızda glukoz ve NaCl içeren KKA besiyerlerinde biyofilm oluşmaması, pasajlardan sonra EPS üretiminde kayıp olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda KKA GNV besiyerinde 32 (%40) KNS'de biyofilm oluşumu gösterilmiştir, iki *S. epidermidis* (kateter kolonizanı), iki *S. hominis* (KİKDE etkeni) diğer besiyerlerinde biyofilm oluştururken KKA GNV besiyerinde ürememiştir. Bu durum KNS'lerde vankomisin MİK değerlerinin çok yüksek olmaması nedeniyle besiyerine eklenen dozdaki vankomisinde üreme olmayabileceğinin düşündürmüştür (23). Biyofilm formasyonuna eklenen vankomisinin inhibitör etkisini gösteren çalışmalar ile birlikte, subinhibitör düzeylerde biyofilm oluşumunu indüklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (15,30,32,33). Bu gözlemler, stafilocok türlerinde biyofilm oluşumunun çeşitli çevresel koşullardan ve besiyeri içeriğinden etkilendiğini göstermektedir.

Çalışmamızda KİKDE etkenlerinin mikroplakta biyofilm oluşturma oranlarının, diğer izole edilen yerlere göre daha yüksek bulunması istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda da araç ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen etkenlerin biyofilm oluşturma oranları yüksek olarak bulunmuştur (34,35). Jain ve Agarwal (34) 100 invaziv izolatın 74'ünde (%74), kolonizanların 34'ünde (%68), kommensal izolatların 16'sında (%32) biyofilm oluşumu saptamışlardır. İzolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Cafiso ve ark. (35) da kateter ilişkili enfeksiyonlardan izole ettikleri KNS'lerin KKA yöntemi ile %83 gibi yüksek bir oranda biyofilm oluşturduğunu göstermiştir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamıza kateter kolonizanı, KDE ve KİKDE etkeni tanımları net olarak belirlenmiştir ve sadece etken olarak değerlendirilen stafilocok çalışmamıza dahil edilmiştir. Dolayısıyla, stafilocok sayısının azlığı çalışmamızın kısıtlılığıdır.

Sonuç

Stafilocoklarda biyofilm oluşumunu saptamada KKA ve modifiye formlarının duyarlılıklarının düşük saptanması nedeniyle, biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için mikroplak yönteminin seçilmesi daha uygun olacaktır. Bu çalışmanın sınırlaması az sayıda KDE ve KİKDE etkeni stafilocok içermesidir. Daha çok sayıda izolat içeren, biyofilm oluşumunda rol alan genlerin moleküler yöntemler ile de araştırıldığı çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar ve Etik Kurulu'ndan onay (karar no: 03-98-13) alınmıştır.

Hasta Onayı: Sağlıklı gönüllülerden "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Bakteri İzolatlarının Toplanması: D.Ö., Konsept: D.Ö., A.T., İ.D., Dizayn: D.Ö., A.T., İ.D., Veri Toplama veya İşleme: D.Ö., A.T., İ.D., Analiz veya Yorumlama: D.Ö., A.T., İ.D., Literatür Arama: D.Ö., Yazan: D.Ö., A.T., İ.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

- Bannerman TL, Peacock SJ *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA (Eds.), Manual of clinical microbiology 9th ed. Vol. 1. ASM Press. Washington, DC.; 2007. s.390-411.
- Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 2002;43(6):1367-1378.
- Halton KA, Cook DA, Whitby M, et al. Cost effectiveness of antimicrobial catheters in the intensive care unit: Addressing uncertainty in the decision. Crit Care. 2009;13:R35.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science. 1999;284:5427-5433.
- Watnick P, Kolter R. Biyofilm city of microbes. Minireview. J Bacteriol 2000; 182:2675-2679.
- Christeen GD, Simpson WA, Bisno AL, et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 1982; 37:318-326.

7. Christeen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22:996-1006.
8. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2003;92:179-85.
9. Seo YS, Lee DY, Rayamahji N, et al. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristic of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Res Vet Sci.* 2008;85:433-438.
10. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A.* 2007;83:813-818.
11. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2018;48:1-13.
12. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18:7602.
13. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, et al. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol.* 2010;33:137-145.
14. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42:872-874
15. Kaiser TD, Pereira EM, Dos santos KR, et al. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:235-239.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:623-633.
17. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms *Microorganisms.* 2017;5:15.
18. Molnar C, Hevessy Z, Rozgonyi F, et al. Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity, and toxin production in vitro. *J Clin Pathol.* 1994;47:743-748.
19. Manandhar S, Singh A, Varma A, et al. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. *BMC Res Notes.* 2018;11:714.
20. Hassan A, Usman J, Kaleem F, et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2011;15:305-311.
21. Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6:89.
22. Zhou S, Chao X, Fei M, et al. Analysis of *S.epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: A case control study, *BMC Infections Diseases.* 2013;13:242.
23. Öcal DN, Dolapçı İ, Karahan ZC, Tekeli A. Stafilocok izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51:10-19.
24. Kitti T, Seng R, Thummeepak R, et al. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples in Northern Thailand. *J Glob Infect Dis.* 2019;11:112-117.
25. Kırmusaoglu S. *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* antibiyotik direncine sebep olan biyofilm oluşumunun belirlenmesi için kullanılan metotların kıyaslanması. *Ortadoğu Tıp Dergisi.* 2017;9:28-33.
26. Mathur T, Singhal S, Khan S, et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol.* 2006;24:25-29.
27. Kord M, Ardebili A, Jamalan M, et al. Evaluation of biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong Public Health Res Perspect.* 2018;9:160-166.
28. Manandhar S, Singh A, Varma A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm producing clinical coagulase negative staphylococci from Nepal and their antibiotic susceptibility pattern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021;20:41.
29. Terki IK, Hassaine H, Oufrid S, et al. Detection of *icaA* and *icaD* genes and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen (Algeria) *African Journal of Microbiology Research.* 2013;7:5350-5357.
30. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3357-3363.
31. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol.* 1999;32:345-356.
32. Mönzon M, Oteiza C, Leiva J, et al. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: Low performance of vancomycin in relation to others antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;44:319-324.
33. Cargill JS, Upton M. Low concentrations of vancomycin stimulates biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol.* 2009;62:1112-1116.
34. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Microbiol Methods.* 2009;76:88-92.
35. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:1081-1088.