



**HASTANELERDE SIK KULLANILAN BAZI ANTİSEPTİKLERİN
BİYOFİLM OLUŞTURAN VE OLUŞTURMAYAN *STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS* SUŞLARINA KARŞI ANTİBAKTERİYEL
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL EFFICACY OF SOME
COMMONLY USED ANTISEPTICS IN HOSPITALS AGAINST BIOFILM
FORMING AND NON-BIOFILM FORMING *STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS* STRAINS

Müjde ERYILMAZ, Suna Sibel GÜRPINAR*

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
ANKARA

ÖZET

Staphylococcus epidermidis insan vücudunun dış ortamla temas eden yüzeylerinde özellikle deride, kommensal olarak bulunan normal flora bakterisidir. Günümüzde immün sistemi baskılanmış hastalarda, hastane infeksiyonlarına en sık neden olan bakterilerden biri olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşturma özelliği, bu infeksiyonlarda başlıca patojenite faktörü olarak rol oynamaktadır. Bu çalışmada hastanelerde sık kullanılan beş antiseptik solüsyonun (%7,5 povidon iyot, %10 povidon iyot, %70 etanol-%0,5 klorheksidin diglukonat, %70 2-propanol-klorheksidin diglukonat, %70 2-propanol), biyofilm oluşturan (*S. epidermidis* ATCC 35984) ve oluşturmeyen (*S. epidermidis* ATCC 12228) *S. epidermidis* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliği, kantitatif süspansiyon testi ile 30 saniye ve bir dakikalık temas sürelerinde araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün antiseptikler her iki temas süresinde de, her iki suşa karşı yeterli antibakteriyel aktivite göstermiştir. *In vitro* yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen *S. epidermidis* suşlarının test edilen antiseptiklere karşı duyarlılığında fark bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: antiseptik; biyofilm; kantitatif süspansiyon testi; *Staphylococcus epidermidis*

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Suna Sibel Gürpınar
e-mail: ssgurpınar@ankara.edu.tr

SUMMARY

Staphylococcus epidermidis, a commensal bacterium, commonly found on the surfaces of the human body especially on skin. It is a member of human normal flora. Nowadays, *S. epidermidis* is regarded as the most frequent cause of nosocomial infections especially in immunocompromised patients. Biofilm formation is essential for its pathogenicity in these infections. The aim of this study was to investigate the antibacterial efficacy of five commonly used antiseptics (7.5% povidone-iodine, 10% povidone-iodine, 70% ethanol-0.5% chlorhexidine digluconate, 70% 2-propanol- chlorhexidine digluconate, 70% 2-propanol) against biofilm forming (*S. epidermidis* ATCC 35984) and non-biofilm forming (*S. epidermidis* ATCC 12228) *S. epidermidis* strains. Susceptibilities of the strains to antiseptics were investigated by quantitative suspension test at contact times of 30 seconds and one minute. According to the results of this *in vitro* study, there is no difference found between the antibacterial efficacies of tested antiseptics against biofilm forming and non-biofilm forming *S. epidermidis*.

Keywords: antiseptic; biofilm; quantitative suspension test; *Staphylococcus epidermidis*

GİRİŞ

Staphylococcus epidermidis, insan vücudunun dış kısmında özellikle koltuk altı, baş ve burun deliklerinde yer alan normal flora bakterisidir [1]. Geçmiş yıllarda klinik örneklerden izole edildiğinde, kontaminasyon olarak değerlendirilen *S. epidermidis*, son yıllarda hastane enfeksiyonlarına en sık yol açan etkenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. epidermidis*'in etken olduğu enfeksiyonların çoğu kateter ya da protez kalp kapakçığı, protez eklem ve diğer cerrahi implantlar gibi yabancı tıbbi malzemelerin yerleştirilmesinden sonra görülmektedir. Bulaşın kaynağı hastanın kendi cildi olabileceği gibi, hastane personeli, kontamine alet ve dezenfektanlar da enfeksiyon kaynağı olarak karşımıza çıkabilmektedir [1-3]. *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturma özelliği bu enfeksiyonlarda başlıca patojenite faktörü olarak rol oynar [4]. Ülkemizde cilt antisepsisinde sıklıkla alkol ve iyot bazlı antiseptikler kullanılmaktadır. Ancak Centers for Disease Control and Prevention bu amaçla klorheksidin bazlı preparatların kullanımını önermektedir. Mikrobiyal kolonizasyon ve sonrasında oluşabilecek sepsis riskini azaltmak amacıyla, cildin antimikrobiyal bir solüsyon ile 30 saniye boyunca dezenfekte edilmesi önerilmektedir [5-9]. Bu çalışmanın amacı, hastanelerde sık kullanılan beş antiseptik solüsyonun biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S. epidermidis* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Biyofilm oluşturan suş olarak *S. epidermidis* ATCC 35984, biyofilm oluşturmayan suş olarak *S. epidermidis* ATCC 12228 kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan antiseptikler ve aktif bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan antiseptikler

Antiseptik	Aktif bileşen
Poviiodeks Scrub	%7,5 povidon iyot
Poviiodeks	%10 povidon iyot
Steriderm	%70 etanol, %0,5 klorheksidin diglukonat
Steridin	%70 2-propanol, klorheksidin diglukonat
Derhand	%70 2-propanol

Antiseptiklerin test bakterileri üzerindeki etkisi, kantitatif süspansiyon testi kullanılarak araştırılmıştır. Kantitatif süspansiyon testi uygulanmadan önce ilk olarak kullanılan her antiseptik için nötralizanın (Dey-Engley Neutralizing Broth (DENB), Sigma-Aldrich, USA) uygunluğu test edilmiştir [10]. Dezenfektan veya antiseptiğin etkisinin doğru olarak belirlenebilmesi için nötralizan etki önemlidir. İlk olarak, 900 µl antiseptik solüsyonuna 100 µl steril distile su ilave edilip vorteksle karıştırılmıştır. Bir dakika beklendikten sonra bu karışımdan 10 µl alınarak, 990 µl DENB içine ilave edilmiştir. Birkaç dakika beklendikten sonra bu karışımın içine 10 µl bakteri süspansiyonu ilave edilip, 20 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Hazırlanan son karışımın, Ringer solüsyonu kullanılarak 10^{-5} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 100 µl alınıp, Tryptic Soy Agar (TSA) plağı üzerine ekim yapılmıştır. Plaklar 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda oluşan koloniler sayılarak, mililitrede koloni oluşturan birim (kob) olarak belirtilmiştir. Dilüe edilmemiş test süspansiyonu ilk sayım olarak kabul edilmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak steril distile su kullanılmıştır. Test petrileri ile kontrol petrileri arasında koloni büyüklüğü, büyüme oranı, kob sayıları bakımından fark olmaması, nötralizanın uygun olduğunun göstergesidir.

Uygun nötralizan belirlendikten sonra antiseptiklerin etkisi, kantitatif süspansiyon testi ile araştırılmıştır [11]. TSA plağında bulunan tek bir bakteri kolonisi, 10 ml Tryptic Soy Broth (TSB) içeren tüpün içinde 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, tüpler 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, bakteriler 10 ml TSB ile yıkanmıştır. TSB'de bulunan bakteri süspansiyonları McFarland 0,5'e göre ayarlandıktan sonra, 100 µl bakteri süspansiyonu, 900 µl dezenfektan solüsyonuna oda sıcaklığında eklenmiştir. Temas süresi olarak 30 saniye ve bir dakika beklenmiştir. Her bir temas süresi sonunda karışımdan 10 µl alınıp, 990 µl DENB içine eklenmiştir. Bu karışımın 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan 100 µl alınarak TSA plağı üzerine yayma plak tekniği ile ekim yapılmıştır. Petriler 37°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılıp, mililitrede kob olarak belirtilmiştir. Redüksiyon oranı aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplanmıştır.

$$\log_{10} \text{redüksiyon} = \log_{10} \text{predezenfektanlı sayım} - \log_{10} \text{dezenfektanlı sayım}$$

5 ve üstü log₁₀ redüksiyon değeri yeterli bakterisidal aktivite belirtisi olarak kabul edilmiştir. Dilüent ve kontrol olarak steril distile su kullanılmış ve her bir bakteri için işlem paralel olarak yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan bütün antiseptikler 30 saniye ve bir dakikalık temas sürelerinde, her iki suşa karşı yeterli bakterisidal aktivite göstermiştir (Tablo 2).

TEST BAKTERİLERİ	ANTİSEPTİKLER										
	A		B		C		D		E		
	TEMAS SÜRESİ										
	30 sn	1 dak	30 sn	1 dak	30 sn	1 dak	30 sn	1 dak	30 sn	1 dak	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2

Tablo 2. Kantitatif Süspansiyon Test Sonuçları

A: Poviodoks Scrub **B:** Poviodoks **C:** Steriderm **D:** Steridin **E:** Derhand

Koagülaz negatif stafilokok grubu bakterilerden olan *S. epidermidis* insanlarda normal flora üyesi olması nedeniyle, uzun yıllar boyunca enfeksiyon etkeni olarak görülmemiş ve kültürlerde üremesi durumunda kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir [1]. Ancak günümüzde gittikçe artan oranlarda özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olarak bildirilmesi nedeniyle önem taşımaktadır. İntravasküler kateter enfeksiyonları, kalp kapak endokarditleri, serebrospinal şant enfeksiyonları, vasküler greft enfeksiyonları, prostetik eklem enfeksiyonları, periton diyaliz kateterleri ile ilişkili peritonitler neden oldukları enfeksiyonlar arasındadır. Bu bakteriler özellikle biyomateryaller üzerine yapışıp biyofilm oluşturarak, antimikrobiallere karşı direnç gösterirler. Biyofilm, polisakkarit ve proteinden oluşan bir ekstraselüler matriks üreterek birbirlerine ve yüzeylere yapışan mikroorganizma topluluğunu ifade eder [12-14].

Biyomateryaller üzerine yapışan bu bakteriler, bol miktarda üretilen slime tabakasının içine gömülme ve böylece bir difüzyon bariyeri oluşturarak antibiyotiklerin etkisinden korunmaktadır. Slime faktör, bakterileri fagositoz ve degranülasyondan koruyarak, kemotaksisi önleyerek, nötrofil etkisini inhibe ederek ve lenfosit aktivitesini azaltarak bakterilerin virülansının artmasına neden olur. Biyofilm oluşumunun yanında nozokomiyal *S. epidermidis* izolatları metisilin gibi günümüzde sık kullanılan antibiyotiklere karşı artan oranlarda direnç göstermeleri nedeniyle de sorun oluşturmaktadır.

Bu direnç durumu, nozokomiyal bakteri toplulukları içinde direncin yayılmasına yol açabileceğinden önem taşımaktadır [2, 12].

S. epidermidis lantibiyotik üretebilmesi nedeniyle kolonizasyonda üstünlük sağlamaktadır. Lantibiyotikler daha çok Gram pozitif bakteriler üzerine etkili olan bakteriyosinlerdir [15].

Adam ve ark. [6], %70 izopropil alkol (IPA) içinde %2 klorheksidin glukonat (KHG) içeren (ChloroPrep®) antiseptik solüsyonun, *Staphylococcus epidermidis* RP62A (biyofilm oluşturan) suşuna karşı antibakteriyel etkisini, sık kullanılan beş antiseptik solüsyonla [70% (v/v) IPA, 0,5% (w/v) KHG, 2% (w/v) KHG, %70 (v/v) IPA içinde % 0,5 (w/v) KHG ve % 10 (w/v) povidon iyot (PI)] karşılaştırarak araştırmışlardır. 30 saniye temas süresinde yaptıkları kantitatif süspansiyon test sonuçlarına göre, çalışmada kullanılan bütün solüsyonların yeterli bakterisidal aktivite gösterdiğini ancak %70 IPA içinde %2 KHG içeren antiseptik solüsyonun, 0,5% (w/v) KHG, 2% (w/v) KHG ve %70 (v/v) IPA içinde % 0,5 (w/v) KHG içeren solüsyonlara kıyasla daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız %7,5 PI, %10 PI, %70 etanol (E) içinde %0,5 KHG, %70 2-propanol (2-P) içinde KHG ve %70 2-P içeren beş antiseptik solüsyonun tamamı 30 saniye ve bir dakikalık temas sürelerinde hem biyofilm oluşturan (*S. epidermidis* ATCC 35984), hem de oluşturmayan (*S. epidermidis* ATCC 12228) her iki suşa karşı yeterli bakterisidal aktivite göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, Adam ve ark. [6]'nın çalışmalarında bildirdikleri sonuçlar ile uyumludur. Her ne kadar biyofilm oluşturan ve oluşturmayan suşlar arasında duyarlılık açısından fark görünmese de, biyofilm içindeki bakterilerin dezenfektanla temasının sınırlı olacağı ve bu nedenle etkinin azalacağı mutlaka gözönünde bulundurulmalıdır [16].

Yapılan çalışmalar, alkol ile klorheksidin kombinasyonunun cilt antisepsisinde, alkol ve klorheksidini tek başına içeren preparatlara kıyasla daha iyi bir seçenek olabileceğini göstermektedir [17]. Taha ve ark. [18], çalışmalarında biyofilm oluşturan *S. epidermidis*'e karşı klorheksidin/izopropil alkol karışımının tek başına kullanımlarına kıyasla daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Klorheksidin, alkol ya da su ile hazırlanan çözeltileri, deri ve mukoz membranların antisepsisinde kullanılmaktadır. Derinin stratum korneum tabakasına bağlanarak uzun süre etkinlik göstermektedir. Bu kalıcı etkinlik enfeksiyonlardan korunmada üstünlük sağlamaktadır [19, 20].

Presterl ve ark. [21], yaptıkları çalışmada sadece alkol ve alkol-klorheksidin karışımı içeren preparatların *S. epidermidis* biyofilmlerini ortadan kaldırmada daha etkili olduğunu ancak povidon iyot içeren solüsyonun daha az etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda %7,5 ve %10 povidon iyot içeren antiseptik solüsyonların her ikisinin de kantitatif süspansiyon testi ile yeterli bakterisidal aktivite gösterdiği görülmüştür ancak biyofilm tabakası içinde bakterilerin antiseptikle temasının sınırlı olacağı düşünüldüğünde, etkinin azalacağı unutulmamalıdır. Ülkemizde cilt antisepsisinde en yaygın kullanılan ajan povidon iyottur. İyodun uçucu özelliği nedeniyle önceden açılmış iyodofor içeren çözeltilerin

antimikrobik etkilerini bekletilmekle kaybedebileceği, bu çözeltilerin kontamine olabileceği bilinmektedir [22].

Günümüzde antibiyotiklere karşı artan oranlarda direnç gelişimi bildirilirken [23], aynı durum antiseptik ve dezenfektanlara içinde söz konusudur. Antiseptik ve dezenfektanların uygun olmayan konsantrasyonlarda kullanılması, sulandırılmış solüsyonların çok uzun süre bekletilmesi ile aktif bileşenlerin etkinliğini kaybetmesi, bu maddelere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. *S. epidermidis* gibi geçmişte tıbbi açıdan sorun olarak görülmeyen mikroorganizmaların, günümüzde ciddi sorunlara yol açabilmesi nedeniyle bu bakterilerin antimikrobiyal maddelere karşı direnç gelişimi takip edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.

In vitro yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S. epidermidis* suşlarının test edilen antiseptiklere karşı duyarlılığında fark bulunmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*-the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567.
2. Yüce, K. (1998). Koagülaz negatif stafilkokların neden olduğu hastane infeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2(3), 143-146.
3. Chaieb, K., Zmantar, T., Souiden, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2011). XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*, 50, 1-5.
4. Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K.M., Peters, G., Rohde, H., Herrmann, M. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 203-212.
5. Özsoy, M.F., Öncül, O., Pahsa, A., Erdem, H., Emekdaş, G. (2001). Etil alkol, povidon iyod ve benzalkonyum klorürün *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı etkinliği. *Klimik Dergisi*, 14(1), 30-32.
6. Adams, D., Quayum, M., Worthington, T., Lambert, P., Elliott, T. (2005). Evaluation of a 2% chlorhexidine gluconate in 70% isopropyl alcohol skin disinfectant. *Journal of Hospital Infection*, 61, 287-290.
7. Anderson, M.J., Horn, M.E., Lin, Y.C., Parks, P.J., Peterson, M.L. (2010). Efficacy of concurrent application of chlorhexidine gluconate and povidone iodine against six nosocomial pathogens. *American Journal of Infection Control*, 38, 826-831.

8. Pratt, R.J., Pellowe, C.M., Wilson, J.A., Loveday, H.P., Harper, P.J., Jones, S.R. (2007). National evidence based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. *Journal of Hospital Infection*, 65(1), 1-64.
9. O'Grady, N.P., Alexander, M., Dellinger, E.P., Gerberding, J.L., Heard, S.O., Maki, D.G. (2002). Guidelines for the prevention of intravascular catheter related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*, 51 (RR-10), 1-29.
10. Griffiths, P.A., Babb, J.R., Bradley, C.R., Fraise, A.P. (1997). Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 519-526.
11. Ekizoglu, M.T., Ozalp, M., Sultan, N., Gur, D. (2003). An investigation of the bactericidal effect of certain antiseptics and disinfectants on some hospital isolates of Gram-negative bacteria. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24, 225-227.
12. Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kränzler, H., Batzilla, C., Kozitskaya, S. (2006). Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(1), 14-20.
13. Kwakman, P.H.S., te Velde, A.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., van Deventer, S.J.H., Zaat, S.A.J. (2006). Treatment and prevention of *Staphylococcus epidermidis* experimental biomaterial-associated infection by bactericidal Peptide 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 3977-3983.
14. Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O., Hallin, M. (2013). Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), 1541-1547.
15. Götz, F., Perconti, S., Popella, P., Werner, R., Schlag, M. (2014). Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 63-71.
16. Smith, K., Hunter, I.S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multidrug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 57(8), 966-973.
17. Pratt, R.J., Pellowe, C.M., Loveday, H.P., et al. (2001). The EPIC project: developing national evidence-based guidelines for preventing healthcare associated infections. *Journal of Hospital Infection*, 47, 21-37.
18. Taha, M., Kalab, M., Yi, Q.L., Landry, C., Greco-Stewart, V., Brassinga, A.K., Sifri, C.D., Ramirez-Arcos, S. (2014). Biofilm-forming skin microflora bacteria are resistant to the bactericidal action of disinfectants used during blood donation. *Transfusion*, 54(11), 2974-2982.
19. Pittet, D. (2000). Improving compliance with hand hygiene in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, 381-386.

20. Kampf, G., Jarosch, R., Ruden, H. (1998). Limited effectiveness of chlorhexidine based hand disinfectants against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Hospital Infection*, 38, 297-303.
21. Presterl, E., Suchomel, M., Eder, M., Reichmann, S., Lassnigg, A., Graninger, W., Rotter, M. (2007). Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 417–420.
22. Craven, D.E., Moody, B., Connolly, M.G., Kollisch, N.R., Stottmeier, K.D., McCabe, W.R. (1982). Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *The New England Journal of Medicine*, 305(11), 621-623.
23. World Health Organization web site. Retrieved March 20, 2017, From <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

ACCEPTED