

Parenteral nutrisyon sıvılarının koagülaz-negatif stafilokok'ların biyofilm oluşturmaları üzerine etkisi: Deneysel bir çalışma

Effect of parenteral nutrition solutions on biofilm formation of coagulase-negative Staphylococci: An experimental study

J. Sedef Göçmen¹, Ünase Büyükkoçak², Osman Çağlayan³

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) kullanılan parenteral nutrisyon (PN) solüsyonlarının koagülaz negatif stafilokok (KNS)'larda biyofilm oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Deneyde kan kültürlerinden izole edilmiş olan 39 KNS ve ATCC 12228 kodlu referans *Staphylococcus epidermidis* suşları kullanıldı. Bakteri dilüsyonları için Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri kullanıldı. Deney ortamları: 1. Glikoz, 2. Amino asit, 3. Lipit, 4. Üçlü karışım (Glikoz, Amino asit, Lipit), 5. Glikoz ve Amino asit, 6. Glikoz ve Lipit, 7. Amino asit ve Lipit, 8. Kontrol (TSB) şeklinde hazırlandı. Biyofilm oluşumu "Kantitatif mikrodilüsyon plak testi" yöntemi ile belirlendi. Yapılan değerlendirmede sınır değer üzerinde olanlar biyofilm pozitif, altında olanlar ise negatif kabul edildi. Biyofilmi pozitif olanlar da kendi aralarında hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 gruba ayrıldı. PN solüsyonu içeren 1'den 7'ye deney ortamlarında elde edilen biyofilm pozitif suş sayıları TSB ortamında elde edilenlerle ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

Bulgular: Üçlü karışım PN sıvısı ile ikili karışım PN sıvılarının (glikoz+lipit, amino asit+lipit karışımlarının) kontrol grubuna göre KNS'ların biyofilm oluşumunu artırıcı etkilerinin olduğu belirlendi. Biyofilm pozitifliği ortam 1 ve 2'de kontrole göre anlamlı düşükken, 4, 6 ve 7'de anlamlı yüksekti. Ortam 1, 2 ve 3 kendi aralarında; 4, 5, 6 ve 7 de kendi aralarında farksız sonuçlar verdiler.

Sonuç: Çalışmamızda PN yapı taşlarından olan glikoz, amino asit ve lipit çözeltilerinin tek başlarına biyofilm oluşumunu azaltıcı, bunların karışımlarının ise artırıcı etkili oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle rutinde üçlü karışım olarak verilen PN solüsyonlarının kateter enfeksiyonu riskini arttırdığını söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Kateter enfeksiyonları, biyofilm, parenteral nutrisyon

ABSTRACT

Objectives: In our study we investigated the effects of parenteral nutrition (PN) solutions on Coagulase negative staphylococci (CoNS) biofilm production.

Materials and methods: Thirty nine CoNS strains isolated from hemocultures and a reference strain (ATCC 12228 *Staphylococcus epidermidis*) were included. Bacterial dilutions were made in Tryptic Soy Broth (TSB). The experimental mediums were 1. Glucose, 2. Amino acid, 3. Lipid, 4. Glucose+ Amino acid+ lipid, 5. Glucose+ Amino acid, 6. Glucose+ Lipid, 7. Amino acid+ Lipid, and 8. Control (TSB). Biofilm formation was evaluated by "quantitative microdilution plaque test". The values greater than cut off value are considered as positive. Biofilm positivity was divided into 3 groups (mild, moderate and intensive) and all other strains under cutoff value were accepted as negative. The numbers of biofilm positive strains derived from 1-7. mediums were compared with each other, and with the results of control.

Results: The three-component PN solution and two component PN solutions containing glucose+ lipid and amino acid+ lipid were found to increase the biofilm production activity of CoNS when compared to the control group. Slime positivity in medium 1 and 2 was lower than control significantly, in medium 4, 6, and 7 slime positivity was higher considerably. The indifferent results were obtained within the mediums 1, 2, 3 and within the mediums 4, 5, 6, and 7.

Conclusions: In our study, it was found that, glucose, amino acid and lipid solutions which were building structures of PN decreased the biofilm production when used solitary. However use of the compounds increased the biofilm production. Therefore, we can conclude that PN solutions given as mixtures in routine practice increase the risk of catheter infection. *J Clin Exp Invest* 2012; 3(4): 505-509

Key words: Catheter-related infections, biofilm, parenteral nutrition

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-Ankara, Türkiye

² Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı-Kırıkkale, Türkiye

³ Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı-Kırıkkale, Türkiye

Correspondence: J. Sedef Göçmen,

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara, Türkiye, E-mail: jsedef@yahoo.com

Received: 04.10.2012, Accepted: 12.12.2012

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2012, All rights reserved

GİRİŞ

Normal şartlarda organizma yaşamsal fonksiyonları ve hücre metabolizmasını sürdürebilmesi için ihtiyaç duyduğu enerjiyi oral beslenme ile karşılar. Yoğun bakım hastalarında bu yol mümkün olamayacağından ihtiyaç ancak klinik nutrisyon uygulanmasıyla giderilebilir. Nutrisyon enteral veya parenteral yolla yapılır. Parenteral nutrisyon (PN) enteral nutrisyon uygulanamayan hastalarda seçilecek bir metottur. Bu nedenle nutrisyonda amacımız hasta için gerekli olan ve hastadan hastaya değişiklik gösteren beslenme ile ilgili gerekli maddelerin optimum düzeyde sağlanmasıdır. Glikoz parenteral beslenme solüsyonlarının primer karbonhidrat kaynağını oluşturur. Yeterli glikozu verebilmek ve volüm yükünden kaçınmak amacı ile hipertonic solüsyonlar halinde hazırlanır. Standart parenteral beslenme solüsyonlarının %25-35'i glikoz ihtiva eder. Periferik ven ile verilebilecek maksimum glikoz konsantrasyonu %10'dur. Lipitler kalori kaynağı oluşturmak ve esansiyel yağ asitlerini sağlayabilmek için kullanılırlar. %10'luk ve %20'lik yağ emulsiyonu şekilleri vardır. Parenteral beslenme ile amino asit kaynağı olarak kan ve plazma kullanmak uygun değildir. Bunlarda proteinlerin parçalanımı uzun sürer. Günümüzde daha çok endojen kullanıma hazır olan amino asitlerden faydalanılmaktadır.¹ PN metabolik gereksinimi düşük hastalarda periferik yolla uygulanabilir. Hastaların çoğunda ise santral kateter yardımı ile uygulanır. Kateterizasyon sırasında pnömotoraks, hemotoraks, şilotoraks, hidrotoraks, arter ponksiyonu, kardiyak tamponat, trombozis gelişebilir. Geç komplikasyon olarak katetere bağlı enfeksiyon ve sepsis gözlenebilir. PN'e bağlı komplikasyonların %75'i katetere bağlıdır.²

Sepsisin hastaların %3-8'inde gözlemlendiği bildirilmiştir.³ Büyük çoğunluğu kateter kaynaklıdır. PN verilme süresi ile sepsis görülme insidansı paralellik gösterir. Sepsise neden olan mikroorganizma, kateter traktı, infüzyon solüsyonu kontaminasyonu, intestinal bakteriyel translokasyon yolu ile girebilir. Hastaların %28-45'inde sepsis nedeni mikroorganizmanın kateter kaynaklı olduğu belirlenmiştir.^{2,3} Enfeksiyon ajanları en sık *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'dir.^{4,5} Elektron mikroskopu ile yapılan invitro çalışmalarla kateter yerleştirildikten sonraki ilk 30 dk içinde kateter yüzeyinin düzensiz olduğu alanlarda koagülaz negatif stafilocokların (KNS) kolonizasyonu gösterilmiştir. Bir saat içinde mikrokoloniler oluşur. 6-12 saatte, bu mikroorganizma önce tek kat halinde sonra çok katlı halde kolonize olmaya devam eder. Zamanla koloniler glikokaliks bir tabaka ile örtülerek biyofilm yapısını oluştururlar. Bu yapı

antibiyotik ve fagositer hücelere karşı koruyucu bir bariyer oluşturur.^{6,7}

Biyofilm tabaka protein, karbonhidrat içeren hücre dışı bir yapıdır ve mikroorganizmanın konak hücre ve yapay yüzeylere yapışmasından sorumludur.⁷ KNS'larda biyofilm pozitifliği ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Biyofilm pozitifliğinin %30-83 arasında değiştiği, bakteriyemili hastalardan izole edilen KNS'larda biyofilm pozitifliğinin %93'lere kadar çıktığı bildirilmiştir.^{2,8-13} Buna göre biyofilm oluşumunu artıran faktörler enfeksiyon riskini artırırken azaltanlar ise bu riski düşüreceklerdir.

Çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) santral kateter yoluyla infüzyon şeklinde uygulanan PN sıvılarının KNS'larda biyofilm oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada glikoz, amino asit ve lipit çözeltilerinden oluşan üçlü PN solüsyonunun bakterilerin biyofilm oluşturmaları üzerine olan etkisi incelendi. Kan kültürlerinden izole edilmiş olan 39 KNS ve American Type Culture Collection (ATCC) 12228 kodlu referans *Staphylococcus epidermidis* suşu bu amaçla kullanıldı. Biyofilm oluşumu Christensen tarafından tarif edilmiş olan "Kantitatif mikrodilüsyon plak testi" yöntemi ile belirlendi.¹⁴

Pasajları yapıp üretilen bakterilerin dilüsyonları için Triptik Soy Buyyon (TSB) (Oxoid; England) besiyeri kullanıldı. Bakteri ekimleri yapılarak 24 saat 37°C de inkübe edildi. Ertesi gün üreme olan besiyerlerindeki bakterilerin 1/100 dilüsyonları yapıldı. Düz tabanlı mikro plaklarda bakteri içermeyen deney ortamları (200 µl) negatif kontrol olarak kullanılırken deney kuyucuklarına 10 µl bakteri 190 µl deney ortamı kondu. Her bir bakterinin her bir deney ortamı içerisindeki karışımı için üçer kuyucuk kullanıldı.

Glikoz, amino asit ve lipitin ayrı elektrolitlerli sulu çözeltiler halinde olduğu hazır PN solüsyonu kullanıldı. PN solüsyonu genelde üçlü karışım halinde kullanıldığından bu karışım içerisindeki konsantrasyonları deney ortamı oluşturulurken referans alındı. Paket içerisinde daha yüksek olan konsantrasyonlar TSB kullanılarak deneyde kullanılan değerlere dilüe edildi. Glikoz, amino asit ve lipit çözeltileri ayrı ayrı, ikili ve üçlü karışımlar halinde test edildi. Buna göre 1. ortam glikoz (%16), 2. ortam amino asit (%4), 3. ortam lipit (%8), 4. ortam üçlü karışım (glikoz %16, amino asit %4, lipit %8), 5. ortam glikoz (%16) ve amino asit (%4), 6. ortam glikoz (%16) ve lipit (%8), 7. ortam amino asit (%4) ve lipit (%8), 8. ortam ise TSB den (kontrol) oluşmaktaydı.

Hazırlanan mikroplaklar 37°C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve steril fosfat tampon solusyonu (pH: 7,2) ile 4 kez yıkandı. Kristal viyole ile boyama işleminden sonra kuyucuklara 200 er µl distile su konarak 570 nm dalga boyunda plakların optik dansiteleri (OD) ölçüldü. Her bir karışım için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalamaları hesaplandı. Negatif kontrol kuyucuklarından (bakteri içermeyen) elde edilen OD değerlerinin 3 standart sapma üstü o deney ortamı için sınır değer (cut-off) olarak belirlendi. Deney kuyucuklarından elde edilen veriler bu sınıra göre değerlendirildi. Buna göre sınır değer üzerinde olanlar biyofilm pozitif, altında olanlar ise negatif kabul edildi. Biyofilm pozitif olanlar da kendi aralarında hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bunun için OD'si sınır değerle bunun 2 katı arasında olanlar hafif, 2-4 katı arasında olanlar orta, 4 katı üzerinde olanlar ise kuvvetli pozitif olarak sınıflandı.¹⁵

Parenteral nutrisyon solusyonu içeren 1-7. deney ortamlarında elde edilen biyofilm pozitif suş sayıları TSB ortamında elde edilenlerle ve birbirleriyle ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmalarda p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Elde edilen sonuçlar tablo 1'de verilmiştir. Buna göre PN solusyon komponentlerinin tek başlarına biyofilm gelişimini anlamlı oranda azaltırken üçlü ve glikoz+lipit, amino asit+lipit ikili karışımlarının biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etkili olduğu görülmektedir (Tablo 1). Ortam 1, 2 ve 3 kendi arasında; 4, 5, 6 ve 7 kendi arasında benzer sonuç vermiştir. Biyofilm pozitifliğinin derecesi de 1. ve 2. ortamda en düşük, 4. 7. ve 8. ortamlarda en yüksek bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Deney ortamlarındaki biyofilm pozitif /negatif bakteri sayısı (n=40)

	1. ortam (glikoz)	2. ortam (aminoasit)	3. ortam (lipit)	4. ortam (glikoz+ aminoasit+ lipit)	5. ortam (glikoz + aminoasit)	6. ortam (glikoz + lipit)	7. ortam (aminoasit + lipit)	8. ortam (TSB)
Pozitif	7	6	11	27*	24	26*	27*	16
Negatif	33*	34*	29	13	16	14	13	24
p	0,025	0,011	0,236	0,013	0,073	0,024	0,013	
Zayıf +	7	6	9	17	23	25	17	8
Orta +	0	0	2	5	1	1	2	4
Kuvvetli+	0	0	0	5	0	0	8	4

*: Kontrol grubundaki (ortam 8) karşılığına göre anlamlı yüksek olan değerler

p: Kontrol grubundaki (ortam 8) değerle karşılaştırıldığında elde edilen istatistik değeri

TARTIŞMA

Damar içi kateter modern tıbbın vazgeçilmez araçlarından biridir. Kateterler sıvı tedavileri, parenteral beslenme, yakın izlem, kan ve kan ürünlerinin uygulanması, çeşitli ilaçların infüzyonu, hemodiyaliz, kemoterapi gibi pek çok girişimsel işlemde kullanılmaktadırlar. Özellikle yoğun bakım üniteleri kateter uygulamalarının en sık yapıldığı birimlerdir. Bu kadar geniş uygulama alanı olan kateterler, enfeksiyon başta olmak üzere pek çok sorunlarında kaynağını oluşturur. Hastalarda santral venöz kateter kullanılması sırasında lokal enfeksiyon, tromboflebit, kateter ilişkili enfeksiyonlar, endokardit ve farklı organ ve dokularda enfeksiyonlar gelişebilir.

Pek çok bakteri yüzeye bağlanarak ya da yapışarak yaşamını sürdürür. Bütün bakterilerin en

az %90'ı yüzeye bağlanır. Bakterilerin bu yapışması doğal olarak salgıladıkları adesinleri sayesinde olur.¹⁶ Yoğun bakımlarda kolonize durumda olan mikroorganizmanın adezinleri sayesinde çeşitli yüzeylerde biyofilm yapabilme eğilimi, bu mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar nedeni ile tedavi başarısını gölgelemektedir.

Biyofilm oluşturan bakteriler antibiyotiklerin etkilerine farklı şekillerde direnç gösterirler. Antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonu kısıtlanır. Biyofilm içindeki bakterilerin büyüme hızları da farklıdır. Biyofilm tabaka içinde oluşan mikroçevre antibiyotikleri olumsuz etkiler.

KNS'lar (özellikle *S.epidermidis*) derinin en baskın flora bakterilerindedir. Ayrıca bu bakterinin yabancı cisimlere bağlanmasını sağlayan glikoka-

liks oluşturma yeteneğine sahip olmasından dolayı kateter ilişkili enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan etkenlerdendir.^{17,18} *S.aureus*, *E.coli* ve diğer enterik bakteriler de sık rastlanan bakteriler olarak dikkati çekmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde bu etkenler dışında daha az sıklıkta olmakla beraber özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ile gelişen dirençli enfeksiyonlar da saptanmaktadır. Ayrıca son yıllarda *Candida* spp. ve enterokok enfeksiyonlarında artış görülmektedir. Parenteral lipit solüsyonları mantarlar ve özellikle lipofilik bir etken olan *Malessezia furfur* için önemli risk faktörü oluştururlar.

Türkiyede 1998 yılından sonra yapılmış çalışmalarda hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında Gram pozitif mikroorganizmaların kateter enfeksiyonları içinde oranı %58.3- 71 iken bunlar içinde KNS' ların neden olduğu enfeksiyonların oranı %8-15.8 arasında değişmektedir.^{2,3} Çalışmalarda bu etkenin sıklığında da artış görülmektedir. Bu artışın nedeni olarak prostetik ve kalıcı cihazların kullanımının yaygınlaşması gösterilirken örneğin *S.epidermidis* bakteriyemisi olan hastaların %90'ında intravasküler kateter öyküsü olduğu saptanmıştır.¹⁹

Bir biyofilm tabakanın oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığında biyofilm oluşmaz.⁷ Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 protein, %1-2 polisakarid, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabileceği gibi birden fazla türü de yapısında bulundurabilir. Birden farklı türle oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler su kanalları aracılığı ile ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır.⁶

Biyofilm oluşumu mikroorganizma türleri arasında farklılıklar göstermekle birlikte karbonhidrat zengin glikokaliks olarak da adlandırılırlar.²⁰ Yapısı tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte biyofilmin karbonhidrat içeriğinde var olduğu gösterilen siyalik asitin biyofilmin özelliğini sağlayan en fonksiyonel molekül olduğu düşünülmektedir.²¹ Siyalik asitin hücre yüzeyindeki miktarı; hücrenin deformabilite, motilite ve adezivliği gibi özelliklerinde, dolaşan hücrelerin immun sistem tarafından tanınması ve kompleman sistemi tarafından yok edilmesi gibi im-

munolojik olaylarda belirleyicidir. Hücre yüzeyinde glukokonjugat olarak bulunan siyalik asitin, hücrenin yüzey elektrik yükünün sağlanması, bulunduğu hücredeki miktarına göre deformabilite, aderens ve motiliteyi düzenleme gibi özellikleri vardır.²² Siyalik asit çalışmalarında nörominidazın bakteri aderansına herhangi bir etkisi olmazken, biyofilm oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Nörominidazın antibiyotik solüsyonları ile birlikte uygulanmasında aynı şekilde biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Biyofilm oluşturma yeteneği mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de kazanılabilir.²³

Bunların dışında son yıllarda biyofilm oluşumunu azaltan biyofilm matriksindeki ekstrasellüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterecek ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek antimikrobial ajanlar içeren kateterler kullanılmaktadır.²⁴⁻²⁶ Bütün bu önlemlere rağmen yoğun bakımlarda katetere bağlı enfeksiyonlar önemi korumaktadır.

PN solüsyonun komponentlerinden olan glikoz, lipit ve amino asitler, bakterilerin üretilmelerinde kullandığımız besiyerlerinin de temel maddelerini oluştururlar. Bu nedenle yoğun bakım ünitelerinde kateter bağlantılı enfeksiyonlarda en sık karşımıza çıkan KNS'ların biyofilm oluşturmalarında PN sıvısının komponentlerini oluşturan glikoz, lipit ve amino asitlerden tek tek ya da ikili-üçlü karışımlarından farklı şekillerde etkilenmesi de doğaldır. Biyofilm oluşumunda protein ve polisakaritlerin de yer aldığı kompleks bir yapı söz konusudur. PN sırasında parenteral solüsyonun komponentlerinden olan amino asit ve glikoz bakterinin biyofilm oluşturmada yararlandığı protein ve karbonhidrat kaynağı olarak bakteriler tarafından biyofilm yapısında kullanılabilir. Bu maddelerin tek tek etkilerinden (ortam 2 ve 3) çok, bir arada bulduklarında biyofilm oluşumunu arttırdığını deneyimizde ortam 4, 6 ve 7'de biyofilm oluşumundaki artış bize göstermektedir. Çalışmamız sonucu elde edilen veriler bize parenteral nutrisyon sıvılarının rutinde kullanıldığı konsantrasyonda tek tek kullanıldıklarında biyofilm oluşumunu azaltırken karışım halinde kullanımın biyofilm oluşumunu arttırdığını göstermiştir. Öte yandan bu solüsyonlar karışım halinde bakteri üremesi için daha uygun bir besiyeri oluştururken tek başlarına bakterilerin üremesini daha az destekleyeceklerdir. Sonuç olarak gerek bakteri üremesine, gerekse biyofilm oluşumuna etkileri nedeniyle bu sıvıların karışım yerine ayrı ayrı verilmesini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Kreymann G, Adolph M, Druml W, Jauch K W. Intensive medicine-Guidelines on parenteral nutrition, Chapter 14. Ger Med Sci. 2009, 18(7); Doc.14.
2. Pearson LM . Guideline for prevention of intravascular device related infections. Part 1. Intravascular device-related infections; an overview. Hospital infection control practices advisory committee. Am J Infect Control 1996;24:262-77.
3. O'Grady NP, Alexander M, Burns L A, et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. CDC. 2011; 1-59 (<http://www.cdc.gov/hicpac/guidelineMethod/guidelineMethod.html>).
4. Madani N, Rosenthal VD, Dendane T. Healthcare associated infections rates, length of stay, and bacterial resistance in an intensive care unit of Morocco: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) Int Arch Med 2009; 2(29):1-7.
5. Leblebicioğlu H, Rosenthal VD, Arkan OA Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). J Hosp Infect 2007;65(3):251-7.
6. Jones HC, Roth IL, Saunders WM. III. Electron microscopic study of a slime layer. J Bacteriol 1969;99:316-25.
7. Donlan RM. Biofilm: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8:881-90.
8. Christensen G D, Barker L P, Mowhinney T P, Badour L M, Simpson W A. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun 1990; 58(9): 2906-11.
9. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 1982;37:318-26.
10. Gedik A, Ersay A, Atmaca S, Sener A. Oxybutynin effects on *Staphylococcus epidermidis* biofilm production. South Med J 2008 ,101(3);236-9.
11. Roveta S, Marchese A, Schito GC. Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic support by *Staphylococcus* spp. Int J Antimicrob Agents 2008;31(4):321-8.
12. Demirag MK, Esen S, Zivalioglu M, Leblebicioğlu H, Keceligil HT. The effect of aspirin on adherence of slime-producing, coagulase-negative staphylococci to vascular grafts. Ann Vasc Surg 2007;21(4):464-7.
13. Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. Bisno A, Waldvogel FA, editors. Infections associated with indwelling Medical devices. 2 nd ed. Washington DC: ASM Press 1994: 45-78.
14. Christensen 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.
15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. APMIS 2007;115(8):891-9.
16. Klemm P, Vejborg RM, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. Appl Microbiol Biotechnol 2010 ;88(2):451-9.
17. Hebert GA, Cooksey RC, Clark NC, Hill BC, Jarvis WR, Thornsberry C. Biotyping coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1988;26:1950-6.
18. Davenport DS, Massanari RM, Pfaller MA, Bale MJ, Streed SA, Hierholzer WJ Jr. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. J Infect Dis 1986;153:332-9.
19. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, et al. Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infections. CID, 2001;32:1249-72.
20. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-22.
21. Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA, Bakaletz LO. Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. Infect Immun 2005; 73:3210-8.
22. Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. Eur J Clin Invest 1999; 29:413-25.
23. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett 2004; 236:163-73.
24. Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, et al. In vitro and ex-vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. Antimicrob Agents 2003;47(11):3580-5.
25. Kadry A. Impact of slime dispersants and anti-adhesive on in vitro biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lenses and on antibiotic activities. J Antimicrob Chemother 2009; 63(3): 480-4.
26. Alsam S. Combination of tigecycline and n-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(4):1556-8.