



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

N-Asetil Sistein, Rifampisin ve Ozonun Panrezistan *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının
Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Etkinliği

Uzmanlık Tezi

Dr. Gülşah Tunçer

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Arif Atahan Çağatay

İSTANBUL

2019





T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

N-asetil Sistein, Rifampisin ve Ozonun Panrezistan *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının
Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Etkinliği

Uzmanlık Tezi

Dr. Gülşah Tunçer

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Arif Atahan Çağatay

İSTANBUL

2019

ÖNSÖZ

Asistanı olmaktan kıvanç duyduğum, hekimlik yaşamımda bu övüncü hep yaşayacağım, mesleğimizin ve İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji'nin duayeni, adeta koca çınarı, çok kıymetli Hocam Prof. Dr. Haluk Eraksoy'a,

Kendisiyle çalışmaktan heyecan duyduğum, bu çalışmanın her anında beni destekleyen, pırlıtlı zekası ve ilham veren tespitleriyle çalışmamıza başından sonuna değin yön ve biçim veren, karşılaştığım her güçlükte tereddüt etmeden omuz vereceğini hissettiğim çok kıymetli bilim insanı ve ağabeyim Prof. Dr. Atahan Çağatay'a,

Dürüstlük, bilim ahlakı ve hekimlik mesleğinin yüceliğine olan inancıyla, üyesi olduğum 'y kuşağı'nı kimi zaman kıyasıya eleştirse de bu eleştirilerin derininde; bizlere de sahibi olduğu bu değerleri aşılama kaygısının yattığını bildiğim saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Halit Özsüt'e,

Gücünü birikiminden alan, güven veren desteğiyle; bilginin ve doğru iletişimin güçlükleri aşmakta en geçerli araç olduğunu anlamamı sağlayan değerli Hocam Prof. Dr. Oral Öncül'e,

Bitmeyen enerjisi, çalışma disiplini, öğrenme ve öğrendiklerini aktarma çabası gibi pek meziyetini kendime örnek edindiğim, ama bunlardan çok daha önemlisi; karşılaştığım manevi güçlüklerde destek olmak bir yana hayatıma dokunduğunu hissettiğim çok sevdiğim Hocam Prof. Dr. Serap Şimşek-Yavuz'a,

Asistanlığım boyunca bilgisi ve deneyimini esirgemeksizin paylaşıp karşılaştığım güçlüklerde tereddütsüz doğru bilgiye ulaşabileceğim güvenini hissettiren, her zaman bana yol gösteren ve tez aşamasındaki zarif ilgisi ve desteği sebebiyle çok sevgili Uzm. Dr. Seniha Başaran'a,

Deneylere başladığım ilk günden beri yanımda olan, ilgisini, içtenlikli desteğini ve birikimini cömertçe bana sunan, iyimserliğiyle umutsuzluğa yer vermeyen, birlikte çalışıyor olmaktan ötürü çok şanslı hissettiğim değerli Hocam Prof. Dr. Zerrin Aktaş'a,

Daha evvel benzer yollardan geçerek, benzer güçlükleri yaşayan ve bu aşamalarda edindiği çok kıymetli deneyimlerini hiç esirgmeden benimle paylaşan ve beni yüreklendiren çok kıymetli arkadaşım Dr. Betül Sadıç-Çopur'a,

Bu çalışmamın hazırlanma sürecinde bana gösterdikleri destek ve iyi niyet için; Dr. Oğuz Evlice, Dr. Yelda Öğütmen, Dr. Çağla Keskin, Dr. Selva Ala-Selek, Dr. Gülsüm Özmen, Dr. Samra Heydarova olmak üzere huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan sevgili asistan arkadaşlarıma,

Deney hazırlıklarında yardımlarını esirgemeyen başta Mukaddes Abla olmak üzere tüm laboratuvar ekibine,

Servis hemşirelerimize, personelimize, sekreterlerimize, kısacası İstanbul Tıp Fakültesi'nin tüm çalışanlarına,

Tamamen tesadüf eseri tanıştığım, tez konusu ve yapmakta olduğum çalışmalardan bahsedince büyük bir heyecan ve ilgiyle yardımcı olarak ozon cihazını hiçbir karşılık beklemezsizin uzunca bir süre kullanımına tahsis eden, konuya ilişkin bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Dr. Ergin Ertan'a, aynı şekilde sıvı ozon ölçüm cihazını kullanımına vererek beni büyük bir kaygıdan kurtaran sayın Metin Öner'e, çalışmanın ozonlu su elde etme aşamasında sabahın kör karanlığından gece yarısına kadar benimle birlikte laboratuvarında çalışan sevgili İlknur Hemşire'ye,

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde ve Biyofizik Laboratuvarı'ndaki çalışmalarında mesai mefhumu gözetmeksizin geç vakitlere kadar bana yardımcı olan sevgili Burcu, Hasan ve Serdar'a,

Bugünlere gelmemde büyük emek ve katkıları olan, haklarını ödeyemeyeceğim sevgili anne ve babama, manevi destekleri için sevgili ağabeylerim Emrah ve Erhan'a,

Psikolojimi zorlayan bu güç süreci en az hasarla atlatmama yardımcı olan kedim Mirnav'a,

Öğrencilik yıllarımdan asistanlık yıllarıma uzanan yolda hep yanımda olan, hüüzünleri, mutlulukları ve başarıları hep birlikte yaşadığım ve yaşayacağım, desteğini ve sevgisini hep hissettiğim sevgili eşim Onur'a

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Gülşah Tunçer, 2019

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 30012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	4
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
2.1.1 Epidemiyoloji.....	2
2.1.2 Konak Risk Faktörleri.....	2
2.1.3 Klinik Özellikler.....	3
2.1.4 Coğrafi Dağılım.....	3
2.1.5 Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları.....	3
2.1.5.1 Tedavi.....	3
2.1.5.2 Direnç mekanizmaları.....	10
2.2 Biyofilm.....	21
2.2.1 Biyofilm Yapısı.....	21
2.2.1.1 Biyofilm Matriksi ve Bileşenleri.....	21
2.2.2 Biyofilm Oluşumu.....	22
2.2.2.1 Biyofilm Oluşumunda Bakteriler Arası Haberleşme.....	24
2.2.3 Biyofilm Direnci.....	25
2.2.4 Biyofilm İnfeksiyonları.....	27
2.2.4.1 Biyofilm İnfeksiyonlarının Tanısı.....	27
2.2.4.2 Biyofilm Saptama Yöntemleri.....	30
2.2.4.3 Biyofilm İnfeksiyonlarının Tedavisinde Uygun Antibiyotik Stratejileri.....	31
2.2.4.4 Antibiyofilm Stratejiler.....	32
3. MATERYAL VE METOD.....	34
3.1 Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Saklanması.....	34
3.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	34
3.2.1 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	35
3.2.2 Gradyan Testi.....	35
3.3 Bakterilerin Antibiyotik Direnci Tanımlaması.....	36
3.3.1 Karbapenem Dirençli Suşların Saptanması.....	36
3.3.1.1 Karbapenemaz Varlığının Moleküler Yöntemle Saptanması.....	36
3.3.2 Kolistine Dirençli Suşların Saptanması.....	36
3.3.3 Aminoglikozidlere Dirençli Suşların Saptanması.....	36
3.3.4 Sefalosporinlere Dirençli Suşların Saptanması.....	37
3.3.5 Florokinolonlara Dirençli Suşların Saptanması.....	37
3.4 Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi.....	37

3.4.1	İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Sınıflandırılması	38
3.4.2	Biyofilm Oluşumunun Boyama Yöntemleriyle Gösterilmesi	38
3.4.3	Hücre Kültüründe Hücre içi Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi ..	41
3.4.4	Biyofilm Tabakası Üzerine NAC, Rifampisin ve Ozonun (0.6 µg/ml) Etkinliğinin Araştırılması.....	42
3.4.5	Biyofilm Tabakası Üzerine Ozonun (4.78 µg/ml) Etkisi	42
3.4.6	Biyofilm Oluşumu ve Antimikrobiyal Ajanların Biyofilm Tabakası Üzerine Etkinliğinin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopisiyle Gösterilmesi.....	44
3.5	İstatistiksel Analiz.....	46
4.	BULGULAR.....	46
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	72
6.	KAYNAKLAR.....	85



TABLO LİSTESİ

Sayfa no.

Tablo 1. Karbapenemaz Türü ve Özelliği, Ambler ve Bush-Jacoby Medeiros Sınıflaması, KDEB’de Karbapenemaz Türüne Göre Kullanılabilecek Tedavi Seçenekleri.....	9
Tablo 2. MBL, Grup A ve D Karbapenemazlar ve Karbapenemaz Üretimi Olmadan (GSBL ya da AmpC + Porin kaybı) Görülen Direnç Mekanizmalarının Birbirinden Ayrımı.....	18
Tablo 3. Pozitif Kontrole (<i>E. coli</i> ATCC 25922) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Sınıflandırılması.....	38
Tablo 4. Negatif Kontrole (Steril TSB) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Sınıflandırılması	38
Tablo 5. <i>K. pneumoniae</i> İzolatlarına Karşı (n=9) Gradyan Testi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Antibiyotiklerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	47
Tablo 6. <i>K. pneumoniae</i> Suşlarının (n=9) PCR Yöntemiyle Belirlenen Karbapenemaz Tipleri.....	47
Tablo 7. <i>K. pneumoniae</i> Suşlarının spektrofotometreyle Optik Dansitelerinin Ölçülerek Pozitif <i>E. coli</i> ATCC 25922) ve Negatif (Steril PBS) Kontrole Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesilerinin Sınıflandırması.....	48
Tablo 8. Koloni Sayma Yöntemiyle NAC, Rifampisin ve Ozonun Bazal Biyofilm Tabakası Üzerine Etkilerinin Her İzolatın, Her Saatte (2., 6., 24. ve 72. saatler) Kendi Kontrolüne Göre Etkinliklerinin Gösterilmesi.....	54
Tablo 9. Lazer taramalı konfokal mikroskopi yöntemiyle NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm tabakası üzerine etkilerinin görüntülenerek elde edilen canlı ve ölü hücrelerin sayılarının her izolatın her saatte (2., 6. ve 24. saatler) kendi kontrolüne göre etkinliklerinin logaritmik olarak gösterilmesi.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No.

- Şekil 1.** Biyofilm oluşumunun basamakları.....23
- Şekil 2.** Koloni sayma yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....49
- Şekil 3.** Koloni sayma yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....50
- Şekil 4.** Koloni sayma yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....50
- Şekil 5.** Koloni sayma yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....51
- Şekil 6.** Koloni sayma yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....51
- Şekil 7.** Koloni sayma yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....52
- Şekil 8.** Koloni sayma yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.....52

- Şekil 9.** Koloni sayma yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi..... 53
- Şekil 10.** Koloni sayma yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi..... 53
- Şekil 11.** Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında zamana 2., 6. ve 24. saatlerde etkilerinin olarak biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi..... 58
- Şekil 12.** Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında zamana 2., 6. ve 24. saatlerde etkilerinin olarak biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi..... 59
- Şekil 13.** Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 62
- Şekil 14.** Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 63
- Şekil 15.** Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 63

Şekil 16. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun kendi NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 61

Şekil 17. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi.....64

Şekil 18. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 62

Şekil 19. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 63

Şekil 20. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 63

Şekil 21. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 64

Şekil 22. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 64

Şekil 23. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi..... 65

Şekil 24. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 66

Şekil 25. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 66

Şekil 26. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 67

Şekil 27. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 67

Şekil 28. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi..... 68

Şekil 29. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su (4.78 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve

24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi..... 69

Şekil 30. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su (4.78 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. 70

Şekil 31. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su (4.78 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. 71

RESİM LİSTESİ

Sayfa No.

Resim 1. A, B: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tigesiklin MİK değerlerinin saptanması..... 35

Resim 2. A: Biyofilm oluştuktan 24 saat sonraki biyofilmin yapısının ışık mikroskobunda Gram boyaması yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluştuktan 72 saat sonraki biyofilmin yapısının ışık mikroskobunda Gram boyaması yöntemiyle gösterilmesi..... 39

Resim 3. A: Bazal biyofilm oluşumunun (0. saat) ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluştuktan 24 sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi. 40

Resim 4. A: Biyofilm oluştuktan 48 saat sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluştuktan 72 saat sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi..... 40

Resim 5. A: Bazal biyofilm oluşumunun (0. saat) kalkoflor beyazıyla immünofloresan incelemesi, **B:** Biyofilm oluştuktan 24 saat sonraki biyofilm yapısının kalkoflor beyazıyla immünflorasan incelemesi. 41

Resim 6. A, B: Tek tabaka hücre kültürüne ekildikten sonraki 48. saatte ‘‘Hücre içi biyofilm benzeri topluluk’’ oluşturma yeteneğinin Gram boyaması yöntemiyle incelenmesi.....	41
Resim 7. Biyofilm oluşturduktan sonra rifampisin 2., 6., 24. ve 72. saattlerdeki etkilerinin saptanması için koloni sayma yöntemiyle TSA besiyerlerinde koloni sayıları; örneğin 4 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun rifampisin (0.1 µg/ml) içeren ve rifampisin içermeyen besiyerlerindeki koloni görüntüleri A-D: Rifampisin içeren besiyerleri, E-H: Rifampisin içermeyen besiyerleri.	43
Resim 8. Biyofilm oluşturduktan sonra NAC’ın 2., 6., 24. ve 72. saattlerdeki etkilerinin saptanması için koloni sayma yöntemiyle TSA besiyerlerinde koloni sayıları; örneğin 4 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun NAC (2 mg/lt) içeren ve NAC içermeyen besiyerlerindeki koloni görüntüleri A-D: NAC içeren besiyerleri, E-H: NAC içermeyen besiyerleri)	44
Resim 9. A: Ozon makinesi ve sıvı ozon analizör cihazı, B: Sonikasyon cihazı.....	45
Resim 10. A: Mikroplakta hazırlanan biyofilm oluşumunun kristal viyole boyasıyla gösterilmesi B: Mikropleyt kuyucuklarında oluşturulan biyofilmlerin kristal viyole boyasıyla boyandıktan sonra, spektrofotometreyle ölçülen optik dansite (OD) sonuçları.	48
Resim 11. A: FDA boyasıyla 7 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi. B: PI boyasıyla 7 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi.	55
Resim 12. A: FDA boyasıyla 8 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi. B: PI boyasıyla 15 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi.	56
Resim 13. A: PI boyasıyla 4 numaralı <i>K. pneumoniae</i> suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi. B: PI boyasıyla pozitif kontrol (<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853) suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi.....	56

Resim 14. A: FDA ve PI boya larıyla pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 29522) suşunun biyofilm oluşturduktan 6 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi. **B:** FDA ve PI boya larıyla 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi. .57

Resim 15. A: FDA ve PI boya larıyla pozitif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853) suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi. **B:** FDA ve PI boya larıyla 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi.....57



KISALTMALAR

- AHL: Açillenmiş homoserin lakton
- AI: Autoinducer
- AIPs: Autoinducer peptides
- BAL: Bronkoalveoler lavaj
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- cfu: Colony forming units
- DNA: Deoksiribonükleik asid
- EDTA: Etilendiamin- tetraasetik asid
- EPS: Ekstraselüler polimerik maddeler
- ETA: Endotrakeal aspirat
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FDA: Food and Drug Administration
- GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
- IDSA: Infectious Diseases Society of America
- İM: İntramüsküler
- İV: İntravenöz
- KDEB: Karbapeneme dirençli enterik bakteri
- KDKp: Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae*
- MDR: Multi-drug resistant
- MHA: Mueller-Hinton agar
- MHB: Mueller-Hinton broth
- MIO: Hareket, indol, ornitin dekarboksilaz
- MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon
- MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
- NAC: N-asetil sistein
- PBS: Fosfat tamponlu tuzlu su
- PDR: Denenen tüm antibiyotiklere dirençli bakteri (pan-drug resistant)
- PRKp: Panrezistan (pan-drug resistant) *Klebsiella pneumoniae*
- RNA: Reoksiribonükleik asid
- RpoS: RNA polimeraz sigma
- QS: Quorum sensing
- TSA: Tryptic soy agar
- TSB: Tryptic soy broth

TSI: Triple sugar iron

XDR: Extremely drug resistant

VİP: Ventilatörle ilişkili pnömoni



ÖZET

Amaç ve Giriş: Bu çalışmada giderek çözümü zor hale gelen ve hastanemizde de önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan panrezistan *Klebsiella pneumoniae* (PRKp)'nin neden olduğu infeksiyonlar ve direnç sorununa çözüm aranmaya çalışılmıştır. Yeni bir antibiyotikle şimdilik çözüm yolu olmadığı bilindiği için biyofilm tabakası hedef alınarak biyofilm tabakasına etkili olması beklenen N-asetil sistein (NAC), rifampisin ve ozon gibi antibiyofilm etkinlikli ajanların uygulanması ve etkili olmaları durumunda tedavide kullanılabilecek antibiyotiklerin etkili olabilmesi ve infeksiyonun tedavi olabilirliğini sağlaması beklenmektedir.

Gereç ve Yöntemler: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 15 Haziran 2017- 15 Temmuz 2018 tarihleri arasında yatan, >18 yaş üstü dokuz hastadan alınan örneklerde invazif infeksiyon oluşturmuş *K. pneumoniae* izolatları klasik biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlandı. Bu bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılan disk difüzyon yöntemi, gradyan testi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından belirlenen zon çapları ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri kullanıldı. Bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin gösterilmesi için mikropakta kristal viyole boyama yöntemi kullanıldı. Kuyucukların optik dansiteleri (OD) ölçülerek biyofilm oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırma yapıldı. Tek tabaka hücre kültüründe hücre içi biyofilm oluşturma yeteneği belirlendi. Biyofilm oluşumu ve NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm tabakası üzerine etkinliği koloni sayma yöntemi ve lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle gösterildi.

Bulgular: Çalışmaya dokuz hasta dahil edildi. Bu hastalardan 5 (%55.5)'i Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatmaktaydı. Hastaların dördü bakteriyemi, üçü ventilatörle ilişkili pnömoni (VIP), biri protez infeksiyonu, diğeri ise komplike idrar yolu infeksiyonu tanısıyla takip edildi. PRKp infeksiyonu gelişen hastaların altısı meropenem, tigesiklin ve kolistin; ikisi imipenem, tigesiklin ve kolistin; biri ise meropenem, ertapenem ve kolistin kombinasyonu ile tedavi edildi. Hastanede kalış süresi ortalama 50.4 (4-80) gündü. Tedavi başladıktan ortalama dokuz gün (4-21) sonra hastalardan 7 (%77.7)'si geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmasına karşın kaybedildi. Hayatta kalan hastalardan birisi komplike idrar yolu infeksiyonu tanısıyla meropenem, ertapenem ve kolistin tedavisi alan ve sondası değiştirilen hasta; diğeri ise protez infeksiyonu tanısıyla meropenem, tigesiklin ve kolistin tedavisi alan ve protezi değiştirilen hastaydı. İzolatların tüm antimikrobiyal kategorilerde tüm ajanlara dirençli oldukları gösterildi ve hepsi denenen tüm antibiyotiklere dirençli bakteri (PDR) olarak tanımlandı. Karbapeneme

dirençli olan suşların hepsinde (%100) genotipik yöntemlerle karbapenemaz geni saptandı. Tüm suşlarda saptanan karbapenemaz tipi OXA-48 idi, sadece bir suшта (12 no'lu) hem OXA-48 hem de NDM-1 geni birlikte saptandı. Biyofilm oluşumu yönünden tüm *K. pneumoniae* suşları değerlendirildiğinde biyofilm yapanların oranı %100 olarak saptandı. Pozitif ve negatif kontrole göre yapılan sınıflandırmada izolatların hepsinin (%100) yüksek düzeyde biyofilm oluşturduğu belirlendi. Koloni sayma yöntemiyle, biyofilm oluşturmuş (24 saatlik) bakterilere son konsantrasyon 2 µg/ml ve 0.1 µg/ml olacak şekilde NAC ve rifampisin uygulanarak 2. saat, 6. saat, 24. saat ve 72. saatlerdeki etkileri incelendi. Kullanılan tüm izolatlarda ortalamalarına bakılarak kendi kontrollerine göre bakteri sayısında anlamlı bir azalma saptanmadı (sırasıyla NAC için p değeri >0.05 , >0.05 , >0.05 , >0.05 ve rifampisin için p değeri >0.05 , >0.05 , >0.05 , >0.05). Son konsantrasyon 0.6 µg/ml olacak şekilde ozonlu su uygulandığında belirlenen zamandaki kendi kontrollerinin ortalamalarına göre 6. ve 24. saatte bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmekle (sırasıyla p değeri <0.05 , <0.05) birlikte logaritmik olarak $2 \log_{10}$ veya üzerinde bir azalma saptanmadığı için etkili olmadığı düşünüldü. Bununla birlikte, 2. ve 72. saatteki incelemede biyofilmdeki bakteri sayısında anlamlı bir azalma saptanmadı (sırasıyla p değeri >0.05 , >0.05). Sudaki ozon konsantrasyonu artırılarak son konsantrasyon 4.78 µg/ml olacak şekilde ozonlu su uygulandığında 2. ve 24. saatte biyofilmdeki bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmekle (sırasıyla p değeri <0.05 , <0.05) birlikte $2 \log_{10}$ üzerinde azalma saptanmadığı için etkili olmadığı düşünüldü. Bununla birlikte, aynı konsantrasyonda 6. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmedi. Ancak, 72. saatteki incelemede biyofilmdeki bakteri sayısında tüm izolatlarda 2.06-4.08 \log_{10} aralığında azalma saptandığı için etkili olarak değerlendirildi. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle, biyofilm oluşturmuş (24 saatlik) bakterilerde son konsantrasyon 2 µg/ml, 0.1 µg/ml ve 4.78 µg/ml olacak şekilde NAC, rifampisin, ozonlu su uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki biyofilm içindeki canlı ve ölü bakteriler üzerine etkileri incelendi. Tüm izolatlarda kendi kontrollerine göre bakteri sayısında 24. saatte ozonlu suda istatistiksel olarak anlamlı azalma (canlı bakteriler için p değeri 0.05 ve ölü bakteriler için p değeri 0.01) dışında canlı ve ölü bakteri sayısında anlamlı bir azalma saptanmadı. Bununla birlikte logaritmik olarak $2 \log_{10}$ veya üzerinde bir azalma gösterilmediği için ozonlu suyun koloni sayma yöntemiyle belirlendiği gibi 24. saatte de etkili olmadığı düşünüldü.

Sonuç: PRKp izolatları ülkemizde ve dünya çapında tedavi açısından sorun oluşturan önemli bir patojendir. OXA-48 ve NDM tipi karbapenemaz üreten ve özellikle Yoğun Bakım Ünitesi hastalarında kolonize olan bu bakteriler hastanemizde endemik hale geçmişlerdir. Ancak, bu

izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri hakkında bir veri yoktur. Bunun dışında, literatür taraması yapıldığında panrezistan suşlarla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. PRKp'nin biyofilm oluşturma özelliğini karakterize etmenin yanı sıra, biyofilm oluşturan bu izolatların tedavisinde kullanılacak farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle dirençli suşların tedavisinde NAC (2 mg/lt), rifampisin (0.1 mg/lt) ve ozon (0.6 mg/lt ve 4.78 mg/lt) gibi diğer ajanların belirli konsantrasyonlarda etkinliği ilk defa bu çalışmada test edilmiştir. Test sonuçlarına göre NAC ve rifampisin etkili bulunmamakla birlikte, ozon 4.78 mg/lt konsantrasyonda bile bakteri sayısında $\geq 2 \log_{10}$ 'luk azalmayı sağlamıştır. Daha yüksek ozon konsantrasyonunun kullanılması durumunda tedavi açısından başarılı sonuçların alınabileceği düşünülmektedir. Daha fazla suşla *in vitro* testlerin yapılmasının yanı sıra *in vivo* deneylerle de bu antibiyofilm etkinlikli ajanların etkinliklerinin gösterilmesi gerekmektedir. Ayrıca, bakterilerin hem biyofilm oluşturma kapasiteleri hem de panrezistan olmaları nedeniyle halihazırda kullanılacak tedavi seçeneklerinin bulunmaması, bu infeksiyonların gelişimini önlemenin yani hastane kontrol önlemlerinin önemini iyice vurgulamaktadır.

Anahtar kelimeler: Panrezistan *Klebsiella pneumoniae*, biyofilm, N-asetil sistein, rifampisin, ozon.

ABSTRACT

Aim and Introduction: In the present study, we searched for a solution for the infections of panresistant *Klebsiella pneumoniae* (PRKp) and the resistance which is difficult to handle and as a significant nosocomial infection factor in our hospital. We expect to administer the antibiofilm effective agents such as N-acetyl cysteine (NAC), rifampicin, and ozone by targeting the biofilm layer, and if they are found effective, to provide the effective antibiotics to be used in treatment, and to enable the cure of infection because no solution is yet known to be available with a new antibiotic.

Material and Methods: *K. pneumoniae* isolates which created invasive infections in the samples collected from nine patients aged over 18 years who were hospitalized in Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Hospital between 15 June 2017- 15 July 2018 were identified using the classical biochemical methods. The zone diameters and minimum inhibitory concentration (MIC) values determined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) were used for disk diffusion method, gradient test, and broth microdilution methods in determining the sensitivity of these bacteria to antibiotics. The crystal violet staining method was used in demonstrating the biofilm forming capacity of the bacteria. The classification was performed in accordance with the biofilm forming capacities by measuring the optic density (OD) of the wells. Intracellular biofilm forming capability was identified in the single layer cell culture. Biofilm formation and the efficacy of NAC, rifampicin, and ozone on biofilm layer was demonstrated using the colony counting method, and laser screened confocal microscopy method.

Results: Nine patients were included in the study. 5 (55.5%) patients were hospitalized in the Intensive Care Unit. Four patients were followed up with the diagnosis of bacteremia, three were diagnosed with ventilator-associated pneumonia (VAP), one patient had prosthetic infection, and the other one patient was diagnosed with complicated urinary tract infection. Six patients who developed PRKp infection were treated with meropenem, tigecycline, and colistin; two patients were administered imipenem, tigecycline, and colistin; and one patient was administered meropenem, ertapenem, and colistin combination. The mean hospital stay time was 50.4 (4-80 days) days. Although broad spectrum antibiotics were used, 7 (77.7%) patients died in a mean of 9 (4-21 days) days after the initiation of treatment. One of the surviving patients was received meropenem, ertapenem, and colistin treatment and whose catheter was replaced with the new one, the other surviving patient was administered meropenem,

tigecycline, and colistin due to prosthetic infection, and the prosthesis was replaced with the new one. The isolates were shown to be resistant against all agents in all antimicrobial categories, and all were described as pan-drug resistant (PDR). Carbapenemase gene was detected in all (100%) strains resistant to carbapenem with the genotypic methods. The detected carbapenemase type was OXA-48 in all strains, and both OXA-48, and NDM-1 gene were detected in only one strain (no. 12). All (100%) the *K. pneumoniae* strains were detected to form biofilms. All (100%) isolates were found to form biofilms in high levels according to the classification in terms of the positive and negative control. NAC and rifampicin were administered to create a final concentration of 2 µg/mL, and 0.1 µg/mL to biofilm formed (24 hours) bacteria, and their effects at hour 2, hour 6, hour 24, and hour 72 were investigated using the colony counting method. No significant decrease was detected in the number of bacteria in all isolates compared with their controls (p value >0.05 , >0.05 , >0.05 , >0.05 for NAC, and p value >0.05 , >0.05 , >0.05 , >0.05 for rifampicin, respectively). Although there was a statistically significant decrease in the bacteria count at hour 6, and hour 24 compared with its control in the indicated time when ozone water was applied as to provide a final concentration of 0.6 µg/mL (p value 0.05, 0.05, respectively), it was considered ineffective because no decrease was detected logarithmically as $2 \log_{10}$ or over $2 \log_{10}$. In addition, no significant decrease was detected in the number of bacteria in the biofilm in the investigation at hour 2 and hour 72 (p value >0.05 and >0.05 , respectively). Although there was a statistically significant decrease in the bacterial count at hour 2, and hour 24 compared with its control in the indicated time when ozone water was applied as to provide a final concentration of 4.78 µg/mL (p value <0.05 , <0.05 , respectively) by increasing the ozone amount in water, it was considered ineffective because no decrease was detected logarithmically as $2 \log_{10}$ or over $2 \log_{10}$. In addition, no statistically significant decrease was detected in the same concentration at hour 6. However, it was considered effective in detection of a decrease of 2.06-4.08 \log_{10} interval in the bacterial count in the biofilm at hour 72 in all isolates. The effects of NAC, rifampicin, and ozone water on the living and death bacteria in the biofilm at hours 2, 6, and 24 were investigated as to provide the final concentration of 2 µg/mL, 0.1 µg/mL, and 4.78 µg/mL in the biofilm forming (24 hours) bacteria using the laser screening confocal microscopy method. No significant decrease was detected in the living and death bacterial count in all isolates compared with their controls except the statistically significant decrease in the ozone water at hour 24 (p value for living bacteria was 0.05, and p value for death bacteria was 0.01). Ozone water was regarded ineffective at hour 24 as no decrease was determined logarithmically at $2 \log_{10}$ or over $2 \log_{10}$.

Conclusion: Panresistant *K. pneumoniae* isolates are important pathogens that cause therapeutic problems in Turkey and worldwide. These bacteria that produce OXA-48 and NDM-1 type carbapenemase and are particularly colonised in the intensive care unit patients became endemic in our hospital. However, there is no data on the biofilm forming capabilities of these isolates. In addition, there is no study on the panresistant strains in the literature. There is need for different approaches to be used in the treatment of these isolates that form biofilms in addition to characterising the PRKp biofilm forming characteristics. The efficacy of the different concentrations of other agents such as NAC (2 mg/L), rifampicin (0.1 mg/L) and ozone (0.6 mg/L ve 4.78 mg/L) in treatment of such resistant strains was first tested in the present study. In accordance with the test results; NAC and rifampicin were found ineffective, however, ozone in a concentration of 4.78 mg/L enabled a decrease of $\geq 2 \log_{10}$ in the number of bacteria. We suggest that more succesful results may be obtained in treatment with the use of higher ozone concentrations. There is a need for demonstrating the efficacy of these antibiofilm efficient agents with *in vivo* experiments with more strains and *in vitro test*. In addition, due to the lack of current treatment options owing to the biofilm forming capacities of bacteria and their being panresistant, emphasizes the prevention of the development of these infections and thus to the importance of the hospital control precautions.

Key words: Panresistant *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, N-acetyl cysteine, rifampicin, ozone.

1. GİRİŞ

Hastanelerimizde gelişen infeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite nedenleri olarak gündemimizde bulunmaktadır. Bu infeksiyonlar ve etkenleri giderek daha da zor tedavi edilir hale gelmektedir. Bunun sonucunda hastalar uzun süre hastanede yatmak zorunda kalmakta, hastaların önemli bir kısmı hayatını kaybetmekte ve ayrıca yatış maliyetleri de artmaktadır.

Bu çalışmada giderek çözümü zor hale gelen ve hastanemizde de önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan panrezistan *Klebsiella pneumoniae* (PRKp) bakterisinin geliştirdiği infeksiyonlar ve direnç sorununa çözüm aramaya çalışılacaktır. Direnç mekanizmalarından biri olarak biyofilm oluşumu sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm infeksiyonları antibiyotik direncine neden olarak tedavi sürelerini uzatmakta, tedavi olasılığını azaltmakta ve mortaliteyi artırmaktadır (1). Yeni bir antibiyotikle şimdilik çözüm yolu olmadığı ve yakın gelecekte de olmayacağı bilinmekte olduğundan biyofilm tabakası hedef alınarak ve biyofilm üzerinde etkili olması durumunda tedavide elimizde bulunan antimikrobiklerin etkinliğinden yararlanma ve hastalarımızı tedavi etme şansımızı artıracığımızı düşünmekteyiz. Biyofilm tabakasına etkili olması beklenen N-asetil sistein (NAC), rifampisin ve ozon gibi antibiyofilm etkinlikli ajanların uygulanmasından sonra tedavide kullanılacak antibiyotiklerin etkili olabilmesi, infeksiyonun tedavi olabilirliğini sağlaması, tedavi imkânı sunması ve sonucunda da morbidite ve mortaliteyle ilgili komplikasyonların azalması beklenmektedir.

Bu tezde, birinci aşama için farklı hastalarda invazif infeksiyon oluşturmuş dokuz PRKp izolatı ayrılmıştır. Bu hastaların klinik bilgileri, demografik özellikleri kaydedilmişti ve izole edilmiş olan etkenler üzerinde antimikrobiklerin “minimum inhibitör konsantrasyon” (MİK)’ları, biyofilm oluşturma özellikleri, NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm üzerine etkinliğini gösteren mikrobiyolojik incelemelerin yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella cinsi 1900’lerin sonlarında yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs’in anısına isimlendirilmiştir. Carl Friedlander’in sıklıkla ölümcül bir pnömoni etkeni olan bu Gram-negatif çomaklı tanımlanmış olması nedeniyle de uzun yıllar “Friedlander basili” olarak

adlandırılmıştır. *Klebsiella* cinsi; *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* ve *K. alba* olmak üzere altı türü içermektedir.

Katı besiyerlerinde mukoid yapıda geniş koloniler görüldüğünde genellikle *Klebsiella* cinsi bir bakterinin üremiş olduğu düşünülmektedir. Bu kökenler, MacConkey agarında tipik olarak geniş ve mukoid, aynı zamanda laktoz fermentasyonunu gösteren şekilde pembe-mor renkte koloniler oluştururlar. Birçok *Klebsiella* türü hareketsiz olmakla beraber, üreyi yavaş hidrolize ederek Christensen'in üreli agarında açık pembe renk oluşumuna neden olurlar. Triptofandan indol oluşturma özelliği, iki önemli tür olan *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'nın birbirinden ayırt edilmesinde önemli bir özelliktir.

Patojen *Klebsiella* türlerinden en sık görüleni ve klinik önemi olan *K. pneumoniae*, doğada yaygın olarak bulunur. İnsan gastrointestinal sisteminin normal flora üyesidir. Bu bakterilerin infeksiyonları genellikle hastane kaynaklı olup, bağışıklığı baskılanmış konakta görülür.

2.1.1 Epidemiyoloji

İnsan başlıca rezervuardır. Toplumda normal kişilerin dışkılarında %5-38 oranında, nazofarinkslerinde ise %1-6 oranında *K. pneumoniae* kolonizasyonu görülebilir. Çinli olmak gastrointestinal kolonizasyon için önemli bir risk faktörü olabilir (2). Hastanede yatan hastalarda kolonizasyon belirgin şekilde artmakta olup, bu artış nazofarinkste %20 oranına kadar çıkar. Kolonizasyon oranının yüksek olması başlıca antibiyotik kullanımıyla ilişkilidir. *K. pneumoniae* infeksiyonlarının görülmesi mevsimsel farklılık gösterir; sıcak aylarda daha sık görülür.

2.1.2 Konak Risk Faktörleri

İnfeksiyonlar, diabetes mellitus, alkol kullanımı, malignite, karaciğer ve böbrek yetmezliği, steroid kullanımı gibi bağışıklığı baskılayan hallerin varlığında daha sık görülür. *Klebsiella* türleri tüm nozokomiyal bakteriyel infeksiyonlarının %3-8'inde etkindir. Öncesinde antibiyotik kullanımı olması ve idrar sondası, endotrakeal tüp, intravenöz (İV) kateter gibi invazif gereçler majör risk faktörleridir (3).

2.1.3 Klinik Özellikler

En sık üriner sistem infeksiyonu, pnömoni, primer bakteriyemi tablosuna yol açmakla birlikte tromboflebit, kolesistit, diyare, üst solunum yolu infeksiyonu, yara yeri infeksiyonu, osteomyelit, menenjit ve sepsis gibi tablolara da neden olabilir.

K. pneumoniae, kan dolaşımı infeksiyonlarında önemli bir etkidir. Kan kültürlerinden yüksek oranlarda izole edilmekte ve bu izolatların büyük kısmının karbapenemlere dirençli olduğu sıklıkla gözlenmektedir. Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* (KDKp) izolatlarının genellikle klinik olarak önemli antibiyotiklere karşı da oldukça geniş bir yelpazede dirençli olduğu tespit edilmektedir. Dahası, bu izolatlar sıklıkla OXA-48 karbapenemazı taşımaktadır (4,5). NDM-1 taşıyan *K. pneumoniae* izolatlarının kan dolaşımı infeksiyonlarıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (6).

1997-1999 yılları arasında *K. pneumoniae*'ye bağlı kan dolaşımı infeksiyonu tablosuyla hastanede yatan 158 hastada Tayvan'da yapılan prospektif bir çalışmada, diyabeti olan hastalarda toplum kaynaklı infeksiyonlar daha sık görülürken (%49'a %13); malignitesi olanlarda nozokomiyal infeksiyonlar daha sık (%53'e %14) görülmüştür (7).

2.1.4 Coğrafi Dağılım

Nozokomiyal *K. pneumoniae* infeksiyonları dünya genelinde görülmesine karşın, toplum kaynaklı infeksiyonlarının bir kısmı sadece bazı bölgelerde görülür. Tayvan, Güney Afrika, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Belçika, Türkiye ve Arjantin'in katıldığı *K. pneumoniae* bakteriyemisinin kaynağındaki bölgesel farklılıkları değerlendiren bir çalışmada, toplum kaynaklı pnömoni sadece Tayvan ve Güney Afrika'da görülürken; toplum kaynaklı primer karaciğer apsesi, menenjit ya da endoftalmi sadece Tayvan'da görülmüştür (8). Bununla birlikte, *K. pneumoniae*'nin etken olduğu sporadik primer karaciğer apse olguları artık dünya genelinde bildirilmektedir. Coğrafi dağılıma göre *K. pneumoniae* izolatlarının virülans özellikleri de değişmektedir. Tayvan ve Güney Afrika'da bulunan suşlar, diğer ülkelerde bulunan suşlarla karşılaştırıldığında daha mukoid fenotiptedirler (%100'e %2) ve daha sık rmpA-pozitifliği gösterirler (%86'ya %7) ve K1 kapsüler serotipinde yer alırlar (9,10).

2.1.5 Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

2.1.5.1 Tedavi

Enterobacteriaceae üyelerinin neden olduğu infeksiyonların tedavisi, infeksiyonun görüldüğü bölgeye göre belirlenir. *K. pneumoniae* söz konusu olduğunda, özellikle çoklu ilaca dirençli kökenlerin neden olduğu epidemik hastane infeksiyonlarından korkulmaktadır. 1970'li

yıllarda sorun aminoglikozide dirençli *Klebsiella* kökenleriyken, 1982'den itibaren üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı da dirence neden olan genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten kökenler ortaya çıkmıştır. GSBL'ler genellikle plazmid kaynaklı olmakla beraber, bu plazmidlerin kolay geçiş gösterebiliyor olması, direncin hızlı yayılımı açısından önem arz etmektedir. Son yıllarda ise, *Enterobacteriaceae* üyelerinde, özellikle de *K. pneumoniae* kökenlerinde, hızla yayılmakta olan karbapenem direnci günümüzün en büyük sağlık sorunlarından birisi haline gelmiştir (11,12).

Karbapeneme dirençli kökenlerin çoğunlukla birçok antibiyotiğe de dirençli olması, tedavide ciddi sorunları da beraberinde getirmiştir. Geline aşamada, bu kökenlerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardan birisi de eski antibiyotiklerin yeniden kullanılması olmuştur (13,14). Uzun süredir çeşitli nedenlerle yaygın olarak kullanılmayan antibiyotiklerin, direncin göreceli olarak az olması nedeniyle, yeniden kullanılması fikri kapsamında en önemli yeri edinmiş olan antibiyotik ise kolistin olmuştur. Kolistin, bir süredir başta KDKp olmak üzere, dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kolistine karşı direncin artışı, özellikle de 2016 yılında direnç gelişimine neden olan bir plazmidin Çin'de ortaya çıkışından sonra, yakın bir gelecekte bu seçeneğin de tükenebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, *K. pneumoniae* ve diğer karbapenem taşıyan patojenlerde kolistin, polimiksin B, aminoglikozidler ve tigesiklin gibi genellikle son seçenek antibiyotiklerin kullanılması gerekebilmektedir.

Karbapenem kombinasyonları, seftazidim/avibaktam, meropenem/vaborbaktam gibi yeni kombinasyonlar da çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı son yıllarda giderek popüler hale gelmektedir (15,16). Tüm antibiyotiklere ("pan-drug", PDR) dirençli Gram-negatif bakterilerin giderek artması, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu bağlamda, Amerika İnfeksiyon Hastalıkları Derneği (IDSA) 2010 yılından 2020 yılına kadar Gram-negatif bakterilere karşı etkili 10 yeni antibiyotik geliştirilmesi için küresel bir girişim başlatmıştır (17). Kolistin, fosfomisin, temosilin, rifampisin, tigesiklin gibi dirençli mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılan eski, ancak önemi her geçen gün giderek artan antibiyotiklerle birlikte seftazidim-avibaktam, seftolozan-tazobaktam, imipenem-relebaktam, meropenem-vaborbaktam, aztreonam-avibaktam gibi β -laktam- β -laktamaz inhibitörleri ve henüz araştırma aşamasında olan plazomisin, yeni kinolonlar (avarofloksasin, nemonoksasin) yeni tetrasiklinler (omadasiklin), sefidekorol gibi geniş spektrumlu sefalosporinler ve monosiklik β -laktamlar geliştirilmektedir.

Kolistin: Polimiksinler, *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından non-ribozomal olarak üretilen polipeptid yapıda ürünlerdir. Kimyasal olarak beş farklı bileşikten (polimiksin A-E) oluşmakla beraber, klinikte sadece polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır (18,19). 1947 yılında keşfedilen polimiksinler, 1960'lı yılların erken dönemlerine kadar ciddi Gram-negatif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktayken, 1980'li yılların başında nefrotoksik etkilerinin daha iyi anlaşılması nedeniyle, daha çok rezerv konumunda tutulmaya başlanmış ve kullanılmaları halinde de topikal ya da oral formları tercih edilmiştir. Bununla birlikte, son yıllarda Gram-negatif bakterilerde artmakta olan antibiyotik direnci ve tedavide yaşanan sorunlar polimiksinlerin kullanımını tekrar gündeme getirmiştir. Kolistinin, kolistimetat sodyum ve kolistin sülfat olarak iki farklı ticari formu mevcuttur (18). Bunlardan kolistimetat sodyum görece daha az etkili olmasına karşın yan etkileri daha azdır; İV, intramüsküler (İM) ve inhaler gibi formları vardır. Kolistin sülfat ise barsak dekontaminasyonu amacıyla oral yolla kullanılabilirdiği gibi, deri infeksiyonlarının tedavisinde topikal olarak da kullanılabilir (14). Kolistinin hedefi bakteri hücre membranıdır. Katyonik bir polipeptid olan kolistin, Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan anyonik lipopolisakaridlere bağlanmakta ve onları stabil halde tutan divalent katyonları (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) lipid yapıdan ayırmak suretiyle dış membranda permeabilite artışına neden olmaktadır. Bu permeabilite artışı ise hücre içeriğinin dışarıya sızması ve nihayetinde hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (14). Konsantrasyona bağımlı bakterisid etkinliğe sahiptir (20,21). Kolistin; *Acinetobacter* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri, *Escherichia coli*, *Shigella* türleri, *Salmonella* türleri, *Citrobacter* türleri, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Bordetella pertussis*'e karşı en üst düzeyde bakterisid etkinlik göstermektedir. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın neden olduğu infeksiyonlarda da genellikle etkili olmakla birlikte, duyarlılığının değişken olabileceği unutulmamalıdır. Bununla beraber, kolistinin bazı mikobakteriler (*Mycobacterium intracellulare*, *M. tuberculosis*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. phlei* ve *M. smegmatis*) üzerinde de etkili olabileceği gösterilmiştir. Başta Gram-pozitif ve anaerob bakteriler olmak üzere bazı bakterilerde ise (*Burkholderia cepacia*, *B. pseudomallei*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* türleri, *Morganella morgani*, *Neisseria* türleri, *Brucella* türleri ve *Moraxella catarrhalis*) kolistine doğal direnç görülmektedir.

Fosfomisin: 1969'da İspanya'da keşfedilen, *Streptomyces* türlerinden üretilen fosfonik antibiyotik sınıftan bir bileşiktir (22). Fosfoenolpiruvat transferaz enzimini etkisiz hale getirerek hücre duvarı biyosentezini inhibe eder (23,24). Birçok ülkede, *E. coli* ve *Enterococcus faecalis*'in neden olduğu üriner sistem infeksiyonunun tedavisinde oral fosfomisin trometamin

kullanılır (25). İlaç glomerüler filtrasyon yoluyla vücuttan atılır. Düşük moleküler ağırlığa sahip olması nedeniyle dokulara iyi penetrasyon gösterir. Dolayısıyla dokularda istenilen yüksek konsantrasyonlar elde edilebilir (24,26). Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere etki eden geniş spektrumlu ve bakterisid etkili bir antibiyotiktir (22,24). Hem GSBL üreten hem de karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* (KDEB)'ye karşı iyi aktivite göstermiştir (27,28). Etkisiz olduğu bakteriler (intrinsik direnç) *Staphylococcus capitis*, *S. saprophyticus*, *Acinetobacter* türleri, *B. cepacia* ve *Bacteroides* türleridir (27). Tek başına kullanıldığında fosfomisine direnç geliştiği hem *in vitro* hem de *in vivo* gösterilmiştir. Bu direncin taşıma sistemindeki kromozomal mutasyona ya da enzimatik modifikasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir (24). Ciddi infeksiyonu olan hastalarda başka bir ajanla kombine olarak kullanımı uygundur. İlacın istenmeyen etkileri çok az olup bu istenmeyen etkilerden en sık görüleni hipokalemidir.

Temosilin: 1980'lerde İngiltere'de keşfedilen ve tikarsilinden elde edilen bir bileşiktir. Glomerüler filtrasyon yoluyla vücuttan atılır (29). GSBL ve AmpC üreten *Enterobacteriaceae*'ye karşı etkilidir. Bununla birlikte, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* türleri ve anaerob bakterilere etkili değildir (30). OXA-48, IMP, NDM ve VIM enzimlerine sahip olan mikroorganizmalar temosiline duyarlılık göstermezler (31). İlacın etkinliğinin değerlendirilmesi için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Günümüzde, temosilin karbapenemlere alternatif olarak GSBL ve AmpC üreten *Enterobacteriaceae*'nin etken olduğu üriner sistem infeksiyonu, sepsis ve solunum yolu infeksiyonlarının tedavisinde İngiltere ve Belçika'da lisanslı olarak kullanılmaktadır (32).

Rifampisin: En eski antibiyotiklerden biridir. Günümüzde ilaç direncinin giderek artması, rifampisinin kolistin, meropenem ve doripenemle kombinasyonunu gündeme getirmiştir. Yapılan kombinasyonların MDR *Pseudomonas* türleri, *Acinetobacter* türleri ve KDEB'e karşı sinerjistik etkileri olduğu gösterilmiştir (33-35). Bununla birlikte, etkinliğinin değerlendirilebilmesi için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır (36).

Tigesiklin: Minosiklin türevi bakteriyostatik bir ilaçtır. İntraabdominal infeksiyonlar, deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve toplum kökenli pnömonide Food and Drug Administration (FDA) onayı vardır. Safra yoluyla vücuttan atılır. En yaygın istenmeyen etkileri; bulantı, kusma ve ishaldir. Tigesiklin, GSBL üreten *Enterobacteriaceae*, KDKp ve *A. baumannii*'ye (hem MDR hem de yaygın antibiyotik dirençli “extremely drug resistant”, XDR) karşı etkiliyken, *Proteus* ve *Pseudomonas* türleri tigesikline doğal dirençlidir (37-39). Çok

geniş bir dağılım hacmine sahiptir. Safra, safra kesesi, kolon ve nötrofillerde iyi konsantrasyon olurken; kan ve idrar yollarına geçişi kötüdür (40). Bu nedenle bazı çalışmalarda, kan dolaşımı enfeksiyonu ve pnömoni gibi düşük konsantrasyon elde edilen bölgelerin enfeksiyonunda tigesiklinli rejim tercih edilmesi, yüksek mortalite oranlarıyla ilişkili bulunmuştur (41,42). Kolistin, meropenem veya aminoglikozidle birlikte verildiğinde XDR-KDKp enfeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tigesiklinin monoterapi şeklinde uygulanması ve KDKp'nin endemik olduğu bölgelerde aşırı kullanımı tigesikline direncin artmasına sebep olmuştur (43,44).

Çift karbapenem tedavisi: KPC üreten *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında kolistine direnç varsa ya da kolistinin nefrotoksik etkisinden kaçınılmak isteniyorsa kolistin ve çift karbapenem (ertapenem/meropenem) tedavisinin birlikte kullanılmasının mortaliteyi azalttığı olgu serilerinde gösterilmiştir (33,45). Bununla birlikte, çift karbapenem rejiminin etkinliğinin değerlendirilmesi için daha fazla sayıda hastada, daha fazla sayıda klinik değerlendirme yapılması gerekmektedir.

Seftazidim-avibaktam: 2015 yılında FDA onayı almış, bir sefalosporin ve β -laktam olmayan β -laktamaz inhibitörü kombinasyonudur. Avibaktam, β -laktamazı inaktive eder. Seftazidime avibaktam ilavesi, seftazidimin *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkinliğini artırırken, *Acinetobacter* türleri, Gram-negatif anaerob çomaklara karşı etkinliğini değiştirmez. Bunun yanı sıra, seftazidimi TEM, SHV, CTX-M, KPC, AmpC ve OXA üreten bakterilerden korur. Komplike intraabdominal ve üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılır. Seftazidim-avibaktam, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *K. oxytoca* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkilidir (46,47). 2.5 gr'lık bu kombinasyon (seftazidim 2 gr/avibaktam 0.5 gr), 8 saatte bir ve 2 saatlik infüzyon şeklinde İV olarak uygulanır. Glomerüler filtrasyon yoluyla vücuttan atılması sebebiyle böbrek yetmezliğinde doz ayarı gereklidir. En sık görülen istenmeyen etkileri; bulantı, kusma ve kabızlıktır. Bununla birlikte, etkinliğinin değerlendirilmesi için başkaca klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Seftolozan-tazobaktam: Sefalosporin ve β -laktamaz inhibitörü kombinasyonudur. Seftolozan, "5. kuşak" yeni bir sefalosporindir. Seftazidime benzer yapısı vardır ve anti-*Pseudomonas* etkilidir. Tazobaktam, β -laktamaz inhibitörüdür. Seftolozana tazobaktam ilavesi, ESBL ve TEM, SHV, CTX-M, OXA gibi β -laktamaz oluşturan *Enterobacteriaceae*'ye etkinliğini artırır. Bu kombinasyon, KPC ve metallo- β -laktamaz (MBL) gibi serin grubu karbapenemazlara etkili değildir. Komplike intraabdominal enfeksiyonlarda metronidazolle

birlikte kullanılır. *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus* türleri, *Bacteroides fragilis* gibi Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmalara etkilidir. *Acinetobacter* türlerine karşı minimal etkinliği vardır. 979 hastanın katıldığı, çok merkezli, çift kör çalışmada, komplike intraabdominal infeksiyonlarda kullanılan seftolozan-tazobaktam ve metronidazol kombinasyonu meropenem tedavisinin klinik iyileşme ve bakteriyel eradikasyon üzerine etkinliği sırasıyla %83 ve %87.3 olarak bulunmuştur (48). 1068 hastanın katıldığı komplike üriner sistem infeksiyonu nedeniyle hastanede yatan hastaların seftolozan-tazobaktam ve levofloksasinin karşılaştırıldığı çok merkezli, randemize kontrollü çalışmada klinik semptomlar ve bakteriyolojik eradikasyonun seftolozan-tazobaktam kombinasyonunu kullanan hastalarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (49).

KDEB infeksiyonlarında tedavi seçilirken antibiyotik duyarlılıkları gözönünde bulundurulmalıdır. Enzim türüne, KDEB'nin kolistine duyarlı olup olmamasına, infeksiyonun ciddiyetine göre tedavi şekillendirilir. KDKp tedavisinde, üç stratejiden biri tercih edilebilir (50). İlk strateji; birinci basamak bir antibiyotiği (meropenem, kinolon, aminoglikozid) direncin üstesinden gelmek için daha yüksek dozlarda vermektir. İkinci strateji; direncin henüz gelişmediği ikinci basamak (kolistin, tigesiklin, gentamisin, fosfomisin) bir antibiyotik kullanmaktır. Ne yazık ki, birçok ikinci basamak ilaç birinci basamak ilaçlarla karşılaştırıldığında daha toksiktir. Bunun yanında, KDKp'nin infekte ettiği anatomik bölgelerde aktivitesini sınırlayan önemli farmakokinetik eksikliklerine de sahiptir. Üstelik, ikinci basamak antibiyotiklerin tümü monoterapi olarak kullanıldığında, tedavi sırasında KDKp hızla direnç geliştirmeye eğilimlidir (51). Son strateji ise, birinci ve ikinci basamak antibiyotikleri, antibiyotikler arasındaki sinerjistik etkileşimlerin aşırı yüksek antibiyotik dozlarına olan ihtiyacı ve direnç gelişimini azaltacağı umuduyla birlikte vermektir (50). Bu sınırlı seçenekler göz önüne alındığında, birçok klinisyenin neden KDKp için tercih edilen tedavi stratejisi olarak kombinasyon seçeneğini kullandığı açıktır. Kaldı ki çok sayıda çalışma, kombinasyon rejimlerinde de antibiyotiklerin yüksek dozda verilmesi gerektiğini göstermiştir (52). Ciddi infeksiyonların tedavisinde en az iki antibiyotikle kombinasyon tedavisi önerilir. Direnç söz konusu değilse kolistin kombinasyon tedavisinin temel taşıdır (53,54).

Tablo 1. Karbapenemaz Türü ve Özelliği, Ambler ve Bush-Jacoby Medeiros Sınıflaması, KDEB’de Karbapenemaz Türüne Göre Kullanılabilecek Tedavi Seçenekleri

Kategori	Karbapenemaz	Tedavi Seçeneği	Özellik
Grup 2 Ambler Sınıf A	KPC	Kolistin, tigesiklin, fosfomisin Seftazidim-avibaktam ± meropenem Meropenem-vaborbaktam	GSBL’den farklı olarak karbapenemleri inaktive eder. Aynı plazmidle kinolon ve aminoglikozid direnç genleri de taşınabilir
Grup 3 Ambler Sınıf B	VIM	Gentamisin, aztreonam, kolistin, tigesiklin, fosfomisin	Diğer aminoglikozidlere dirençli
Grup 3 Ambler Sınıf B	NDM (MBL)	Kolistin, tigesiklin, fosfomisin	Tüm aminoglikozidlere dirençli 16S rRNA metilaz-pozitif Florokinolonlar, trimetoprim- sülfametoksazol ve kloramfenikole de dirençli Klavulanik asid, tazobaktam ve sulbaktama dirençli
Grup 2 Ambler Sınıf D	OXA-48	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Sıklıkla başka β-laktamazlar üretirler

KDEB: karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae*, GSBL: genişlemiş spektrumlu β-laktamazlar, rRNA: ribozomal ribonükleik asid.

Özetle, KPC üreten suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde seftazidim-avibaktam, meropenemle kombine olarak ya da tek başına, meropenem-vaborbaktam, kolistinli rejimler kullanılabilir (Tablo 1). Fosfomisin komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarında uygun bir ajandır. GSBL’den farklı olarak karbapenemleri de parçalar. Aynı plazmidle kinolon (%98) ve aminoglikozidlere (%50) direnç genleri de taşınabilir (55). OXA-48 üreten suşlarla infeksiyon geliştiğinde KPC’de kullanılan tedaviler tercih edilebilir. Tek fark OXA-48 üretenler sefalosporinlere daha duyarlıdır. VIM ve NDM gibi MBL üreten suşlarla infeksiyonların tedavisinde, etken kolistine duyarlıysa kolistinli rejimler tercih edilir. Kolistinle meropenem (MİK ≤8 mg/lt ise) ya da tigesiklin (karın ve akciğer kaynaklı infeksiyon varsa) birlikte verilir. Etken kolistine dirençliyse seftazidim-avibaktam aztreonamla kombine edilerek verilir. Bununla birlikte MBL üretenlerde aynı zamanda GSBL de sıklıkla bulunur. Bu durum da aztreonam direnci gelişimine neden olabilir. *In vitro* yapılan çalışmalarda kombinasyon rejimlerinde özellikle de seftazidim-avibaktam ve aztreonam arasında sinerjik etki gösterilmiştir (56). Tüm β-laktamlar uzamış infüzyonla ve mümkün oldukça yüksek dozda verilmelidir. Bu ajanlara da direnç gelişmesi elimizdeki sayılı tedavi seçeneklerini de kısıtlayacaktır. Özellikle kolistin direnci giderek artan bir problem haline gelmiştir (57,59). *K. pneumoniae* infeksiyonlarının tedavisinde kolistin kullanımıyla birlikte kolistin direnci geliştiği

gösterilmiştir (59). Plazmidle kodlanan *mcr-1* geni taşıyan suşların yayılması tedavide kolistin seçeneğini çok kısıtlayacaktır (60).

2.1.5.1.1 İnfeksiyon Kontrol Stratejileri

KDEB pek çok yönden önem taşımakta olup bunlardan ilki bu mikroorganizmaların antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olması ve bu nedenle çoğu tedavi seçeneğini sınırlamasıdır. İkincisi, bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların yüksek mortalite ve morbiditeyle ilişkili olmasıdır. Bazı çalışmalarda %50' ye varan oranlarda mortalite ve morbiditeyle ilişkilendirilmektedir. Üçüncüsü, birçok KDEB, mobil direnç genleriyle aktarılabilen karbapenemazlara sahip olduğundan, salgın yapma potansiyelinin yüksek olmasıdır. Dördüncüsü ise, *Enterobacteriaceae* hem toplum kaynaklı hem de sağlık bakımıyla ilişkili infeksiyonların ortak bir etkeni olup karbapenem direnci de bu nedenlerle çok geniş kapsamlı bir etkiye sahip olabilir. Bu sebeplerle, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) KDEB infeksiyonunu azaltmak için birtakım önlemler önermiştir.

KDEB kültürde ürediğinde infeksiyonu veya kolonizasyonu gösterebilir. Kolonizasyon, mikroorganizmanın vücutta bulunduğu ancak herhangi bir semptom ya da bulguya neden olmadığı anlamına gelir. Kolonize olan bakteriler; mesane, akciğer veya kan dolaşımı gibi steril vücut bölgelerine erişirlerse infeksiyona neden olabilir.

KDEB edinilmesi için temel risk faktörleri, sağlık bakımı alma ve antibiyotik kullanımınıdır. Sağlık bakımıyla ilişkili risk faktörleri arasında fonksiyonel durumun kötü olması (SOFA skoru), mekanik ventilasyon, yoğun bakım ünitesinde kalma, cerrahi girişim geçirme ve invazif prosedürler sayılabilir. Karbapenemler, sefalosporinler, kinolonlar ve vankomisin dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklerin kullanımı, KDEB edinilmesiyle ilişkilendirilmiştir.

Sağlık bakımı verilen ortamlarda KDEB bulaşmasını önleme stratejileri, öncelikle olguları tanımaya, kolonize veya infekte hastaları temas önlemlerine göre yerleştirmeye, tıbbi cihazları ve antibiyotikleri akıllıca kullanmaya, hasta ve personel eğitimine ve tarama kültürlerine odaklanır. Bu süreç, multidisipliner bir ekip gerektirir.

2.1.5.2 Direnç Mekanizmaları

2.1.5.2.1.1 β -Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

β -laktam antibiyotiklere karşı dört farklı mekanizmayla direnç gelişmektedir (61).

1. Antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi,
2. Penisilin bağlayan protein (PBP)'lerde değişiklik olması,
3. Eflüks pompasının aktive olması,

4. β -laktam enzimleriyle antibiyotiğin parçalanmasıdır.

β -laktam antibiyotiklerin β -laktam halkasındaki amid bağlarını hidrolize ederek antibakteriyel etkisini ortadan kaldıran enzimler, β -laktamaz olarak adlandırılır. 1940'ta *E. coli*'de penisilini inaktive eden β -laktamazın bildirilmesi, bu enzimlere ilişkin ilk bulgudur (61,62). β -laktamazlar Gram-pozitif bakterilerdeki dirençte çok önemli olmamasına karşın, Gram-negatiflerdeki dirençte çok önemlidir. β -laktamaz genleri bakteri kromozomunda ve/veya plazmid, transpozon, integron gibi yer değiştirebilen genetik elemanlarda bulunabilirler. 2000'den fazla β -laktamaz enzimi olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin sayı ve çeşitliliğindeki artış gruplandırılmalarını zorunlu hale getirmiştir.

Ambler'in moleküler sınıflandırmasına göre β -laktamazlar A'dan D'ye dört sınıfa ayrılır. Sınıf A, C ve D β -laktamazlar, β -laktam halkasını aktif bölgesindeki bir serin artığı aracılığıyla hidrolize eder. Sınıf B enzimler ise amid bağını parçalamak için çinko katyonlarını kullanan MBL'lerdir (63). Güncellenmiş Bush-Jacoby-Medeiros'un işlevsel sınıflandırmasında ise enzimler, substrat profillerine, klavulanik asid ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerine ve etilendiamin-tetraasetik asid (EDTA)'e duyarlılıklarına göre üç gruba, gruplar da kendi içlerinde altgruplara ayrılmıştır.

Sınıf A β -laktamazlar, aktif bölgelerinde bir serin aminoasidi bulunan ve temel substratları penisilinler olan β -laktamazlardır. Bu enzimlerin çoğu plazmidlerle taşınırlar.

Sınıf B β -laktamazlar, aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı bir tiyol grubu bulunan metalloenzimlerdir. Bu enzimlerin çoğu karbapenemaz aktivitesi taşımaktadır.

Sınıf C β -laktamazlar, kromozomal *ampC* geni tarafından kodlanan, bu nedenle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılan ve *Salmonella* türleri haricinde tüm Gram-negatif çomaklarda bulunan β -laktamazlardır. Bu enzimler de aktif bölgelerinde serin aminoasidi taşırlar ve esas olarak sefalosporinaz niteliğindedirler. Sınıf C β -laktamazların yapı olarak PBP'lere çok benzemeleri, bu β -laktamazların PBP'lerden köken almış olabileceklerini düşündürmektedir.

Sınıf D β -laktamazlar, yine serin proteazlar olup oksasilini hızla hidrolize edebilme yeteneğindedirler. Bu 4 sınıf enzimin kendi aralarında yapısal homolojileri yok denecek kadar azdır (64). Buna ek olarak, son yıllarda zayıf da olsa karbapenemaz aktivitesine de sahip D sınıfı β -laktamazlar ortaya çıkmıştır. Bunlardan ilk olarak, ülkemizde izole edilen bir *K.*

pneumoniae kökeninde tanımlanmış olan OXA-48 tipi enzimler halen Türkiye’de karbapenem direncinin en önemli nedenlerinden olmakla beraber, birçok ülkede de görülmeye devam etmektedir (65,66). OXA-48 üreten farklı *K. pneumoniae* klonlarının bir nozokomiyal salgından sorumlu olabileceği de, ilk kez 2006’da İstanbul’da fark edilmiştir (67).

Bush, Jacoby ve Medeiros 1995 yılında biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre β -laktamazları 4 gruba ayırmışlardır.

Grup 1

Enterobacteriaceae üyeleri başta olmak üzere Gram-negatif bakterilerin çoğunda yaygın olarak bulunabilen ve sefalosporinleri hidroliz etme yeteneğine sahip bu enzimler, Ambler sınıflandırmasında Sınıf C’de yer alırlar. *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğunda kromozomal enzimler olarak bulunmasına karşın plazmid kaynaklı enzimler de bulunur. Klavulanik asitle inhibe olmazlar ve sefamisinler (örneğin sefoksitin) üzerine etkilidirler. Birçok bakteri türünde genellikle düşük düzeyde üretilirken, β -laktam varlığında indüklenerek yüksek düzeyde üretilebilirler (63,68-69). Düşük düzeyde üretildiklerinde sefalosporinlerin antibakteriyel etkinliklerini bozabilirler ve özellikle yüksek düzeyde üretildiklerinde diğer β -laktamları da inaktive edebilirler. İndükleyici β -laktam antibiyotiğin ortamdan uzaklaştırılmasıyla sentez tekrar bazal düzeylere iner. Bununla birlikte, genin *ampD* lokusunda bir spontan mutasyon gelişirse, bu bakteri türlerinde sürekli bir aşırı üretim (derepresyon) söz konusu olur. Geniş spektrumlu sefalosporin tedavisi sırasında stabil mutantların seçilmesinden sonra görülebilen bu durum sefepim için geçerli değildir (70).

Grup 2

Moleküler sınıf olarak A ve D’de yer alan bu grup, penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre birçok alt gruba ayrılır.

2a alt grubu, penisilini sefalosporinlerden daha etkili şekilde hidroliz eden penisilnazları içermektedir. Bu enzimler, Gram-pozitif bakterilerin penisilnazlarının birçoğunu oluşturmaktadır. Stafilokoksik PC-1, ilk kez 1942’de *S. aureus*’ta tanımlanmıştır. 1969’a gelindiğinde, MSSA’ların %80’inden fazlasının pozitif olduğu görülmüştür. Günümüzde ise stafilokokların %90’ından fazlasında pozitif olan bu enzim, plazmidler aracılığıyla türler ve hatta cinsler arasında aktarılabilmektedir.

2b alt grubu; klavulanik asid ve tazobaktam gibi β -laktamaz inhibitörleriyle inhibe olan penisilinaz ve sefalosporinazları içermektedir. Aztreonam, seftazidim ve sefotaksimi hidrolize edici aktiviteleri yoktur (71). *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunan plazmid kontrolündeki “geniş spektrumlu” TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. *K. pneumoniae*'deki SHV-1 enzimini ve birçok *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* suşundaki TEM-1'i içerir.

2be alt grubu, GSBL olarak adlandırılan bu enzimler, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 kökenli enzimlerin aktif bölgelerindeki nokta mutasyonları sonucunda 1-4 aminoasid değişikliğiyle geliştirilen yeni TEM ve SHV enzimleri olmakla beraber, bunlara sefotaksimi seftazidimden daha iyi hidroliz etme yeteneğine sahip ve çevredeki bakterilerden yeni GSBL genlerinin kazanılmasıyla oluşan CTX-M grubu ve klinik önemi bu üç gruptan daha az olan BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 yanı sıra PER ve VEB ailelerinin bazı üyeleri de eklenmiştir. GSBL ailesi heterojendir. Bu enzimler, penisilinler, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim, sefpirom ve sefepim gibi oksimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidroliz etmekle beraber, karbapenemler ve sefamisinler bu enzimlerin etkisine dayanıklıdır. GSBL'ler yalnızca Gram-negatif bakterilerde bulunur. Özellikle *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli*'de bulunurken; aynı zamanda *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* ve *Shigella* türlerinde de bulunabilir.

1990'ların ortalarına kadar başlıca GSBL'ler, daha çok hastane ortamındaki *Klebsiella* türlerince oluşturulan TEM ve SHV türevleri iken; bugün başlıca GSBL üreten bakteri, *E. coli*; en yaygın GSBL enzimi ise özellikle “CefoTaXime” üzerinde etkili olan ve ilk kez Münih'te izole edilen CTX-M olmuştur. Bunlardan biri olan CTX-M-15, Avrupa'da en yaygın olduğu bildirilen GSBL'dir (72). İsimlerine rağmen seftazidim üzerine sefotaksimden daha etkili olanları da vardır. Çoğu sefepimi de hidrolize eder ve tazobaktamla klavulanik asidden daha iyi inhibe olurlar (68,71). 160'dan fazla CTX-M enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler, çoğunlukla *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium suşlarında bulunur. Dünyadaki en yaygın GSBL türüdür (73) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde giderek yaygınlaşmaktadır (74). *Enterobacteriaceae* kökenleri arasında ülkemizde GSBL enzimleri arasında en sık tespit edilenleri, CTX-M (%71.4), TEM (%49.4) ve SHV (%46.7) türevleri; en sık saptanan CTX-M alt tipinin ise CTX-M-15 (%69.4) olduğu gösterilmiştir. Bu grupta yer alan bir diğer enzim, PER-1'in *P. aeruginosa*'da aktarılabildiği olduğu ilk kez Türkiye'den bildirilmiştir (75).

2br alt grubu, TEM ve SHV enzimlerinin inhibitörlere dirençli alt tiplerini içermektedir. TEM grubunda yer alan 135 enzimin 35'i ve SHV grubunda yer alan 72 enzimin 9'u bu özelliği taşımakta iken, bu grupta herhangi bir CTX-M enzimi bulunmamaktadır.

2c alt grubu, karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asid ve tazobaktam gibi inhibitörlere duyarlı penisilinazları içermektedir. *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Aeromonas hydrophilia*'nın ER-1 enzimi, *V. cholerae*'nin SAR-1 enzimiyle PSE-1, PSE-3 ve PSE-4 β -laktamazları bu gruptadır.

2d alt grubu, oksasilin ve kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden ve OXA olarak adlandırılmış olan enzimleri içermektedir. Diğer grup 2 enzimlerinden farklı olarak Ambler sınıflandırmasında D sınıfında yer alan bu enzimler, ikinci en geniş β -laktamaz ailesini oluşturmaktadır. Günümüzde sayıları 31'e ulaşan OXA tipi enzimlerden özellikle 2 alt sınıf güncel önem taşımaktadır.

2de alt grubunda, OXA-10 ve bundan sadece birkaç aminoasid farklılığı bulunan (örneğin OXA-11 ve OXA-15), karbapenemleri hidroliz etmeyen enzimler bulunmaktadır. Diğer bir yeni alt grup olan 2df'de ise karbapenemleri hidroliz edebilen enzimler bulunmaktadır. Bunlar, sıklıkla *A. baumannii*'de kromozomal olarak bulunabilen enzimler olmakla beraber, *Enterobacteriaceae* kökenlerinde plazmid aracılığıyla taşınan OXA-23 ve OXA-48 gibi enzimleri de içermektedir (66,76).

OXA tipi karbapenemazlar karakteristik olarak zayıf hidroliz yeteneğine sahip olsalar da, bu enzimleri üreten kökenler genellikle karbapenemlere dirençli olarak görülmektedir. OXA-48, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etmeyebilir. OXA tipi karbapenemazlar imipenemi meropenemden daha hızlı hidroliz etmekle beraber, klavulanik asidle inhibe olmazlar. Bu aşamada, ülkemizde karbapenem direncinin en önemli nedenlerinin başında, bu grupta yer alan OXA-48 enziminin geldiğini tekrar belirtmek gerekir.

2e alt grubu, klavulanik asidle inhibe olan geniş spektrumlu sefalosporinazlardır. Benzer direnç profillerinden dolayı AmpC ve/veya GSBL tipi enzimlerle karışabilmektedirler; ancak aztreonama düşük afiniteleriyle AmpC tipi enzimlerden ayrılabilirler.

2f alt grubu, Ambler sınıflandırmasında A sınıfında yer alan serin β -laktamazlardır. Tazobaktamla klavulanik aside oranla daha iyi inhibe olan bu grubun en önemli substratı ise karbapenemlerdir. Karbapenemaz aktivitesine sahip bu alt grupta SME ve IMI-1 gibi birçok

kromozomal enzim bulunmakla beraber, KPC ve bazı GES tipleri gibi plazmidle kodlanan enzimlerin varlığı daha önemlidir. Özellikle KPC tipi enzimler, ABD’de, çoklu ilaca dirençli Gram-negatiflerin neden olduğu hastane infeksiyonu salgınlarında önemli rol oynamakta ve gün geçtikçe tüm dünyada yaygın hale gelmektedir.

Grup 3-MBL’ler

Bush-Jacoby Medeiros sınıflamasında fonksiyonel grup 3 içerisinde yer alan ve farklı olarak aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu bulunan enzimlerdir. Dolayısıyla bu enzimler klavulanik asid, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezken, EDTA gibi iyon şelatörüyle inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar hariç tüm β -laktamları (karbapenemler de dahil) hidrolize edebilmeleridir. Başlangıçta, *S. maltophilia*’nın L-1 enzimi veya *B. fragilis*’in CcrA enzimi gibi kromozomal genler ile kodlanan enzimler olarak bilinmelerine karşın, 1991’de Japonya’da *S. marcescens* ve *P. aeruginosa* suşlarında plazmid kökenli bir MBL (IMP-1) saptanmıştır (63,69). Sonrasında Avrupa ülkelerinde de integron kökenli IMP (IMP 1-8) ve VIM (VIM 1-3) ailesi üyeleri giderek artan oranlarda bildirilmeye başlanmıştır. MBL’ler hem yapısal hem de işlevsel olarak benzersiz bir β -laktamaz grubudur. Yapısal olarak alt sınıflara (B1-B3 ve B2), işlevsel olarak alt gruplara (3a ve 3b) ayrılır.

Alt grup 3a’da bulunan enzimler, genellikle penisilinleri imipenemden daha hızlı olarak hidrolize edebilirler. Bu grup içerisinde *Bacillus cereus* II, *B. fragilis*’in CcrA, *B. cepacia*’nın PCM-1, *S. maltophilia*’nın L1, *Chryseobacterium indologenes*’in IND-1-4, *C. meningosepticum*’un BlaB enzimleri yanı sıra, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. flexneri* ve *K. pneumoniae* gibi değişik türlerde saptanan IMP 1-8, *P. aeruginosa*’da saptanan VIM 1-3 enzimleri ve *Acinetobacter türleri* ve *K. pneumoniae*’de saptanmış NDM-1 yer almaktadır.

Alt grup 3b, penisilin ve sefalosporinlerden ziyade karbapenemleri hidroliz etme yeteneğine sahip küçük bir gruptur. *Aeromonas* türlerinin kromozomal metalloenzimleri bu grupta yer almaktadır. Karbapenemler dışındaki β -laktamlara etkileri çok az olduğundan varlıkları nitrosefin hidrolizine dayanan testlerle gösterilemez.

Alt grup 3c’de ise sadece *Legionella gormanii*’nin MBL’si yer almaktadır. Bu enzim yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılmaktadır.

Grup 4

Klavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlardır. Yapıları ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir. *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SAR-2 β -laktamazı dışında hepsi kromozomaldır.

2.1.5.2.1.1.1 Karbapenemaz Varlığını Doğrulama Yöntemleri

Karbapenem tedavisine klinik olarak yanıt alınmadığında karbapenemaz üretiminin saptanması kritik bir aşamadır ve hastane infeksiyonlarının önlenmesi açısından önemlidir. Karbapenemaz üretiminin saptanması için en başta karbapenemlere karşı duyarlılığı azalmış suşların belirlenmesi gerekir. Disk difüzyon yöntemiyle karbapenemaz direncinin araştırılması ilk basamaktır. Meropenem, özgüllük ve duyarlılık birlikte değerlendirildiğinde en uygun seçenek olduğu için zon çapının < 28 mm saptanması durumunda karbapenemaz varlığı mutlaka araştırılmalıdır. Ertapenem, meropenemden sonra en sık kullanılan alternatif bir seçenektir ve duyarlılığı yüksektir. Bununla birlikte, karbapenemazı olmayıp GSBL ve AmpC üreten bakterilerde de direnç görülebildiği için özgüllüğü düşüktür. Karbapenemlere duyarlılıkta azalma saptandığında rutin duyarlılık testlerinde Modifiye Hodge testi, kolorimetri testleri, karbapenem inaktivasyon testi yapılarak direnç varlığı gösterilir. Direncin varlığı gösterildikten sonra ise inhibitör bazlı yöntemler gibi fenotipik yöntemler ya da genotipik yöntemlerle direncin türü belirlenir.

Direncin varlığı belirlenirken aşağıda sıralanan testler kullanılır. Bu testler;

Modifiye Hodge gradyan testi (MHT): İlk olarak *N. gonorrhoeae*'de penisilinaz aktivitesinin gösterilmesinde MHT kullanılmış, daha sonraki yıllarda MBL'leri tespit etmek için Lee ve arkadaşları tarafından 2003 yılında geliştirilmiştir. Test için gerekli olan malzemeler imipenem duyarlı *E. coli* ATCC 25922 standart suşu, imipenem diski, test edilecek bakteri ve Mueller Hinton agar (MHA)'dır. İmipenem diskinin kenarından başlayarak dışa doğru ışımsal bir şekilde imipenem dirençli suşun ve kontrol suşlarının pasajı yapılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra, inhibisyon zonunda yonca yaprağı şeklinde görüntünün olması halinde pozitif olarak kabul edilir

Kolay kullanımı ve disk difüzyon testinde kullanılan malzemeler dışında ilave bir ekipman gerektirmemesi nedeniyle laboratuvarlarda tercih edilmektedir (77). Testin duyarlılığı ve özgüllüğü bakterinin ürettiği karbapenemaz çeşidine göre farklılık göstermektedir. Duyarlılığının düşük olması ve yanlış pozitiflikler vermesi bu testin modifikasyonlarını da

beraberinde getirmiştir. MBL tespitinde duyarlılığı artırmak amacıyla MHA besiyerine Zn^{+2} ilavesi, AmpC üretimi ve porin kaybı gibi direnç mekanizmalarına bağlı yanlış pozitiflik oranını engellemek için de besiyerine kloksasilin ilavesi yapılan ve olumlu sonuçlar sunan çalışmalar bulunmaktadır (78).

Kolorimetre testleri: Carba NP® gibi hızlı testler karbapenem hidrolizini belirler.

Karbapenem inaktivasyon testi: Karbapenemaz üretimi test edilecek suşla birlikte inkübasyona bırakılan karbapenem diskinin, bakterinin enzimiyle inaktivasyonunun fenotipik olarak gösterilmesini baz alan ve temel laboratuvar pratiğinde ulaşılabilir, maliyeti düşük olan bir testtir (79). Suda hazırlanan şüpheli bakteri süspansiyonuna meropenem diski atılıp iki saat inkübasyona bırakılır. İki saatin sonunda süspansiyon içindeki disk alınır ve karbapeneme duyarlı standart suşun (*E. coli* ATCC25922) inoküle edildiği MHA'ya konulur. 6 saatlik inkübasyon sonrasında normalde *E. coli* suşunun etrafında inhibisyon zonu oluşması beklenirken, test edilen bakteride karbapenemaz varlığında inaktive olan meropenem diski *E. coli* suşunda inhibisyon zonu oluşturamaz. Böylece test edilen bakteride, karbapenemaz üretiminden bahsedilir. Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) için en az sekiz saatlik inkübasyon (bazen bir gece) gerekmektedir (80). Basit, ucuz ve kısa sürede sonuç verme potansiyeline sahip olduğu için iyi bir alternatif olarak diğer fenotipik yöntemlerle kıyaslamaların yapıldığı çalışmalar mevcuttur.

Karbapenemaz varlığı tespit edildikten sonra direncin türünün saptanması gereklidir. Direncin türü saptanırken de aşağıda sıralanan testler kullanılır. Bu testler;

Çift Disk Sinerji Testi: İmipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tespit edilmesiyle MBL pozitif bakterilerin tanımlanması esasına dayanır. İmipenem diskinin merkezinden 10 mm uzağına yerleştirilmiş boş disk üzerine EDTA eklenir. EDTA eklenmiş diske doğru imipenem diski inhibisyon zonunun genişlemesi, sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilir.

Kombine disk difüzyon testi: Plak içerisine iki imipenem diski yerleştirilir ve bunlardan bir tanesine EDTA eklendikten sonra inkübasyona bırakılır. Sonrasında inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirme yapılır. EDTA solüsyonu eklenen imipenem diskinin inhibisyon zonu, imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif olarak kabul edilmektedir.

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS): Bu yöntemde, mikroorganizmaların içerdiği biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edilmesinden sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilmesiyle protein görünüşleri çıkarılmaktadır. Bu protein görünüşlerine ait grafiksel görüntüler elde edilmekte ve sistemin veri tabanındaki referans mikroorganizmaya benzerliğine göre mikroorganizmalar cins ve tür olarak tanımlanabilmektedir. Mikrobiyoloji alanında moleküler yöntemlerin kullanımı ile birlikte bu alanda birçok ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemelerin önemli ürünlerinden biri olarak son yıllarda mikrobiyolojik materyallerin incelenmesinde MALDI-TOF MS kullanılmaya başlanmıştır. Bakteride karbapenemaz varlığı durumunda karbapenem kullanılarak hidrolitik ürünlerin analizi sayesinde kısa sürede karbapenemaz üretimini saptayabilmektedir (81,82). Yüksek duyarlılık ve özgüllük, test süresinin kısa olması, dolaşım sistemi infeksiyonları gibi hayati infeksiyonlarda kan kültürü şişesinden kısa sürede direnç analizi yapabilme potansiyeli gibi bir çok avantajı testi kullanışlı yapmaktadır. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarının artması ile daha yaygın kullanım alanı bulabilecektir (83).

Genotipik Yöntemler: Fenotipik metodların, ulaşılabilir olmaları ve basit donanım gerektirmeleri avantaj olmasına rağmen, sonuçlarının nihai olarak moleküler yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğün yüksek olduğu, hızlı ve fenotipi etkileyen faktörlerden korunmuş yöntemler olan moleküler yöntemler artık daha sık kullanılır olmuştur. PZR çeşitleri bu amaçla sık kullanılan yöntemlerdendir. Karbapenemaz tiplerinin primerleri bulunması halinde tek veya çoklu olarak gerçek zamanlı PZR kullanılarak *blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaNDM*, *blaOXA-48* gibi yaygın görülen karbapenemaz tipleri 40 dk-6 saat gibi kısa zamanda yüksek duyarlılık ve özgüllükte tespit edilebilmektedirler (84).

Tablo 2. MBL, Grup A ve D Karbapenemazlar ve Karbapenemaz Üretimi Olmadan (GSBL ya da AmpC + Porin kaybı) Görülen Direnç Mekanizmalarının Birbirinden Ayrımı

β -laktamaz	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	Kloksasilin	Temosilin MİK >128 ya da zon çapı <11 mm
MBL	+	-	-	-	Değişken
KPC	-	+	-	-	Değişken

MBL+KPC	Değişken	Değişken	+	-	Değişken
OXA-48 türevleri	-	-	-	-	Evet
AmpC+Porin kaybı	-	+	-	+	Değişken
GSBL+Porin kaybı	-	-	-	-	Hayır

DPA: Dipikolinik asid, EDTA: Etilendiamin tetraasetik asid, APBA: Aminofenilboronik asid, PBA: Fenilboronik asid.

2.1.5.2.1.2 Kolistin Direnci Mekanizmaları

Kolistine karşı kazanılmış direnç, temel olarak antibiyotiğin hedefi olan hücre membranında bulunan lipopolisakaridlerin yapılarında meydana gelen değişikliklerle olmaktadır. Yakın zamana kadar bu değişikliklerden sadece kromozomal genlerde olan bazı mutasyonların sorumlu olduğu düşünülmekteyken, 2016 yılında Çin’de tanımlanan ve plazmid aracılığı ile kodlanan *mcr-1* adlı bir genin de kolistin direncine neden olduğu saptanmıştır (85). Kolistin direncinde ana moleküler mekanizmanın, hücre membranında bulunan lipopolisakarid tabakanın lipid A kısmına fosfoetanolamin (PEtN) veya 4-amino-4- deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) eklenmesinin yanı sıra deasetilasyon veya hidroksilasyon gibi kovalent değişiklikler olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, kapsül oluşumu ve eflüks pompalarının da etkili olabileceğini öngören çalışmalar mevcuttur (86). En sık karşılaşılan lipopolisakarid değişimi L-Ara4N eklenmesi yoluyla gerçekleşen katyonik değişim olmaktadır ki bu durum lipid A’nın net negatif yükünü 0’a düşürmektedir. İkinci sıklıkta görülen değişiklik olan PEtN eklenmesi ise net negatif yükü -1/-1.5 civarına düşüren bir modifikasyona yol açmaktadır (87). Bu mekanizmalarla lipopolisakaridin negatif yükündeki azalma, kolistinin hücre membranına bağlanmasını zorlaştırmakta ve direnç gelişimine neden olmaktadır.

Genel olarak, *phoP/phoQ* ve *pmrA/pmrB* gibi hücre membranı üzerinde etkili olan düzenleyici sistemlerde, çevresel ya da spesifik mutasyonel etkenlerle gerçekleşen aktivasyon artışının, lipopolisakarid modifiye eden genlerin ekspresyonunda da artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, farklı bakteri gruplarında kolistin direnci gelişimine neden olan farklı genetik modifikasyonlar olduğunu da belirtmek gerekir. Özellikle *Enterobacteriaceae* üyeleri ve nonfermentatif bakterilerdeki kazanılmış direnç mekanizmalarında farklılıklar bulunmaktadır. Çalışmanın konusu PRKp suşları olduğu için, bu suşlarda gelişen kolistin direnci anlatılacaktır.

Son yıllarda çoklu ilaca dirençli kökenlerinin neden olduğu hastane infeksiyonları sebebiyle *K. pneumoniae*'de görülen kolistin direnci klinik açıdan büyük önem arz etmektedir. Bu bakteri üzerinde yapılan çalışmalar, dirençli bakterilerin lipid A yapısında 5 kat daha fazla L-Ara4N bulunduğunu göstermiştir (88). Sonrasında bu kökenlerde de *phoP/phoQ* ve *pmrA/pmrB* regülatuar sistemlerinde gerçekleşen mutasyonların, *pmrC* ve *arnBCADTEF* operonlarının upregülasyonuna neden olarak lipid A yapısının PEtN ve L-Ara4N ile modifikasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir (89). *K. pneumoniae* kökenlerinde son dönemde kolistin direnciyle ilişkilendirilmiş olan başka bir mutasyon ise *phoP/phoQ* regülatuar sistemine negatif feedback sağlamakla görevli olan bir transmembran proteinini kodlayan kromozomal bir gen olan *mgrB*'de saptanmıştır (90,91). *mgrB* mutasyonlarının, *pmrA* ve/veya *phoP*'nin fosforillenmesi yoluyla, *arnBCADTEF* operonunun upregülasyonuna neden olarak lipid A yapısına L-Ara4N eklenmesine yol açtığı gösterilmiştir (89). Bunlara ek olarak, kapsül senteziyle ilişkili bir gen olan *rcaB* geninin de *phoP/phoQ* sistemini baskılayıcı etkisi olduğu, dolayısıyla bu gendeki mutasyonların da *phoP/phoQ* sisteminin aktivasyonu yoluyla kolistin direncine neden olabileceği gösterilmiştir.

2.1.5.2.1.3 Ülkemizdeki Direnç Durumu

Avrupa ülkeleri arasında karpapenemaz tiplerinin yayılımı açısından ülkemiz, OXA 48 tip karpapenemazlar açısından endemiktir. Ayrıca, ülkemizde NDM-1 tip karpapenemazlar açısından hızlı bir yayılım söz konusudur (18,60). Yapılan çeşitli araştırmalarda NDM için Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri, İsrail, Yunanistan ve İtalya; KPC için Hindistan, OXA-48 için Türkiye ve Kuzey Afrika ülkeleri odak merkezi olarak rapor edilmiştir. OXA-48 ülkemizde ilk olarak 2003 yılında saptanmıştır ve yoğun olarak bildirilmeye devam edilmektedir (5,92).

Karpapeneme dirençli *Klebsiella* türleri başta olmak üzere, karpapeneme dirençli mikroorganizmaların neden olduğu salgınların ve sporadik olguların ülkemizde giderek arttığı rapor edilmektedir. Antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* salgınlarındaki artış mortalite ve morbiditede artışa, hastanede yatış süresinin uzamasına ve tedavi maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır (93). Porin kaybı ya da efluks pompalarının işlevlerindeki değişiklik antibiyotiklere karşı direnç gelişimine katkıda bulunsada, karpapenem direncinin gelişmesinde temel mekanizma karpapenemaz üretimidir. Uygun tedavinin belirlenebilmesi ve direnç yayılımının önüne geçilebilmesi açısından, karpapenemaz üreten ve kolistin direnci olan kökenlerin doğru şekilde saptanması önemlidir.

2.2 Biyofilm

Biyofilm, canlı veya cansız yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir matriks içerisine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmalar topluluğudur (94,95). Biyofilm tabakasına suyla temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde, kağıt fabrikalarında ve dış ünitelerinde rastlanabilir. Bu cansız yüzeylerin yanı sıra, biyofilm canlı organizmada da farklı koşullar altında ve çeşitli dokularda oluşmaktadır. Biyofilm içinde yaşamak bakterilere; besinsizlikten, susuzluktan, pH değişikliklerinden, dezenfektanlardan, antibiyotiklerden ve toksik maddelerden korunma avantajı sağlar. Biyofilm, mikroorganizmalar için koruyucu bir rol üstlenirken immünosuprese konaklarda ve vücuda kalıcı veya geçici yabancı cisim yerleştirilmiş hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedir (96). Nozokomiyal infeksiyonların yaklaşık %65'inden biyofilm infeksiyonlarının sorumlu olduğu ve bu durumunun tedavi giderlerini çok yükselttiği bilinmektedir (97).

2.2.1 Biyofilm Yapısı

2.2.1.1 Biyofilm Matriksi ve Bileşenleri

Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matriks (EPS) ile üç boyutlu, mantar benzeri yapıda, karmaşık ancak bir o kadar koordine yaşam alanı oluşturur. Bu sebeple habitat biçimlendiricileri olarak isimlendirilirler (97,98). Bu biyojenik yaşam alanı oluşumu dinamik bir süreçtir. Bakterilerin matriks üreterek, kendilerini koruma altına alan bir barınak sağlaması ve besin maddelerinin birikimini hızlandırması özelliklerinin yanı sıra, biyofilmin fizikokimyasal ortamının değişimi ve içindeki organizmalar arasındaki hem işbirliği hem de rekabet olarak gelişen etkileşimleriyle tamamen farklı bir fiziksel yaşam alanı oluştururlar. EPS moleküllerinin organizasyonu, matriksi oluşturan bileşenler arasındaki etkileşime ve biyofilm içerisindeki organizmaların fizyolojik aktivitelerine bağlıdır. EPS molekülleri biyofilm mimarisinin oluşumuna aracılık eder. Bu mimaride yoğun olarak gözlenen kanal ve gözenekler; mikrokoloniler arasında su, suda çözülmüş besinler ve iyonların iletimine olanak sağlar. Böylece biyofilmler içerisinde sirküler bir sistem oluşur (99,100). EPS'nin; %97'sinden fazlasını su oluştururken, %3'lük kısmını suda çözünebilir jel yapıdaki ekzopolisakaridler, sürfaktanlar, proteinler ve eDNA ile suda çözünmeyen selüloz, fimbriya, pili flagella ve amiloidler oluşturur.

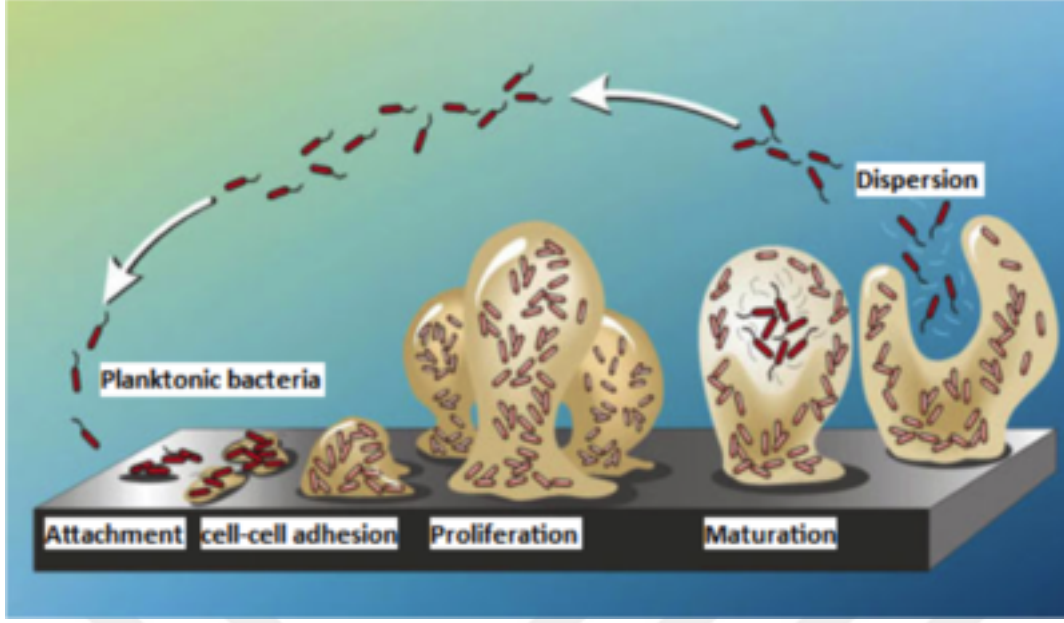
2.2.2 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu için gereken öncelikli komponentler arasında; mikroorganizma, yüzey ve EPS bulunur (101). Biyofilm yapısının %97'sini su, %2-5'ini mikroorganizma, %1-2'sini polisakarid, %1-2'sini protein, %1-2'sini DNA ve iyonlar oluşturmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür, kendi mikrokolonisini oluşturur. Olgun bir biyofilmin gelişmesi için geçen süre mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak birkaç saat ile birkaç haftadır (102). Sağlıklı bir bireyin kanına günde ortalama 30 kez bakteri karışmaktadır. Normal vücut savunma sistemi bu geçici bakteriyemileri kontrol altına alır, ancak kateter, stent, yapay kalp kapağı, ortopedik protez veya ölü dokular gibi bakterilerin tutunacağı yüzey varsa bakteriler bu yüzeylere tutunur. Bakteriler olay yerine taşandıktan sonra biyofilm oluşumu başlar.

Biyofilm;

- 1) Mikroorganizmanın Yüzeğe Tutunması (Geri Dönüşümlü),
- 2) Geri Dönüşümsüz Tutunma,
- 3) Mikrokoloni Oluşumu,
- 4) Olgun Biyofilm Oluşumu,
- 5) Planktonik Hücrelerin Biyofilmden Kopması,

Aşamalarının sırasıyla gerçekleşmesiyle oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun basamakları (103).

Yukarıda da bahsedildiği üzere, biyofilm oluşum süreci; bir seri fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametre tarafından kontrol edilir (104):

1. **Mikroorganizmanın yüzeye tutunması:** Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşümlü özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyiyle tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır. Saniyeler içinde sonlanır. Bu evrede bakteriler logaritmik çoğalma fazındadır.
2. **Geri dönüşümsüz tutunma:** Birinci basamaktan dakikalar sonra başlar. Tutunma geri dönüşümsüz olup tutunmada adezinler rol oynar. Bakteriler yüzey adezinleriyle diğer hücrelere de bağlanır. Bu evrede çoğalma devam eder. “Quorum Sensing” (QS) gen aktivasyonunun yanı sıra, hücreler arası iletişimi sağlayan kimyasal sinyaller de gönderilmeye başlar. Sinyal yoğunluğu belli bir düzeye ulaştığında EPS salgılamasını sağlayan genetik mekanizmalar aktive olur. Çevresi matrisle sarılı mikroorganizma agregatları oluşur. EPS yapışkan ve oldukça hidrate bir madde olup; planktonik bakterileri, gıdaları, mineralleri, kristalleri, korozyon maddelerini yakalayarak giderek tabakalar halinde kalınlaşır.

3. **Mikrokoloni oluşumu:** Biyofilm kalınlığı 10 µm'yi aştığında başlayan bu aşamaya birinci olgunlaşma dönemi de denir. Tipik olarak biyofilm mikrokolonilerinin %10-25'i bakteri hücrelerinden, %75-90'sı EPS'den oluşur.
4. **Olgun biyofilm oluşumu:** Mikrokoloniler büyüyerek olgun ve kompleks yapıda büyük mantar benzeri şekilleri oluştururlar. Biyofilm kalınlığı 100 µm'yi aştığında başlayan bu döneme ikinci olgunlaşma dönemi de denir.
5. **Kopma:** Elverişli koşullarda biyofilm yapısı içinde bakteriler arası sinyal molekülleriyle haberleşme sağlanarak bakteriler biyofilmin üst kısımlarından ayrılarak serbestleşirler. Başka bir bölgeye yerleşerek yeni bir biyofilm oluşturmak için mikrokoloni oluşturabilir. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (102,105).

2.2.2.1 Biyofilm Oluşumunda Bakteriler Arası Haberleşme

Bakterilerin sosyal yaşamlarının olduğu ilk kez, 1970'li yılların başında "Euprymna scolopes" in (Hawaii mürekkep balığı) ışık organına yerleşerek simbiyoz yaşayan bir biyoluminesan (Biyolojik olarak ışıyan; halk arasında bu görüntüye "yakamoz" denir) deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* üzerinde yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıkmıştır. Euprymna scolopes, bakterinin ürettiği ışığı avını çekme, avcılardan kaçınma gibi belirli amaçlar için kullanırken, *V. fischeri* de besin açısından zengin mikroçevrede yaşar. Yüksek bakteri yoğunluğunda, çoğunluğu algılama sistemi tarafından kontrol edilen biyoluminesans gerçekleşebilmektedir. *V. fischeri*' de bakteri yoğunluğuna bağlı ışık üretiminin düzenlenmesi için sinyal moleküllerinin eşik yoğunlukta üretilmesi, birikmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (106,107).

QS, çoğunluğu algılama anlamına gelen ve hücreden hücreye aktarılan iletişim sinyalleriyle biyofilm oluşumunu kontrol eden bir sinyal sistemidir. Bir bakteri çevreden gelen uyarıları algılayarak çevreye uyum sağlar. QS kavramı minimum popülasyon birimini algılama olarak da ifade edilebilir. Mikroorganizmalar QS sinyalleri sayesinde bir odakta toplanırlar. Bu da biyofilmin temelini oluşturur (108). Çoğunluğu algılama sistemlerinin anlaşılması, bakterilerin sinyal molekülleriyle biyofilm oluşturdukları ve antibiyotiklere direnç geliştirdikleri bunun yanı sıra, kronik infeksiyonlara neden oldukları gösterilmiştir (109).

Çoğunluğu algılama sinyal iletim sisteminin basamakları: (i) bakterinin sinyal molekülü üretmesi, (ii) ürettiği sinyal moleküllerinin belli bir eşik değerden sonra bakteri dışına salınarak

mikroçevreyi tanımlamada kullanılması, (iii) bu tanımlamaya ve/veya çevreden gelen sinyal molekülü yoğunluğuna göre transkripsiyonel (DNA' dan RNA oluşumu) yanıtları tetiklenmesi ile virülans faktörlerinin yeniden düzenlenmesi şeklinde özetlenebilir (110). QS bakterilere virülans faktörlerin regülasyonu ile immün sistemden korunma ve besin kaynaklarına adaptasyon gibi avantajlar sağlar. Bu sistemde rol alan sinyal moleküllerine “autoinducer” (AI; kendi kendini uyaran) da denmektedir. Gram-negatif bakteriler açillenmiş homoserin lakton (AHL) molekülünü sinyal molekülü olarak kullanır. Difüzyon ve/veya transport yoluyla salınan AI sinyal molekülleri, eşik değerdeki yoğunluğa ulaşıncaya kadar hücre dışında birikirler. Eşik değere ulaşıncaya mikroçevredeki bakteri içine girer, transkripsiyonel faktörleri tetikleyerek genlerin transkripsiyonunu tetikler (111). AI molekülleri türe özgüdür. Bununla birlikte, değişik türdeki birçok bakterinin ortak AI molekülünü de kullandığı gösterilmiştir (112,113). Gram-pozitif bakteriler de küçük “autoinducer peptides” (AIPs)’leri sinyal molekülü olarak kullanır. “autoinducer-2” (AI-2) ise hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerdeki bilinen başlıca sinyal molekülleridir.

2.2.3 Biyofilm Direnci

Biyofilm, içinde mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. Bakterilerin serbest bakteri formlarına oranla biyofilm oluşturan formları antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençlidir (114). Biyofilm içindeki bakterilerin direncinden sorumlu mekanizmalar sıklıkla enzimatik inaktivasyon, atım pompaları, ilaç hedefinde mutasyondur. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir. Antimikrobiyallerin biyofilm içerisine düşük penetrasyonu, mikroçevrede değişiklik, biyofilme özgü dirençli fenotipik varyant oluşumu, biyofilm içerisindeki bakterilerin çoğalmalarının yavaşlaması, persistan hücrelerin varlığı gibi faktörler antibiyotik direncine neden olmaktadır (115,116).

- a) **Biyofilm içine düşük penetrasyon:** Biyofilm, fiziksel bir bariyer işlevi görerek antibiyotik ve dezenfektanların bakteriye ulaşmasını engeller. Biyofilm içindeki ozmotik çevre değişiklikleri, ozmotik bir strese yol açarak porin yapısı ve sayısında değişiklik yaparak farklı grup antibiyotiklerin bakteri hücresi içine girişini engeller. Bu durum da özellikle β -laktam antibiyotiklerin hücre içine girişini kısıtlayabilir. Genel stres yanıtı bakteride “Q faktör” olarak bilinen RNA polimeraz sigma (RpoS) geninin ekspresyonuna yol açıp bir ozmotik koruyucu olarak fonksiyon gören

trehalozun aşırı sentezlenmesine ve biyofilmin kalınlaşmasına neden olur. *P. aeruginosa* ile kronik kolonize olan kistik fibrozis olgularının balgamlarında RpoS mRNA'sının gösterilmesi bu bulguyu desteklemektedir (117). Düşük penetrasyon olayı EPS antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonu ile birlikte olduğunda ortaya çıkan direnç daha belirgin hale gelmektedir. Antibiyotiklerin biyofilm içine penetrasyonunu dolayısıyla biyofilm infeksiyonlarının tedavisini güçleştirmektedir (118). Örneğin; *P.aeruginosa*'nın serbest formuna siprofloksasinin penetrasyonu normalde 40 saniyeyken, biyofilm oluşturmuş formunda penetrasyon 21 dakika kadar uzun bir süredir (119).

- b) **Mikroçevre değişikliği:** Biyofilm içindeki bakteri popülasyonu, besin maddeleri ve oksijen konsantrasyonuna göre değişir. Biyofilm tabakasının en dışındaki bakteriler besin ve oksijene daha derinde bulunan bakterilere kıyasla daha rahat ulaşabilmektedir. Bu durum bakteri popülasyonunda heterojenliğe neden olabilir. Bu heterojenlik, aktif hücreleri hedefleyen antibiyotiklerin etkinliğinde farklılıklara yol açar. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketilmesi ve dip kısımlarda anaerob ortamın oluşması özellikle aminoglikozidlerin etkinliğini azaltabilir ve bu sınıf antibiyotiklere direnç geliştirebilir (94). *P. aeruginosa*'nın biyofilmlerinde siprofloksasin ve tobramisinin yüzeye yakın bölgedeki suşlarda daha yüksek olmasının saptanması da oksijen yoğunluğuna bağlanmaktadır (120,121). Kolistin ise *P. aeruginosa*'nın bölünmeyen formuna etkili tek antibiyotik olmakla birlikte, biyofilm yüzeyindeki bakterilere etkili olmayabilir. *In vitro* çalışmalarda; siprofloksasin ve kolistin kombinasyonunun tüm tabakalara etkili olduğu gösterilmiştir.
- c) **Biyofilme özgü dirençli fenotipik varyantlarının oluşumu:** Biyofilm içerisindeki bakteriler DNA hasarı, reaktif oksijen radikalleri, toksik metabolitler, gıda azlığı gibi nedenlerle stres altındadırlar. Stres durumunda gen regülasyonunu sağlayan RpoS genleri aktive olur ve aşırı mutasyona uğrayan yeni bir fenotip ortaya çıkar. Bu fenotipik varyantların yüksek konsantrasyonda antibiyotiklere dirençli olma sıklığı 10^{-6} 'dır.
- d) **Çoğalma Oranlarındaki Değişiklik:** Bakteriler ihtiyaç duydukları besin maddelerini ortamda bulamadıklarında üremeleri yavaşlar. Aktif üreme fazının yavaşladığı veya üremenin olmadığı forma geçerler (122). Biyofilm içindeki bakterilerin büyüme hızlarının serbest yaşayan bakterilere göre daha yavaş olduğu bilinmektedir. Bakterilerin çoğalma hızlarındaki değişiklik, antibiyotik

cevaplarında da değişikliğe neden olmaktadır. Örneğin; penisilin ve sefalosporinlerin aktif üremeyen bakteriler üzerine etkisi olmadığı gibi bakterileri öldürme oranı, üreme oranlarıyla da orantılıdır. Birçok farklı sınıfa ait antibiyotikler bölünmeyen hücreleri öldürebilmekle birlikte, hızlı bölünen bakterilere çok daha etkilidir (115,123).

- e) **Persistan Hücreler:** Biyofilmdeki persistan hücre subpopulasyonunun oluşumu, antibiyotik direncinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun süreli antibiyotik tedavisi sonrasında biyofilmdeki bakteri populasyonunun büyük bir kısmı ölmesine rağmen, küçük bir bakteri populasyonu etkilenmeden hayatta kalmaktadır. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücrelerle açıklanmaktadır (124).

Yukarıda açıklandığı üzere; biyofilm direncini etkileyen farklı direnç mekanizmalarının bulunabileceği, dolayısıyla bu sürecin multifaktöriyel olduğu görülmektedir (125).

2.2.4 Biyofilm İnfeksiyonları

Biyofilmler tipik olarak kronik infeksiyonlara neden olur. Bu durum, infeksiyonların uygun antibiyotik tedavisine, konağın doğal ve kazanılmış savunma mekanizmalarına rağmen devam ettiği anlamına gelir. Kronik infeksiyonlar biyofilm etrafındaki inflamatuvar yanıt nedeniyle persistan ve ilerleyici karakterdedir (126). Biyofilmle ilişkili hastalıklar; dental plaklar, kronik tonsilit, kronik larenjit, kateter (trakeal, damar, üriner, şant) infeksiyonları, eklem ve kalp protez infeksiyonları, infektif endokardit, kistik fibroz, kontakt lens infeksiyonları, böbrek taşları, safra yolu infeksiyonları, osteomyelit, kronik sinüzit, kronik otitis media, vajinal tampon kullanımına bağlı toksik şok sendromu, prostatit, kronik yara infeksiyonları, diyabetik ayak infeksiyonudur.

2.2.4.1 Biyofilm İnfeksiyonlarının Tanısı

Hastanın anamnezi biyofilm infeksiyonlarının tanısında yol göstericidir. Akut infeksiyonlarda biyofilm oluşumu %6, kronik infeksiyonlarda %60'a kadar artmaktadır. Klinik örneklerin Gram boyamasında inflamatuvar hücrelerin ve matriksle çevrelenmiş mikrobiyal agregatların görülmesi biyofilm varlığını düşündürür.

Parsek ve Singh'in 2003 yılında biyofilmlerin neden olduğu infeksiyonları tanımlamada kullandığı 4 maddelik kriter, 2012 yılında Hall-Stoodley ve arkadaşları tarafından 6 maddeye yükseltilmiştir (127,128).

Altı maddede sıralanan bu kriterler;

1. Patojenik bakteriler bir yüzeye ilişkin olup, hastada infeksiyonun nerede bulunduğunu belirlemeye yarar. Öncelikle dikkat edilmesi gereken anatomik alanlar bu şekilde belirlenmiş olur.
2. İnfekte olmuş doku ve/veya materyaller doğrudan incelendiğinde, bir yüzeye sarılmış hücre kümelerinde toplanmış bakteriler görülür. Bu yüzey bakteri ve konak kökenli olabilir. Laboratuvara gönderilecek örneklerin özellikleri belirlenmiştir.
3. İnfeksiyon konakta belirli bir bölgede görülür. Dağılımın belirlendiği durumlar ikinci bir infeksiyon odağına işaret eder. Dağılım, biyofilmin artık parçalanmaya başladığını ve dirençli suşların başka biyofilme ilişkili infeksiyon odakları oluşturmak üzere vücuda dağıldığını gösterir.
4. Bakterinin standart veya rutin duyarlılık testlerinde verilen antibiyotiğe duyarlı olduğunun belirlenmesine karşın, antibiyotik tedavisinde başarısızlık görülür. Biyofilm içine yerleşmiş olan mikroorganizmalar metabolik yollarını değiştirirler ve aerotoleran halden mikroaerotoleran hale geçebilirler. Dolayısıyla antibiyotik duyarlılık testlerinde aerobik duyarlılık testlerinin yerine anaerobik duyarlılık testlerinin yapılması daha akılcı olacaktır.
5. İnfeksiyon şüphesi olmasına karşın biyofilm infeksiyonundaki lokalize bakterilerin hatalı alınması veya doğru olarak alınan örneklerde de geleneksel bakteri kültür yöntemlerinin biyofilm oluşturan bakteriler için yetersiz kalması nedeniyle kültürde üreme olmaz. Bunun yanı sıra, örneklerin infeksiyonu çevreleyen inflamatuvar dokudan alınması ve anaerobik taşıma besiyeri yerine aerobik taşıma besiyeri kullanılması etkeni de başarısızlık nedeni olabilir.
6. Bakteri mikrokolonilerinin konağın inflamatuvar yanıtıyla temizlenmediği görülür. Bu mukoid koloniler, biyofilm kolonileridir. Geleneksel mikrobiyolojik çalışmalarda göz ardı edilen bu özellik klinik başarıyı gölgeleyebilir. Biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* infeksiyonunun ayırıcı tanısında, FDA ve CDC onaylı olan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının hücre duvarlarındaki yağ asidi profillerini değerlendirerek biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *P. aeruginosa* suşlarının ayırımında yardımcı olur (129).

Ortopedik cihazlarla ilişkili biyofilm infeksiyonların tanısında; infeksiyondan şüphelenildiğinde hücre sayımı ve mikrobiyolojik inceleme yapılabilmesi için sinoviyal sıvı örneklenmelidir. Sonuçlar infeksiyonu düşündürüyorsa, debridman yapılması gerekir. İntraoperatif örnekler implant çevresindeki dokulardan ve mümkünse implantın tamamen çıkartılmasıyla elde edilmelidir. Önerilen üç ila altı adet dokunun kültürünün yapılmasıdır. En az iki tanesinde üreme olması halinde protez infeksiyonu tanısı koyulabilir (130).

Kateterle ilişkili kan dolaşımı infeksiyonlarının tanısında; klinik bulguların yanı sıra, santral venöz kateterden ve periferik venden kan kültürü almak gerekir. Periferik venden alınan kültürle kıyaslandığında, kateterden alınan kültürde en az iki saat önce üreme ve kantitatif olarak en az üç kat yoğunlukta üreme olmasının yanı sıra başka bir bölgede infeksiyon kanıtının olmaması tanıyı koydurur.

Kateter çıkarıldıktan sonra kateterin 3-4 cm'lik distal ucu kültürü için gönderilmelidir ve bunun için genel olarak iki yöntem kullanılmaktadır (131). Maki yöntemiyle kateterin distal ucu agar yüzeyine sürülerek ekim yapılır. Yapılan ekimde 5 cm'lik segmentte 15 ve daha az sayıda koloninin varlığı kateter kolonizasyonunu gösterir. Bu yöntemle ekstraluminal ve distal kolonizasyon saptanabilirken, biyofilm tabakası içinde sıkıca tutunmuş mikroorganizmalar saptanamayabilir. Biyofilmler en iyi kateter sonifikasyonu veya vorteksleme gibi biyofilm tabakası içindeki mikroorganizmaların salınımına yol açan mekanik yöntemlerle incelenir. Biyofilmdeki bakterilerin tespiti için kantitatif kültür yöntemleri ($\geq 10^3$ cfu/kateter segmenti) geliştirilmiştir. Moleküler yöntemlerle kateterlerin iç ve dış bölgesiyle biyofilm içindeki mikroorganizmalar daha duyarlı olarak saptanabilir. Kültür ve kültürden bağımsız teknikler, biyofilmdeki mikroorganizmalar ile planktonik mikroorganizmaları ayıramadığı için biyofilm tanısı matrikste lokalize olmuş mikrobiyal agregatların mikroskopik incelemesine dayanır. İdeal olan; mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi, kültürün kantitatif veya semi-kantitatif olmasıdır. Bununla birlikte, normal floradan kontamine olan ve infekte eden mikroorganizmaları ayırt etmek için kültürde üreyen mikroorganizmanın tür düzeyinde tanımlanması gerekir. Mikroskopik inceleme rutin ışık mikroskopi ve rutin boyama yöntemleri (örneğin; Gram boyaması) ile yapılabilir. Eş odaklı lazer tarayıcı mikroskop ve tarayıcı elektron mikroskop betkeni dokuda göstermede en uygun cihazlar olmasına karşın rutin laboratuvarlarda bulunmamaktadır (130).

Kistik fibrozlu hastaların biyofilm infeksiyonlarının tanısında; bu hastaların üst ve alt solunum yollarında kolonizasyon ve infeksiyonun sık görülmesi nedeniyle olguların yakın aralıklarla takibi önemlidir. Özellikle *P. aeruginosa* infeksiyonunun erken dönemde saptanarak eradike edilmesi hastaların yaşam süresinin uzamasına katkı sağlamaktadır. Tanıda;

orofaringeal sürüntü ve balgam, bronş lavajı, bronkoalveolar lavaj (BAL), akciğer doku örnekleri ve paranazal sinüslerden alınan mukus örneği kullanılabilir. Hava yollarından alınan örnekler mikroskopik incelemeyle (ışık mikroskopisi ve/veya FISH mikroskopisi) değerlendirilmelidir. Mikroskopide küçük kümeler içeren ve nötrofille çevrili biyofilm yapısı görülmesi tanıda önemlidir. *P. aeruginosa*'ya bağlı biyofilm infeksiyonunda, alınan örneğin kültüründe agar plaklarda mukoid yapıda büyük ya da non-mukoid yapıda küçük kümeler gözle görülebilmektedir (132). Tanıda serum örnekleri de kullanılabilir. Örneğin; *P. aeruginosa* antijenlerine karşı (protein, lipopolisakarid ve aljinat) IgG sınıfı antikor yanıtı gösterilebilir. *P. aeruginosa*'nın vücutta ilk olarak üst solunum yollarına kolonize olması nedeniyle, tükürük ve paranazal sinüsten alınan sekresyonlarda protein ve aljinat antijenine karşı salgılanan sIgA antikor düzeyi bakılabilir (133). Diğer biyofilm infeksiyonlarının tanısında da IgG antikor cevabı kullanılmaktadır. Daha yakın zamanlarda benzer numunelerde moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik bakteriyel DNA ve/veya RNA aramak için özel proplar kullanır, kültüre bağlı değildir (134).

Kronik yara infeksiyonu olan hastaların biyofilm infeksiyonlarının tanısında; doku biyopsisi almak en güvenilir yöntemdir. Yara yüzeyinden sürüntü kültürü alınması önerilmez; biyofilm içerisindeki bakterilerin yerleşimi göz önünde bulundurulduğunda derin doku kültürü gereklidir. Alınan doku örneğinin ezilmesi ve doku homojenizasyonunun sağlanması biyofilmin saptama olasılığını artırır. Biyofilm formasyonu canlı ve küçük, dokularda 4-200 µm; yabancı yüzeylerde 5-1200 µm boyutlarında görülür.

Ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP)'li hastaların biyofilm infeksiyonlarının tanısında; mekanik ventilasyon altındaki hastalarda intübasyondan hemen sonra endotrakeal tüp polimikrobiyal biyofilm oluşturan mikroorganizmalar tarafından kolonize olur. Endotrakeal tüplerdeki biyofilmlerde ve VİP'li hastaların alt solunum yolu örneklerinde üreyen mikroorganizmaların %56-70'sinin aynı popülasyonu yansıttığının gösterilmesi önemli bir bulgudur (135,136).

2.2.4.2 Biyofilm Saptama Yöntemleri

Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikropalak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitesinin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemlerin yanı sıra floresan mikroskopisi, lazer taramalı konfokal mikroskopisi ve elektron mikroskopisinin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur (137,138).

2.2.4.3 Biyofilm İnfeksiyonlarının Tedavisinde Uygun Antibiyotik Stratejileri

Kistik fibrozlu hastaların tedavisinde, üç ayda bir düzenli olarak veya akut alevlenmelerde inhaler ve sistemik antibiyotiklerle kronik baskılayıcı tedavinin uygulanması gerekir. Sistemik olarak uygulanan antibiyotiklerle akciğerlerde planktonik bakterileri öldürecek yeterli konsantrasyona ulaşılırken; biyofilm içerisindeki bakterileri öldürecek yeterli konsantrasyona ulaşamaz. Bununla birlikte, bronşlar gibi iletici hava yollarında düşük konsantrasyonlar elde edilmektedir. Diğer taraftan, inhalasyon yoluyla uygulanan antibiyotiklerle akciğerlerin iletici hava yollarında çok yüksek konsantrasyonlar elde edilirken; alveollerde düşük konsantrasyonlar elde edilir. Dolayısıyla, sistemik ve inhaler antibiyotiklerin birlikte kullanılması, akciğerlerin hem gaz değişimi olan bölgelerinde hem de iletici hava yollarında yeterli antibiyotik konsantrasyonunu sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır (130, 139). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalara karşı antibiyotiklerin farmakokinetiği ve farmakodinamiğiyle ilgili bilgiler sadece hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, biyofilm oluşturan ve planktonik *P. aeruginosa* suşlarına karşı β -laktam antibiyotiklerin zamana-bağımlı; siprofloksasin, kolistin ve tobramisinin doza-bağımlı etkili oldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte, biyofilm oluşturan suşlarda ihtiyaç duyulan antibiyotik konsantrasyonlarının, zamana-bağımlı öldürme beklenen antibiyotiklerde bile çok yüksek olduğu gösterilmiştir (140,141).

Kronik yara infeksiyonu olan hastalarda antibiyotik kullanım endikasyonunun dikkatlice verilmesi gerekir. Tüm hastaların debridman, kompresyon, vakum tedavisi gibi antibiyotik dışı stratejilere ihtiyacı vardır. Eğer tedavi indikasyonu varsa, farklı etki mekanizmalarına sahip, sistemik antibiyotik tedavisiyle birlikte dezenfektanlarla lokal tedavi gibi, kombinasyon tedavileri daha etkili olabilir. Debridman mantıklı görünse de bunu destekleyen kanıtlar azdır. Literatürde diyabetik ayak ülserlerinde debridmanın, venöz ve basınç ülserlerine göre etkinliği hakkında daha fazla kanıt vardır. Kronik yaralar için cerrahi tedavi protokollerinde debridmanın dahil edilmesine ilişkin klinik kanıt sağlamada ek çalışmalara ihtiyaç vardır (142). Debridmandan sonra, topikal antimikrobiyal ajanlar, infekte yaranın tedavisinde ve biyofilmin yeniden oluşumunun önlenmesinde daha etkili olabilir (143). Negatif basınçlı yara tedavisi, kronik yaralardaki bakteriyel yükü azaltabilir ve biyofilm oluşumunu önleyebilir (130).

Ortopedik cihazla ilişkili infeksiyonlara yaklaşımda zamanlama kritik öneme sahiptir. Bu zamanlama semptomların başlamasından 3 hafta (hematojen infeksiyonlar) veya protez takıldıktan 4 hafta sonradır (perioperatif infeksiyon). Bu şekilde akut infeksiyon tablosuyla

gelen hastalarda debridman, protezin yerinde bırakılması ve uzun süreli antibiyotik tedavisi stratejisiyle tedavide en az %85 oranda başarı sağlanır. Bu yüksek kür oranının sağlanması için stafilokoklara karşı rifampisin, Gram-negatif çomaklara karşı florokinolonlar gibi biyofilme etkili aktif tedavi gereklidir (144). Kronik infeksiyonlarda ise tam debridmandan sonra protez değiştirilmelidir. Tüm yabancı materyaller çıkarılırsa biyofilme etkili antibiyotik kullanımına gerek yoktur (130).

İV kateteri olan hastalarda oluşmuş biyofilmi ortadan kaldırmak için uygulanan antibiyotik kilit tedavisinin süresi yedi ila ondört gün arasında olmalıdır (145-147). Spesifik antimikrobiyal ajanların tercihine ilişkin çok az veri vardır. Kateter çıkarılamayacaksa sistemik antibiyotikler, mutlaka kilit tedavisiyle birlikte uygulanmalıdır. Kilit tedavisinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonu MİK değerinin 100-1000 katı kadar yüksek olmalı ve antibiyotik kateter lümenine verildikten sonra 12-24 saat boyunca lümen içinde kalmalıdır. Yapılan çalışmalar heparinin antibiyotikle birlikte kullanılmasını desteklememektedir. Bir *in vivo* çalışma, heparinin kilit tedavisinde vankomisin veya siprofloksasinin etkinliğini artırmadığını göstermiştir (148).

2.2.4.4 Antibiyofilm Stratejiler

Antibiyofilm stratejiler, doğrudan biyofilm üzerine etkili olabildiği gibi, biyofilm oluşumunu engelleyerek de etkili olabilir. QS inhibitörleri, antiadhesinler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, antimikrobiyal peptidler biyofilm oluşumunu engelleyen stratejiler arasında yer alırken; antibiyotikler, bakteriyofajlar, nanopartikül uygulamaları, enzimler ve antiseptikler oluşmuş biyofilm üzerine etkili stratejiler arasında yer almaktadır (149). Günümüzde biyofilm oluşumu, infeksiyonların tedavisinde başarısızlığın en önemli nedenidir. Bu kadar önemli bir sorun olmasına karşın halen etkin bir tedavi stratejisi geliştirilememiştir.

Antibiyotikler: Hem biyofilm oluşumunu önlemede hem de doğrudan biyofilm üzerinde etkili olabilirler. Cerrahiyle ilişkili biyofilm infeksiyonları profilaktik antibiyotik uygulamasıyla önlenabilir. Dolayısıyla bahsedilen infeksiyonların insidansı azalır (150). Kalıcı idrar sondası veya üretral stenti olan hastalarda kısa süreli sistemik antibiyotik tedavisi biyofilm infeksiyonlarının oluşumunu iki hafta kadar geciktirebilir (151). Bununla birlikte, dirençli suşların süperinfeksiyonu ile ilgili endişeler nedeniyle bu hastalara antibiyotik profilaksisi önerilmez. Kateteri olan hastalarda kateterle ilişkili kan dolaşımı infeksiyonu, mekanik ventilasyonla takip edilen hastalarda endotrakeal tüp biyofilmiyle ilişkili VİP oluşumunu önlemek için sistemik antibiyotik önerilmez.

Sistemik antibiyotiklerin planktonik hücreler üzerine etkili oldukları bilinmesine karşın, biyofilmin altında yer alan sesil bakteriler üzerine etkili olmadıkları bilinmektedir. Vankomisin biyofilm üzerine etkili olmasına karşın, biyofilm altındaki bakteriye etkili olamamaktadır (152,153). Rifampisin matür biyofilmi bozduğuna dair bulgular biyofilm infeksiyonlarının tedavisinde yer almasını sağlamıştır (154). Daptomisin, tigesiklin ve minosiklinle yapılan bazı çalışmalarda ise biyofilm ve biyofilm altında yer alan MRSA'ya karşı etkinliği belirlenmiştir (155). Son yıllarda Öztürk ve arkadaşları (153), daptomisin biyofilmi eradike edici etkisinin olmayıp biyofilm altındaki mikroorganizmaları öldürücü etkinliğe sahip olduğunu; tigesiklinin ise hem biyofilmi eradike edici hem de biyofilm altındaki mikroorganizmaları öldürücü etkinlikte olduğunu göstermişlerdir. Antibiyotiklerin biyofilm eradike edici etkinliğini artırıcı farklı kombinasyonlar veya konjugasyonlar günümüzde yoğun olarak çalışılmaktadır. NAC ve rifampisin kateterle ilişkili infeksiyonlarda birlikte kullanıldığında, sinerjistik etki göstererek dört saat içerisinde biyofilm altındaki mikroorganizmayı eradike ettiği saptanmıştır.

Enzimler ve Antiseptikler: Klinik çalışmalarda infekte eklemlere serratiopeptidaz injeksiyonu sonrasında antibiyotik uygulandığında sadece antibiyotik uygulanan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir iyileşme olduğu gözlenmiştir (156). Hipokloröz asid güçlü indirgeyici özelliğiyle biyofilmin hem oluşumunu engellemekte hem de matür formunu bozabilmekte ve biyofilm altındaki bakterileri öldürmektedir (157).

Diğer: Bakteriyofajlar, antibakteriyel ve antibiyofilm tedavi stratejileri için ümit vericidir. Yapılan çalışmalarda bakteriyofajların matür biyofilmi parçalayabildiği gösterilmiştir (158). Günümüzde nanopartikül uygulamaları konusunda çalışılmaktadır. Bu çalışmalardan bir kısmı biyofilm içinde antibiyotiklerin taşınmasını sağlayan nanopartikül konjuge antibiyotik teknolojisi olup yapılan çalışmalar umut vericidir.

Sonuç olarak; tıpta bugün uyguladığımız geleneksel tedavilerle sağaltıma direnç gösteren bakterilerin varlığı ve yeni dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle klinik olarak yeterli yanıt alınamamaktadır. Gelecekteki tanı, tedavi ve tedavi takip yöntemleri belirlenirken, proaktif bir yaklaşımla biyofilm oluşmadan önceki süreç ve koşullar göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik infeksiyonların etkeni olan biyofilm bakterilerinin morfolojisi ve fizyolojisi hakkında daha

ayrıntılı ve özgün bilgi edinildikçe, nanobiyoteknolojideki gelişmelerden de yararlanılarak yeni tanı, tedavi ve tedavi takip süreçleri tanımlanacaktır.

Bizim çalışmamız, biyofilm tabakasına etkili olması beklenen NAC, rifampisin ve ozon gibi antibiyofilm etkinlikli ajanların uygulanmasından sonra tedavide kullanılabilecek antibiyotiklerin etkili olabilmesi, çoklu ilaç direnci olan etkenlerin neden olduğu infeksiyonun tedavi olabirliğini sağlaması, tedavi olanağı sunması ve sonucunda da morbidite ve mortaliteyle ilişkili komplikasyonların azalması için bir umut olması amacıyla yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Bakteri Suşlarının Tanımlanması ve Saklanması

31.08.2018 ve 31.02.2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan, alınan örneklerde invazif infeksiyon oluşturmuş panrezistan *K. pneumoniae* izolatu üreyen, >18 yaş üstü hastalar çalışmaya kabul edildi. Dokuz adet panrezistan *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı.

K. pneumoniae izolatları mikrobiyolojik olarak klasik yöntemlerle ve Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostic Systems, MD, ABD) ile tanımlandı. Klasik yöntemle, laktoz-pozitif kolonilerin etken olduğu izolatlar, üreaz, sitrat, üç şekerli besiyeri (TSI) besiyeri ve hareket ve indol reaksiyonu için kullanılan indol ornitin hareket besiyerlerine (MIO) ekilerek tanımlandı. Buna göre fermentatif, üreaz-negatif, indol-negatif, sitrat-pozitif ve hareketsiz olan bakteriler *K. pneumoniae* olarak adlandırıldı. *K. pneumoniae* adı konan izolatların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Disk difüzyon yöntemiyle dirençli olduğu saptanan izolatların MİK değerleri gradyan testi (Etest®) ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Panrezistan olan suşlar çalışmaya alındı.

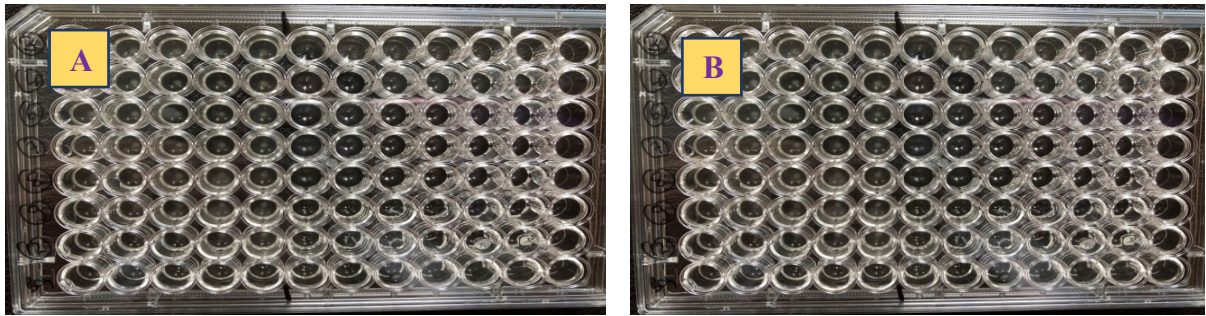
3.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

K. pneumoniae izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, gradyan testi veya sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Kolistin ve tigesiklinin MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle; meropenem, imipenem, ertapenem, amikasin, gentamisin, seftriakson, siprofloksasinin MİK değerleri gradyan testiyle belirlendi. MİK değerleri, meropenem >8 mg/lt, ertapenem >0.5 mg/lt, kolistin >2 mg/lt, gentamisin >4 mg/lt, amikasin >16 mg/lt, siprofloksasin >0.5 mg/lt, seftriakson >2 mg/lt olanlar, o antibiyotiğe dirençli olarak kabul edildi. Çalışmanın standardizasyonu amacıyla kalite kontrol suşları olarak

P. aeruginosa ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922, NCTC *E. coli* 13846 (*mcr-1* pozitif), *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır.

3.2.1 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Doksanaltı kuyucuklu U tabanlı mikropalakların her kuyucuğuna 0.1 ml katyon ilaveli Mueller-Hinton broth (MHB) konuldu. İlk kuyucuğa başlanmak istenen antibiyotik konsantrasyonunun iki katı konsantrasyonda hazırlanmış antibiyotik çözeltisinden 0.1 ml eklendi. İlk kuyuda elde edilen 0.2 ml hacimdeki karışımdan (0.1 ml MHB + 0.1 ml antibiyotik çözeltisi) steril pipet uçlarıyla 0.1 ml alınarak diğer kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem son kuyucuğa kadar tekrarlanarak 0.1 ml'lik seri dilüsyonlar elde edildi. Son kuyucuktaki karışım işleminden sonra pipet ucunda kalan 0.1 ml çözelti dışarı atıldı ve son kuyuda da 0.1 ml çözelti olması sağlandı. İlk kuyudaki antibiyotik konsantrasyonu 512 µl olacak şekilde ilk kuyuya 0.1 ml MHB ve 0.1 ml 1024 µl antibiyotik çözeltisi konuldu. Antibiyotik konsantrasyonlarının 512 µl, 256 µl, 128 µl, 64 µl, 32 µl, 16 µl, 8 µl, 4 µl, 2 µl, 1 µl, 0.5 µl, 0.25 µl, 0.125 µl, 0.006 µl, 0.03 µl, 0.016 µl, 0.008 µl olacak şekilde seri dilüsyonları oluşturuldu. Yaklaşık 18-24 saatlik inkübasyon sonunda kanlı agarda saf kültür halinde üretilen *K. pneumoniae* kolonileri alınarak 5 ml katyon ilaveli MHB içeren tüplerde homojenize edilerek 0.5 McFarland standardı (1×10^8 kob/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonları elde edildi. Daha sonra bu bakteri süspansiyonları 1:10 oranında dilüe edildi ve her kuyucuğa 10 µl bakteri süspansiyonu (1×10^6 cfu/ml) eklenerek mikropalak 37°C'de 16-20 saat inkübe edildi. Çıplak gözle kuyucuklardaki üremenin tamamını inhibe ettiği görülebilen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi (159).



Resim 1. A, B: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tigesiklin MİK değerlerinin saptanması.

3.2.2 Gradyan testi

Bu test amacıyla gradyan testi stripleri kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda Mueller-Hinton agar besiyerine (MHA, Biolife, Milan, İtalya) test edilecek kökenlerin 0.5

McFarland Standardı bulanıklığında hazırlanan süspansiyonu ekildi. 16-20 saat $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de yapılan inkübasyon neticesinde strip üzerinde oluşan inhibisyon elipsinin test stribiyle kesiştiği en yüksek ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenerek EUCAST ölçütlerine göre yorumlanmıştır.

3.3 Bakterilerin Antibiyotik Direnci Tanımlaması

Gram-negatif enterik çomaklarda antibiyotik direnci tanımı için aşağıdaki sınıflama kullanıldı: [1] çoğul antibiyotik dirençli (“multi-drug resistant”, MDR); [2] yaygın antibiyotik dirençli (“extremely drug resistant”, XDR); [3] tüm antibiyotiklere dirençli (“pan-drug resistant”, PDR).

Üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana dirençli olan bakteriler MDR olarak, tüm antimikrobiyal kategorilerden en fazla iki antimikrobiyal kategoriye duyarlı olup diğer kategorilerden en az bir ajana dirençli bakteriler XDR olarak ve tüm antimikrobiyal kategorilerde tüm ajanlara dirençli ajanlar PDR olarak tanımlandı (160).

3.3.1 Karbapeneme Dirençli Suşların Saptanması

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle EUCAST ölçütlerine göre *K. pneumoniae* için imipenem <17 mm, meropenem <16 mm, ertapenem <25 mm zon çapı gösteren suşlarda karbapenem direnci düşünüldü. Karbapenem direncinin doğrulaması, gradyan testi yöntemiyle *K. pneumoniae* için meropenem MİK değerinin >8 mg/lt, imipenem MİK değerinin >4 mg/lt ve ertapenem MİK değerinin >0.5 mg/lt olarak ölçülmesiyle yapıldı (161).

3.3.1.1 Karbapenemaz Varlığının Moleküler Yöntemle Saptanması

Karbapenem direnci, EUCAST'in önerdiği şekilde disk difüzyon testinde meropenem zon çapının <28 mm olmasıyla tanımlanan suşlarda karbapenemaz varlığı bla_{OXA-48}, bla_{NDM-1}, bla_{VIM}, bla_{IMI}, bla_{KPC} genleri “In-house PZR” yöntemi kullanılarak belirlendi (162,163).

3.3.2 Kolistine Dirençli Suşların Saptanması

Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle *K. pneumoniae* için EUCAST ölçütlerine göre kolistin MİK değeri >2 mg/lt bulunan suşlar kolistine dirençli olarak kabul edildi (161).

3.3.3 Aminoglikozidlere Dirençli Suşların Saptanması

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle EUCAST ölçütlerine göre *K. pneumoniae* için amikasin <15 mm, gentamisin <14 mm zon çapı gösteren suşlarda aminoglikozid direnci

düşünüldü. Direncin doğrulaması, gradyan testi yöntemiyle *K. pneumoniae* için amikasin MİK değerinin >16 mg/lt ve gentamisin MİK değerinin >4 mg/lt olarak ölçülmesiyle yapıldı (161).

3.3.4 Sefalosporinlere Dirençli Suşların Saptanması

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle EUCAST ölçütlerine göre *K. pneumoniae* için seftriakson <22 mm zon çapı gösteren suşlarda sefalosporin direnci düşünüldü. Direncin doğrulaması, gradyan testi yöntemiyle *K. pneumoniae* için seftriakson MİK değerinin >2 mg/lt olarak ölçülmesiyle yapıldı (161).

3.3.5 Florokinolonlara Dirençli Suşların Saptanması

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle EUCAST ölçütlerine göre *K. pneumoniae* için siprofloksasin <22 mm, moksifloksasin <22 mm zon çapı gösteren suşlarda florokinolon direnci düşünüldü. Direncin doğrulaması, gradyan testi yöntemiyle *K. pneumoniae* için siprofloksasin MİK değerinin >0.5 mg/lt, moksifloksasin MİK değerinin >0.25 mg/lt olarak ölçülmesiyle yapıldı (161).

İzole edilen suşlar %10 gliserinli “Tryptic Soy broth” (TSB) içinde -70°C’de saklandı.

3.4 Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Bakterilerin biyofilm oluşturup oluşturmadıklarının araştırılması için mikropakta kristal viyole boyası kullanıldı (164). Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları; negatif kontrol için ise %1 glukoz içeren TSB kullanıldı (165). Yönteme göre kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *K. pneumoniae* suşlarının saf kültürleri alınarak 5 ml TSB içeren tüplere ekim yapıldı ve tüpler 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün bakteri süspansiyonu 5 ml hacimde %1 glukoz içeren TSB ile 1:50 oranında sulandırıldı ve doksanaltı kuyucuklu U tabanlı hücre kültürü mikropoğunun her kuyucuğuna 200’er µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bakteri için ikişer kuyucuk kullanıldı. Mikropak 37°C’de 18-24 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp pH’ı 7.2 olan fosfat tamponlu tuzlu su (“phosphate buffered saline”, PBS) çözeltisiyle üç kez yıkandı. Daha sonra mikropak, kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Her kuyucuğa 200 µl %99’luk metanol konulduktan sonra 15 dakika bekletilerek fiksasyon yapıldı. Bu işlemin ardından mikropak boşaltılıp tekrar oda sıcaklığında kurutuldu. Ardından kuyucuklara 200 µl %1’lik kristal viyole solüsyonu konuldu. 15 dakika sonra kuyucuklar çeşme suyuyla yıkanıp kuruması için bekletildi. Daha sonra yüzeye yapışan hücrelere bağlanan boya 200 µl %95 etanolla çözündürüldü ve kuyucuklardaki çözeltilerin optik dansiteleri 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Negatif kontrolün

üzerindeki değerler biyofilm-pozitif, negatif kontrole eşit veya altındaki değerler ise biyofilm-negatif olarak değerlendirildi (166).

3.4.1 İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Sınıflandırılması

Spektrofotometreyle 595 nm dalga boyunda, kuyucukların optik dansite ölçümü yapıldıktan sonra izolatların biyofilm oluşturma kapasitesi pozitif kontrol için kullanılan *E. coli* ATCC 25922'nin ve negatif kontrol için kullanılan %1 glukoz içeren TSB'nin optik dansitesi (OD) ile karşılaştırıldı. Biyofilm oluşturma kapasitelerine göre 4 grupta sınıflandırıldı:

Tablo 3. Pozitif Kontrole (*E. coli* ATCC 25922) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Sınıflandırılması (167)

Biyofilm Oluşturma, %	Sınıflandırma
<25	Biyofilm oluşturmeyenler
25-50	Zayıf derecede biyofilm oluşturanlar
51-75	Orta derecede biyofilm oluşturanlar
76-100	Yüksek derecede biyofilm oluşturanlar

Tablo 4. Negatif Kontrole (Steril TSB) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Sınıflandırılması (168)

Biyofilm Oluşturma	Sınıflandırma
$OD \leq OD_{\text{kontrol}}$	Biyofilm oluşturmeyenler
$OD_{\text{kontrol}} < OD < 2 \times OD_{\text{kontrol}}$	Zayıf derecede biyofilm oluşturanlar
$2 \times OD_{\text{kontrol}} < OD < 4 \times OD_{\text{kontrol}}$	Orta derecede biyofilm oluşturanlar
$4 \times OD_{\text{kontrol}} < OD$	Yüksek derecede biyofilm oluşturanlar

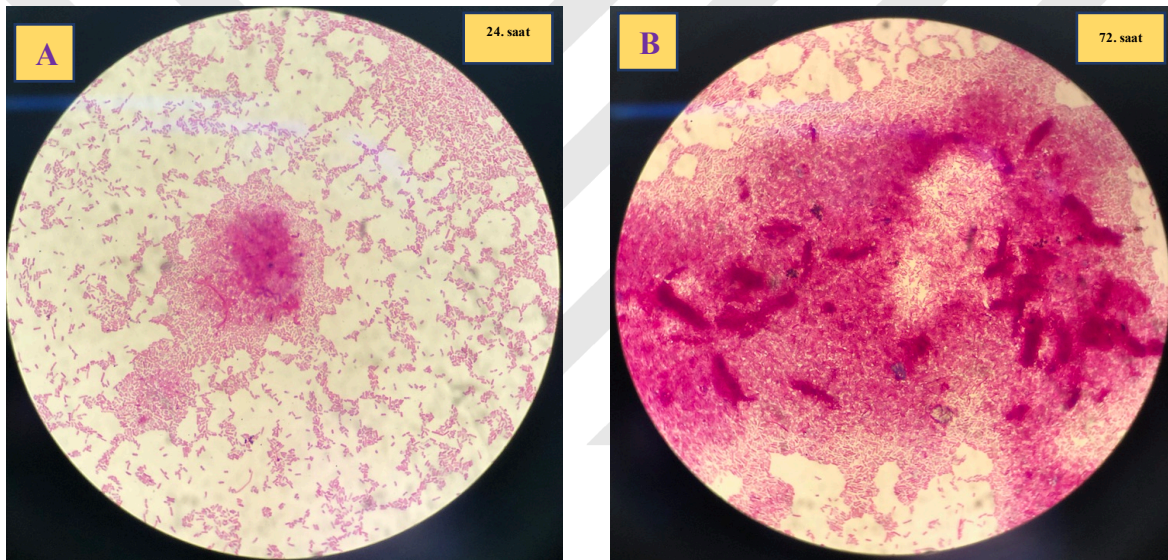
OD: Optik dansite.

3.4.2 Biyofilm Oluşumunun Boyama Yöntemleriyle Gösterilmesi

Kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *K. pneumoniae* suşlarının saf kültürlerinden 2-3 adet koloni alınarak 5 ml TSB içeren tüplerde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan 2'şer ml alınarak steril bir lamel içeren petri kutularına dağıtıldı. Petri kutuları 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra lamele depolanan biyofilmin ışık mikroskopisinde 0. saat, 24. saat ve 72. saatteki görünümleri değerlendirildi. Lamele depolanan biyofilm steril PBS ile yavaş şekilde 3 kez yıkandı. Daha sonra lamellerin kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Petri

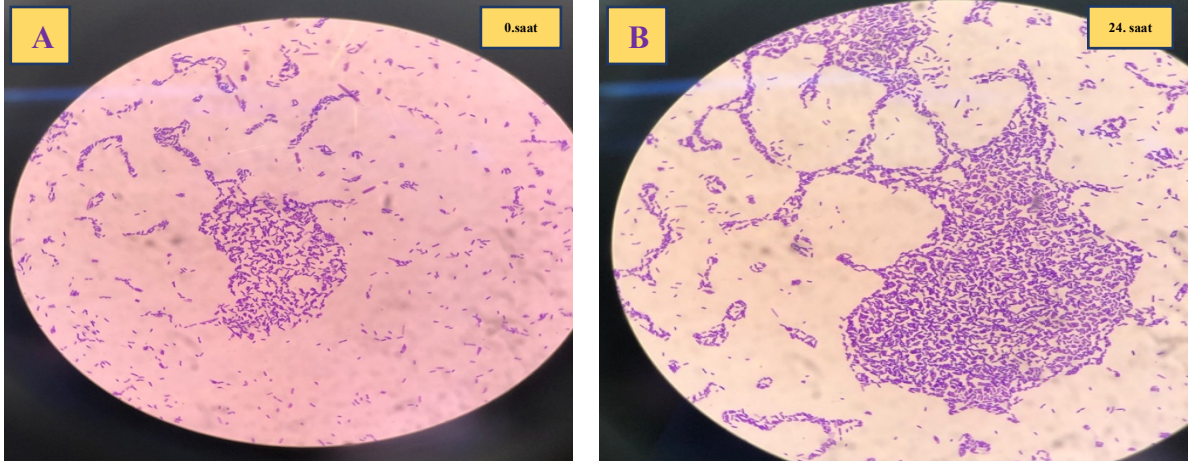
kutularının içerisindeki lamelin üzerini örtecek şekilde 200 µl %99'luk metanol konulduktan sonra 15 dakika bekletilerek fiksasyon yapıldı. Bu işlemin ardından petri kutuları boşaltılıp tekrar oda sıcaklığında kurutuldu. Boyama yöntemlerine göre;

Gram Boyaması Yöntemi: Lamelin üzerine kristal viyole solüsyonu eklenerek kaplandı ve bir dakika bekletildi. Preparat bol distile suyla yıkandıktan sonra lugol solüsyonu eklenerek kaplandı ve bir dakika bekletildi. Preparat bol distile suyla yıkandıktan sonra %95'lik etanol eklendi ve 10-15 saniye beklendi. Sonrasında preparat bol distile suyla yeniden yıkandı, sulu fuksin solüsyonu eklenerek kaplandı ve 30 saniye beklendi. Son aşamada bol distile suyla yıkandı ve havada kurutuldu. Biyofilm oluşumunun 24. ve 72. saatte ışık mikroskopundaki görünüşleri fotoğraflandı.

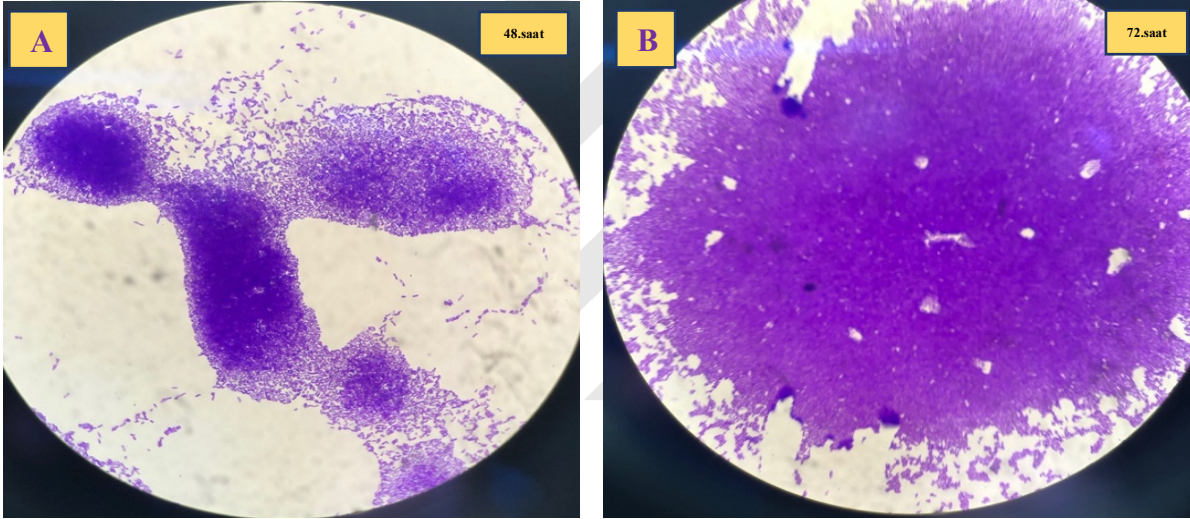


Resim 2. A: Biyofilm oluşuktan 24 saat sonraki biyofilmin yapısının ışık mikroskopunda Gram boyaması yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluşuktan 72 saat sonraki biyofilmin yapısının ışık mikroskopunda Gram boyaması yöntemiyle gösterilmesi.

Kristal Viyole Boyama Yöntemi: Petrilere 200 µl %1'lik kristal viyole solüsyonu konuldu. 15 dakika sonra lameller çeşme suyuyla yıkanıp kuruması için bekletildi. Biyofilm oluşumunun 0. saat, 24. saat ve 72. saatteki ışık mikroskopundaki görünüşleri fotoğraflandı.

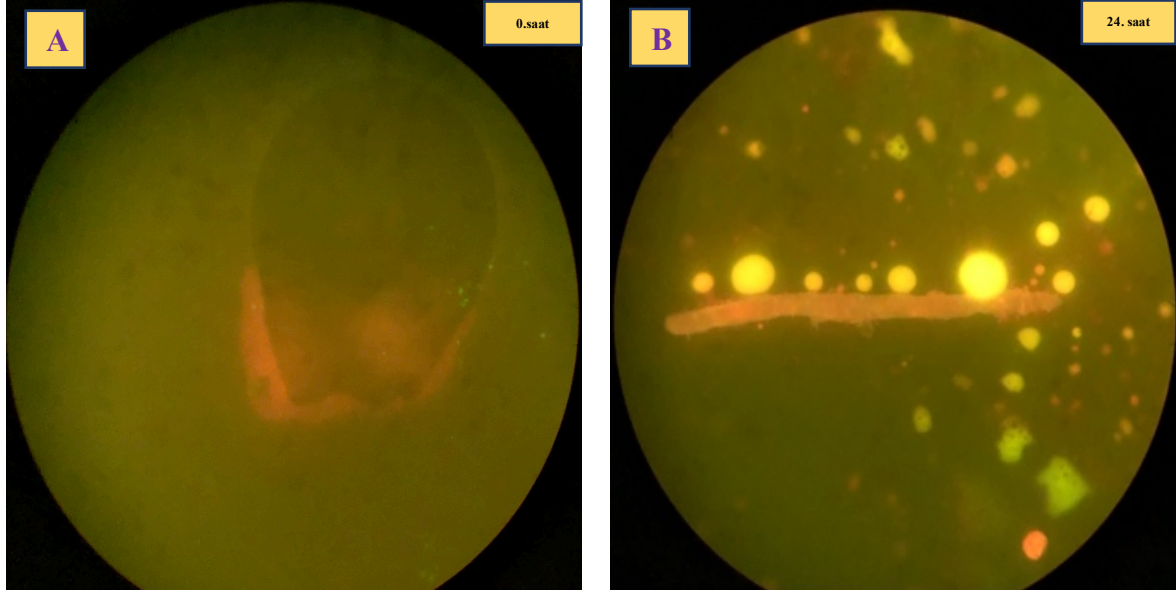


Resim 3. **A:** Bazal biyofilm oluşumunun (0. saat) ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluşuktan 24 sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi.



Resim 4. **A:** Biyofilm oluşuktan 48 saat sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi **B:** Biyofilm oluşuktan 72 saat sonraki biyofilm yapısının ışık mikroskobunda kristal viyole boyama yöntemiyle gösterilmesi.

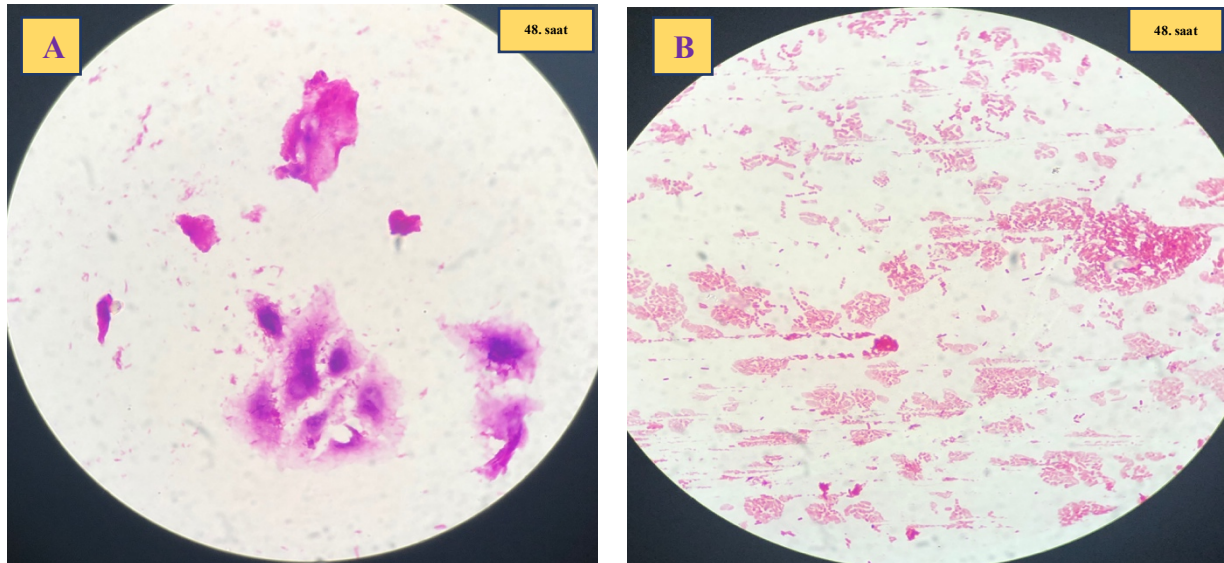
Kalkoflor Beyazıyla İmmünofloresan İnceleme: Preparatlar kalkoflor beyazıyla boyandıktan sonra biyofilm oluşumunun 0. ve 24. saatteki floresan mikroskopundaki görünümleri fotoğraflandı.



Resim 5. A: Bazal biyofilm oluşumunun (0. saat) kalkoflor beyazıyla immüofloresan incelemesi, **B:** Biyofilm oluşuktan 24 saat sonraki biyofilm yapısının kalkoflor beyazıyla immüofloresan incelemesi.

3.4.3 Hücre Kültüründe Hücre içi Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi

Kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *K. pneumoniae* suşlarının saf kültürlerinden 2-3 adet koloni alınarak 5 ml TSB içeren tüplerde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan 2'er ml alınarak akciğer kanser hücreleriyle hazırlanan tek tabaka hücre kültürü plaklarına dağıtıldı. Gram boyaması yönteminde anlatılan aşamalar uygulandıktan sonra tek tabaka hücre kültürlerinde bakterilerin hücre içerisinde biyofilm oluşturup oluşturmadıkları fotoğraflandı.



Resim 6. A, B: Tek tabaka hücre kültürüne ekildikten sonraki 48. saatte “Hücre içi biyofilm benzeri topluluk” oluşturma yeteneğinin Gram boyaması yöntemiyle incelenmesi.

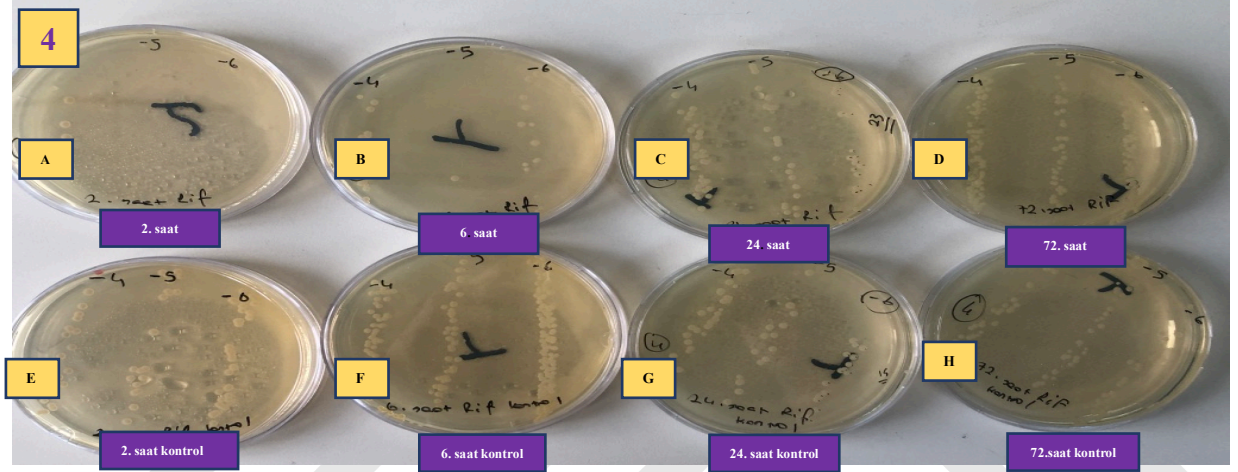
3.4.4 Biyofilm Tabakası Üzerine NAC, Rifampisin ve Ozonun (0.6 µg/ml) Etkinliğinin Araştırılması

Kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *K. pneumoniae* suşlarının saf kültürleri alınarak 5 ml TSB içeren tüplere 0.5 Mcfarland Standardı bulanıklığında süspansiyon elde edecek şekilde ekim yapıldı. Tüpler 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün bakteri süspansiyonu 5 ml hacimde %1 glukoz içeren TSB ile 1:50 oranında dilüe edildi. Doksanaltı kuyucuklu U tabanlı hücre kültürü mikroplağının her kuyucuğuna 200’er µl dağıtıldı. Her bakteri için ikişer kuyucuk ve incelenecek her saat için ayrı mikropalak kullanıldı. Mikropalak 37°C’de 18-24 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp PBS çözeltisiyle üç kez yıkandı. Daha sonra mikropalaklar, kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşama bazal biyofilm oluşumu (0. saat) olarak değerlendirildi. Bazal biyofilmler değerlendirildikten sonra 2. saat, 6. saat, 24. saat, 72. saat incelemesi için hazırlanan mikropalaklarda her kuyucuğa %1 glukoz içeren TSB 200’er µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bakteri için hazırlanan ikişer kuyucuktan birine olacak şekilde her bir antibiyofilm uygulaması için ayrı hazırlanan mikropalaklara son konsantrasyonlar belirtildiği gibi olacak şekilde antibiyofilm etkinlikli NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg/ml) ve ozonlu sudan (0.6 µg/ml) 10’ar µl eklendi. Diğer kuyucuk bakterinin o saatteki kontrolü olarak kabul edildi. Belirlenen zamanların sonunda kuyucukların içi boşaltılıp PBS çözeltisiyle üç kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 200 µl PBS konuldu. Kuyu dipleri steril pipet ucuyla kazındı ve mikropalaklara 10 dakika banyo sonikatörde sonifikasyon işlemi yapıldı (Resim 9B). NAC ve rifampisin uygulananlarda sonifikasyon öncesi ve sonrasında spektrofotometreyle 595 nm dalga boyunda, kuyucukların optik dansite ölçümü yapıldı. Daha sonra tüm kuyulardan dilüsyonlar (-4,-5,-6) yapılarak “Tryptic soy agar” (TSA)’a ekim yapıldı. Besiyerleri 18-20 saat inkübe edildikten sonra üreyen kolonilerin sayım işlemi yapıldı. Koloni sayısında kontrol grubuna göre 2 log₁₀ ve üzeri azalma olup olmamasına göre NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm tabakasına etkili olup olmadığı değerlendirildi.

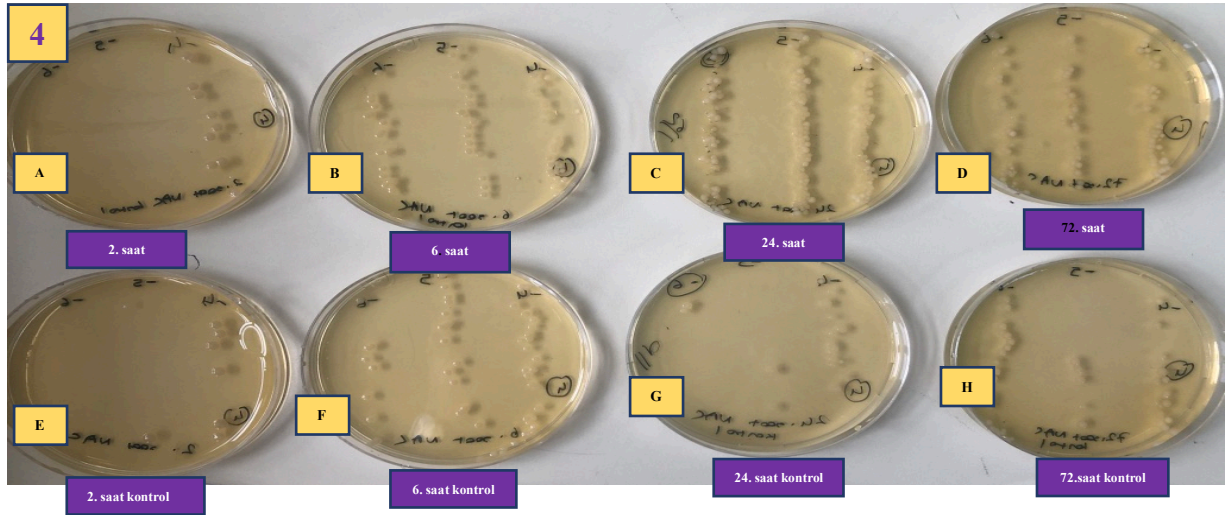
3.4.5 Biyofilm Tabakası Üzerine Ozonun (4.78 µg/ml) Etkisi

Yüksek oranda ozon konsantrasyonu elde edebilmek için NAC ve rifampisin uygulamasında anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan daha fazla miktarda (1’er ml) alınarak her bir bakteri için ayrı hazırlanan 20 adet 6’lı hücre kültürü plağına dağıtıldı. Plaklar 37 °C’de 18-24 saat inkübe edildikten sonra plakların içindeki sıvı besiyeri boşaltılıp PBS çözeltisiyle üç kez yıkandı. Bu aşama bazal biyofilm oluşumu (0. saat) olarak değerlendirildi. Ozon cihazında (Longevity Resources, BC, Kanada) oksijen regülatörünü 0.12 hızına ayarlayıp 40 gamada 10 dakika tutarak distile suda ozon çözeltisi hazırlandı (Resim 9A).

Sonrasında ozon analizör cihazında ölçerek son konsantrasyon 4.78 µg/ml olacak şekilde ozonlu su elde edildi ve her bakteri için hazırlanan ikişer plaktan birine olacak şekilde 1'er ml dağıtıldı. Ozon çözeltilisinin eklenmediği diğer plak bakterinin o saatteki kontrolü olarak kabul edildi. Ozon çözeltilisinin eklendiği plaklar 10 dakika sonra boşaltıldı. Biyofilmlerin 2. saat, 6. saat, 24. saat, 72. saat incelemesi için hazırlanan tüm plaklara %1 glukoz içeren TSB 1'er ml olacak şekilde dağıtıldı. Belirlenen zamanların sonunda NAC ve rifampisin uygulamasındaki aşamalar uygulanarak ozonlu suyun son konsantrasyonu 4.78 µg/ml olduğunda koloni sayısında kontrol grubuna göre 2 log₁₀ ve üzeri azalma olup olmadığı değerlendirildi.



Resim 7. Biyofilm oluşturduktan sonra rifampisin'in 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin saptanması için koloni sayma yöntemiyle TSA besiyerlerinde koloni sayıları; örneğin 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin (0.1µg/ml) içeren ve rifampisin içermeyen besiyerlerindeki koloni görüntüleri **A-D:** Rifampisin içeren besiyerleri, **E-H:** Rifampisin içermeyen besiyerleri.



Resim 8. Biyofilm oluşturduktan sonra NAC'ın 2., 6., 24. ve 72. saattlerdeki etkilerinin saptanması için koloni sayma yöntemiyle TSA besiyerlerinde koloni sayıları; örneğin 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 mg/lit) içeren ve NAC içermeyen besiyerlerindeki koloni görüntüleri **A-D**: NAC içeren besiyerleri, **E-H**: NAC içermeyen besiyerleri)

3.4.6 Biyofilm Oluşumu ve Antimikrobiyal Ajanların Biyofilm Tabakası Üzerine Etkinliğinin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopisiyle Gösterilmesi

Kanlı agarda üretilen 18-24 saatlik *K. pneumoniae* suşlarının saf kültürleri alınarak 5 ml TSB içeren tüplere 0.5 Mcfarland Standardı bulanıklığında süspansiyon elde edecek şekilde ekim yapıldı. Tüpler, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün bakteri süspansiyonu 5 ml hacimde %1 glukoz içeren TSB ile 1:50 oranında sulandırıldı. Bu bakteri süspansiyonundan 2'şer ml alınarak steril bir yuvarlak lamel içeren her bir bakteri için ayrı hazırlanan 40 adet altılı hücre kültürü plağına dağıtıldı (Her bir antibiyofilm için ikişer tane olacak şekilde; 0. saat, 2. saat, 6. saat, 24. saat itibariyle). Plaklar 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra plakların içindeki sıvı besiyeri boşaltıldı.

Yuvarlak lamelde oluşturulan biyofilm steril PBS ile yavaş şekilde üç kez yıkandı. Bu yolla biyofilmler, serbest formdaki bakterilerden ayrıştırıldı. Bu biyofilm tabakası bazal olarak lazer taramalı konfokal mikroskopisiyle görüntülendi. Bu aşama bazal biyofilm oluşumu (0. saat) olarak değerlendirildi. Bazal biyofilmler değerlendirildikten sonra 2. saat, 6. saat, 24. saat incelemesi için hazırlanan hücre kültürü plaklarına %1 glukoz içeren TSB 2'şer ml olacak şekilde yeniden dağıtıldı. Her bakteri için hazırlanan ikişer plaktan birine olacak şekilde her bir antibiyofilm uygulaması için ayrı hazırlanan hücre kültürü plaklarına antibiyofilm etkinlikli son konsantrasyonları NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg/ml) olacak şekilde solüsyonlarından 100'er µl dağıtıldı. NAC ve rifampisin solüsyonunun eklenmediği diğer plak bakterinin o saatteki kontrolü olarak kabul edildi. Belirlenen zamanların sonunda plaklar tekrar boşaltılıp

PBS çözeltisiyle üç kez yıkandıktan sonra biyofilm tabakasına etkili olup olmadıkları lazer taramalı konfokal mikroskopisi altında değerlendirildi. Mikroskopik incelemeden önce lameller immüno Floresan boyayla boyandı. Canlı, metabolizması aktif hücreleri göstermek için Floresan diasetat (FDA); ölü ve metabolizması yavaşlamış hücreleri göstermek için propidyum iyodür (PI) kullanıldı. Boyalardan FDA; hücre içinde metabolize olduktan sonra Floresansını geliştirir ve hücrede birikir. 490 nm ile uyarıldıktan sonra yeşil ışık yayar. PI ise; yalnızca zarar görmüş bakteri zarlarını geçerek ölü / geri dönüşümlü hasar görmüş hücrelerin içindeki DNA ve RNA'ları boyayıp kırmızı bir Floresan sinyali yayar. FDA/PI 25 / 2.5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ oranında olacak şekilde boyalar hazırlandıktan sonra, boyadan 20 μl 'lik bir hacim alınarak hazırlanan lamel üzerine koyuldu ve boya kurumaması için hemen başka bir lamelle kapatıldı. Numuneler ilk önce oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karanlık bir odada boyama çözeltisi içinde bekletildi (169). Görüntüler lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Leica, TCS SP8 Ted, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) 10x objektif ve 1x büyütme faktörü kullanılarak elde edildi. PI ve FDA boya sırasıyla 532 nm ve 488 nm dalga boyu lazerlerle uyarıldı. Her lamel için üçer kesit fotoğraf çekildi.

Ozonun biyofilm tabakasına etkinliğinin lazer taramalı konfokal mikroskopisiyle gösterilmesinde ozon cihazında son konsantrasyon 4.78 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ozonlu su elde edildi. NAC ve rifampisinde uygulanan şekilde lamelde biyofilm oluşturulduktan sonra 7, 12, 15 numaralı suşlar için hazırlanan ikişer plaktan birine olacak şekilde ozonlu su 1'er ml dağıtıldı. Ozon çözeltisinin eklenmediği diğer plak bakterinin o saatteki kontrolü olarak kabul edildi. Ozon çözeltisinin eklendiği plaklar 10 dakika sonra boşaltıldı. Biyofilmlerin 2. saat, 6. saat, 24. saat incelemesi lazer taramalı konfokal mikroskopuyla yapıldı.



Resim 9. A: Ozon makinesi ve sıvı ozon analizör cihazı, **B:** Sonikasyon cihazı.

3.5 İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics for Windows. Version 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) programı kullanıldı. Sürekli değişkenlerin analizinde, dağılımın normal olması halinde Student'in *t*-testi, dağılımın normal olmaması halinde ise Mann-Whitney *U* testi; Grupların ön ve son test puanları arasındaki farkın anlamlılığı araştırılırken aynı örnekleme ait iki ortalamayı karşılaştıran "Bağımlı İki Örnek *t*-Testi'nin parametrik olmayan" alternatifi olarak Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 15.06.2017 ve 15.07.2018 tarihleri arasında yatan, alınan örneklerde invazif infeksiyon oluşturmuş PRKp izolatu üreyen, >18 yaş üstü dokuz hasta kabul edildi. Hastaların ortalama yaşı 57.6 (yaş aralığı 20-93) olup, bu hastalardan 5 (%55.5)'i erkek, 4 (%44.5)'ü kadındı. Bu hastalardan beşi Genel Yoğun Bakım Ünitesi'nde, ikisi Travma Yoğun Bakım Ünitesi'nde, biri Ortopedi Servisi'nde, sonuncusu ise Nefroloji Servisi'nde yatmaktaydı. *K. pneumoniae* suşları hastanede yatan dört hastada kandan, üç hastada balgamdan, bir hastada yara yerinden ve son hastada da idrardan elde edildi. Hastaların dördü bakteriyemi, üçü VIP, biri cerrahi alan infeksiyonu, diğeri ise komplike idrar yolu infeksiyonu tanısıyla takip edildi. Hastanede kalış süresi ortalama 50.4 (4-80) gündü. PRKp infeksiyonu tablosu gelişen hastaların altısı meropenem, tigesiklin ve kolistin; ikisi imipenem, tigesiklin ve kolistin; biri ise meropenem, ertapenem ve kolistin kombinasyonu ile tedavi edildi. Tedavi başladıktan ortalama 9 gün (4-21) sonra hastalardan 7 (%77.7)'si geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmasına karşın kaybedildi. Hayatta kalan hastalardan birisi komplike idrar yolu infeksiyonu tanısıyla meropenem, ertapenem ve kolistin alan ve idrar sondası çıkarılan hasta; diğeri ise protez infeksiyonu tanısıyla meropenem, tigesiklin ve kolistin alan ve protezi değiştirilen hastaydı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Tablo 5. *K. pneumoniae* İzolatlarına Karşı (n=9) Gradyan Testi ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemleriyle Antibiyotiklerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Antibiyotik Duyarlılık Testi	Antibiyotik	4	6	7	8	9	12	13	14	15	Suş no
Gradyan testi	Meropenem	> 32	> 32	> 32	24	> 32	> 32	16	32	> 32	MİK değerleri (mg/lt)
	İmipenem	32	24	12	8	> 32	> 32	12	8	8	
	Ertapenem	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	24	> 32	> 32	
	Amikasin	24	64	64	48	96	> 256	32	48	> 256	
	Gentamisin	32	8	12	48	64	> 256	16	16	> 256	
	Siprofloksasin	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	
	Levofloksasin	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	
	Seftriakson	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	
Sıvı Mikrodilüsyon	Tigesiklin	2	2	1	2	1	4	1	1	1	
	Kolistin	4	8	64	64	32	32	4	8	16	

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon.

Tablo 6. *K. pneumoniae* Suşlarının (n=9) PCR Yöntemiyle Belirlenen Karbapenemaz Tipleri

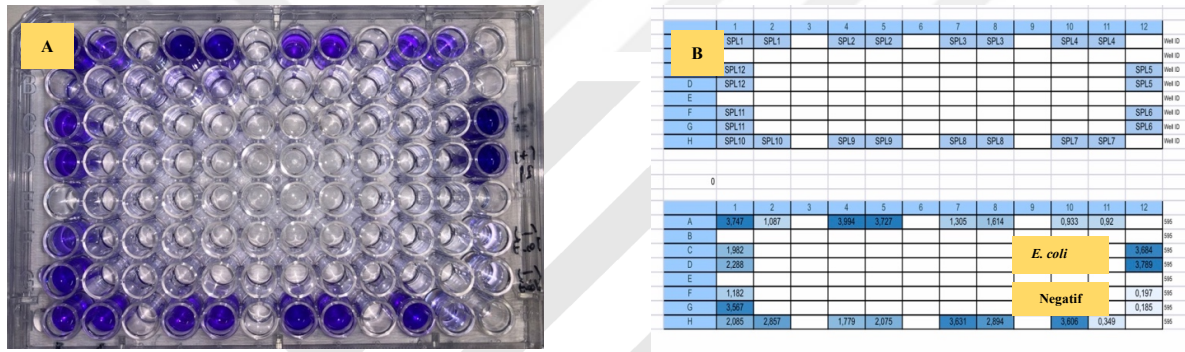
Suş no	Meropenem/Ertapenem zon çapı (mm)	Meropenem MİK (mg/lt)	Gen
4	12/10	> 32	OXA-48
6	14/0	> 32	OXA-48
7	15/0	> 32	OXA-48
8	13/8	24	OXA-48
9	9/0	> 32	OXA-48
12	9/0	> 32	OXA-48 ve NDM
13	22/0	16	OXA-48
14	15/10	32	OXA-48
15	14/0	> 32	OXA-48
Kontrol suşu (<i>E. coli</i> AT9202)	30/30		

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon.

K. pneumoniae suşlarının (n=9) MİK değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir. Suşların, aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin, amikasin), sefalosporinler (seftriakson, sefotaksim), karbapenemler (ertapenem, meropenem, imipenem), florokinolonlar (siprofloksasin,

levofloksasin), tigesiklin ve kolistine karşı duyarlılıkları belirlendi. MİK değerleri meropenem >8 mg/lt, ertapenem >0.5 mg/lt, kolistin >2 mg/lt, gentamisin >4 mg/lt, amikasin >16 mg/lt, siprofloksasin >0.5 mg/lt, seftriakson >2 mg/lt olanlar o antibiyotiğe dirençli olarak kabul edildi. Tüm antimikrobiyal kategorilerde tüm ajanlara dirençli oldukları belirlendiği için hepsi PDR olarak tanımlandı.

Karbapenem direnci olan suşlarda karbapenem direncinden sorumlu genlerin varlığı (bla_{OXA-48}, bla_{NDM-1}, bla_{VIM}, bla_{IMI}, bla_{KPC}) genleri in-house PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. Suşların hepsinde genotipik yöntemlerle karbapenemaz geni saptandı. Tüm suşlarda saptanan karbapenemaz tipi tüm OXA-48 idi, sadece bir suşta (12 no'lu) hem OXA-48 hem de NDM-1 geni birlikte saptandı (Tablo 6).



Resim 10. A: Mikroplakta hazırlanan biyofilm oluşumunun kristal viyole boyasıyla gösterilmesi B: Mikroplak kuyucuklarında oluşturulan biyofilmlerin kristal viyole boyasıyla boyandıktan sonra, spektrofotometre ile ölçülen optik dansite (OD) sonuçları.

Bakterilerin biyofilm oluşturup oluşturmadıklarının araştırılması için başlangıçta mikroplakta kristal viyole boyama yöntemi kullanıldı (Resim 10A). Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, negatif kontrol için steril TSB kullanıldı. Negatif kontrolün üzerindeki değerler (OD) biyofilm-pozitif, negatif kontrole eşit veya altındaki değerler (OD) ise biyofilm-negatif olarak değerlendirildi (165). Biyofilm oluşumu yönünden tüm *K. pneumoniae* suşları değerlendirildiğinde biyofilm yapanların oranı %100 olarak saptandı (Resim 10A ve 10B).

Tablo 7. *K. pneumoniae* Suşlarının Spektrofotometreyle Optik Dansitelerinin Ölçülerek Negatif ve Pozitif Kontrole Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesilerinin Sınıflandırması

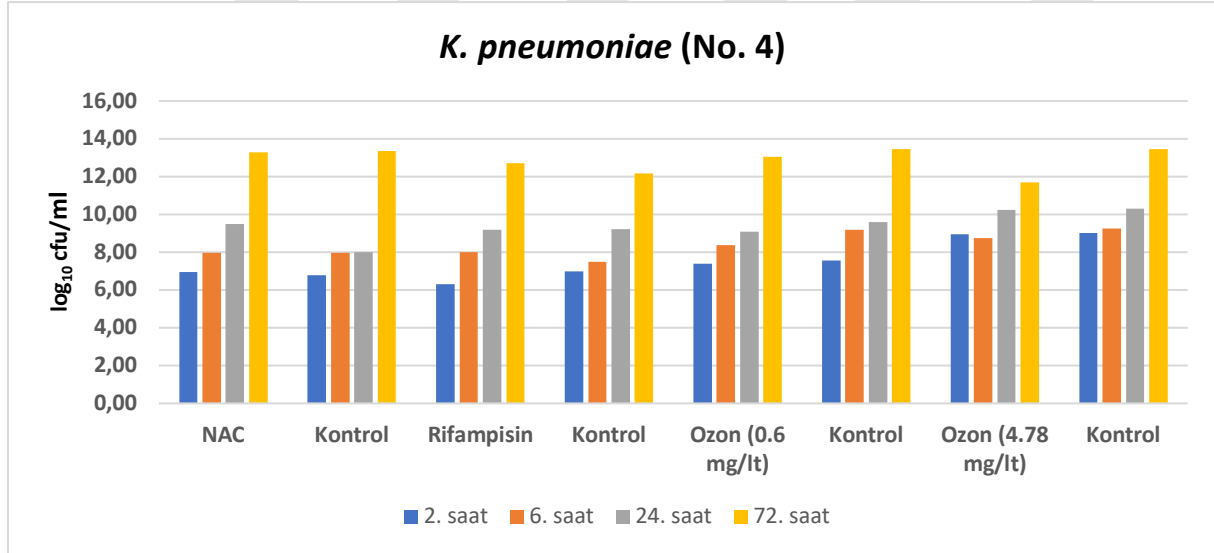
Suş no	Negatif Kontrole (steril TSB) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasitesi				Pozitif Kontrole (<i>E. coli</i> ATCC 25922) Göre Biyofilm Oluşturma Kapasite			
	Oluşturmayanlar (0)	Zayıf (+)	Orta (++)	Yüksek (+++)	Oluşturmayanlar (0)	Zayıf (+)	Orta (++)	Yüksek (+++)
4				3.99				3.99
6				2				2

7				0.93				0.93
8				2.86				2.86
9				2.08				2.08
12				3.63				3.63
13				3.6				3.6
14				2.29				2.29
15				3.56				3.56
Biyofilm Oluşturma				Biyofilm Oluşturma, %				
OD ≤ 0.081 (0)				<25 (0)				
0.081 < OD ≤ 0.162 (+)				25-50 (+)				
0.162 < OD ≤ 0.324 (++)				51-75 (++)				
0.32 < OD (+++)				76-100 (+++)				

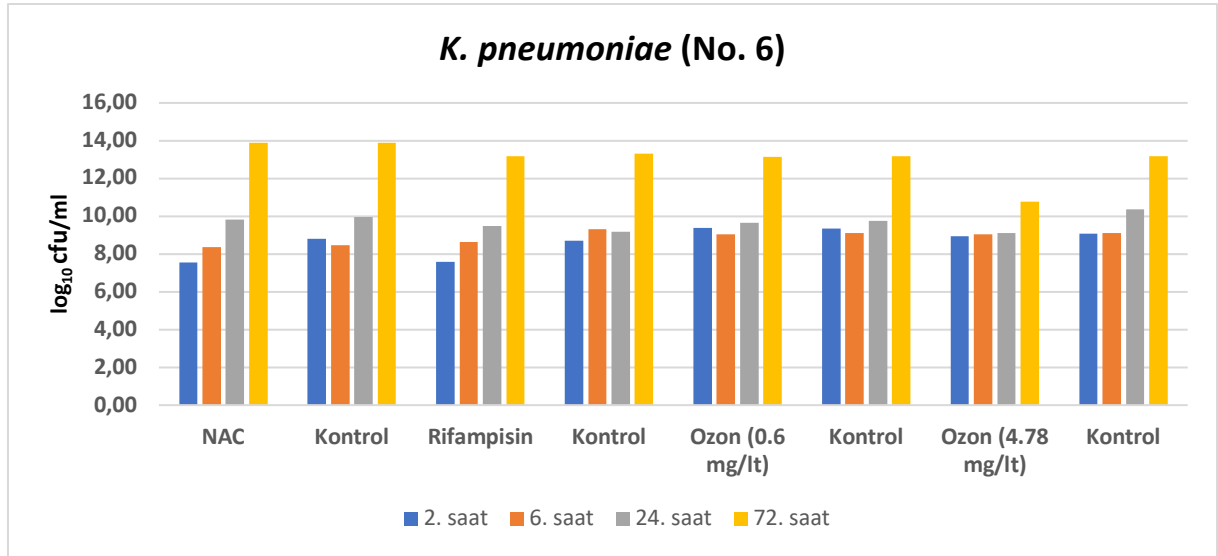
OD: Optik dansite, TSB: Triptik Soy broth.

Spektrofotometreyle 595 nm dalga boyunda optik dansiteleri ölçülen izolatlar Tablo 7’de gösterildiği gibi sınıflandırıldı. Pozitif ve negatif kontrole göre yapılan sınıflandırmada izolatların hepsinin (%100) yüksek düzeyde biyofilm oluşturduğu saptandı. Optik dansitelerine göre yapılan bu sınıflandırmada elde edilen değerler, en düşük 8 log₁₀ cfu/ml, en yüksek 10.38 log₁₀ cfu/ml (ortalama 9.29 log₁₀ cfu/ml) bakteri koloni sayımıyla elde edilen değerlerle uyumlu bulundu. İzolatlar; dört hastada kandan, üç hastada balgamdan, bir hastada yara yerinden ve son hastadan ise idrardan elde edildi. Farklı örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından belirgin bir fark saptanmadı.

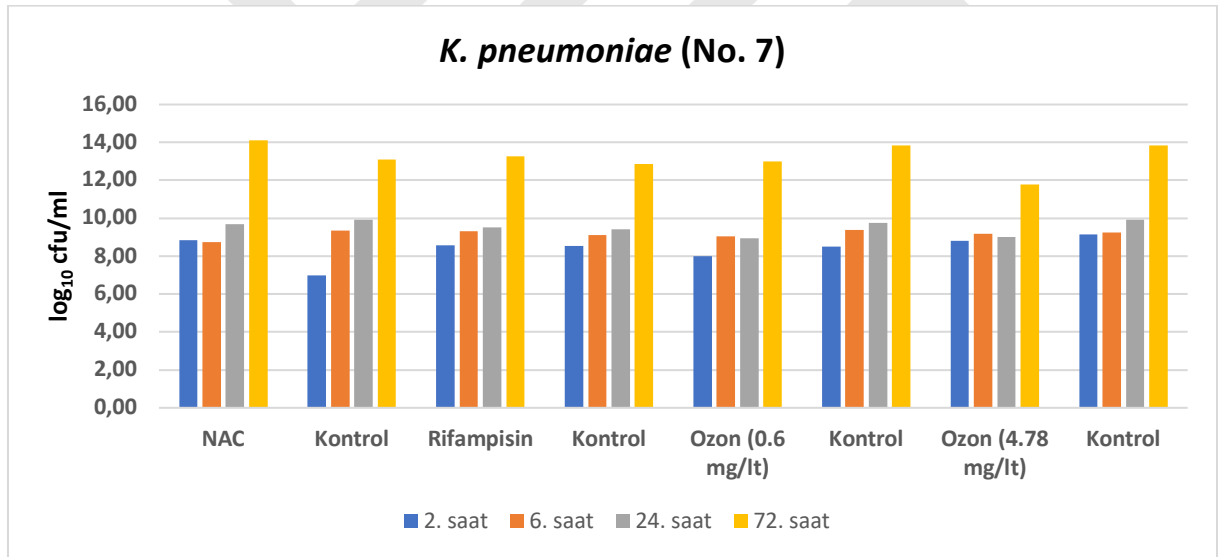
Koloni Sayma Yöntemiyle Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Gösterilmesi



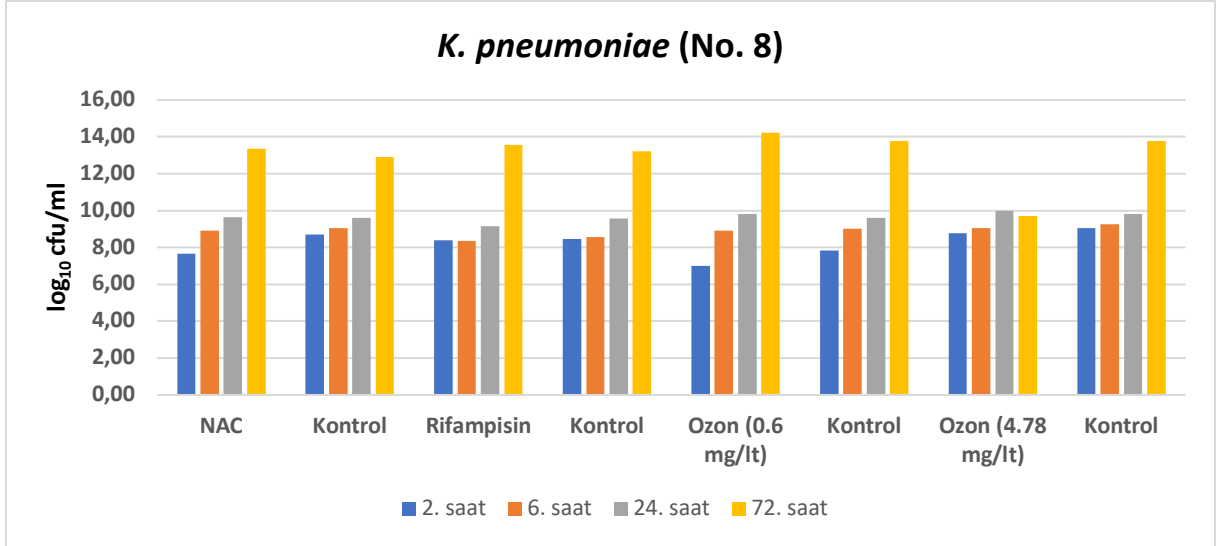
Şekil 2. Koloni sayma yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg/ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



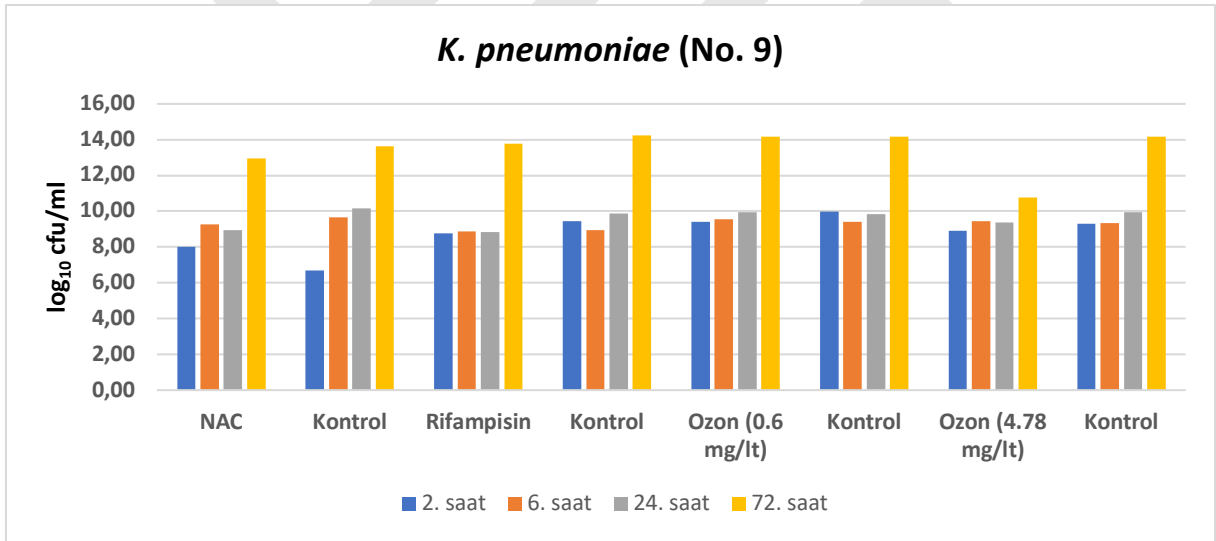
Şekil 3. Koloni sayma yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



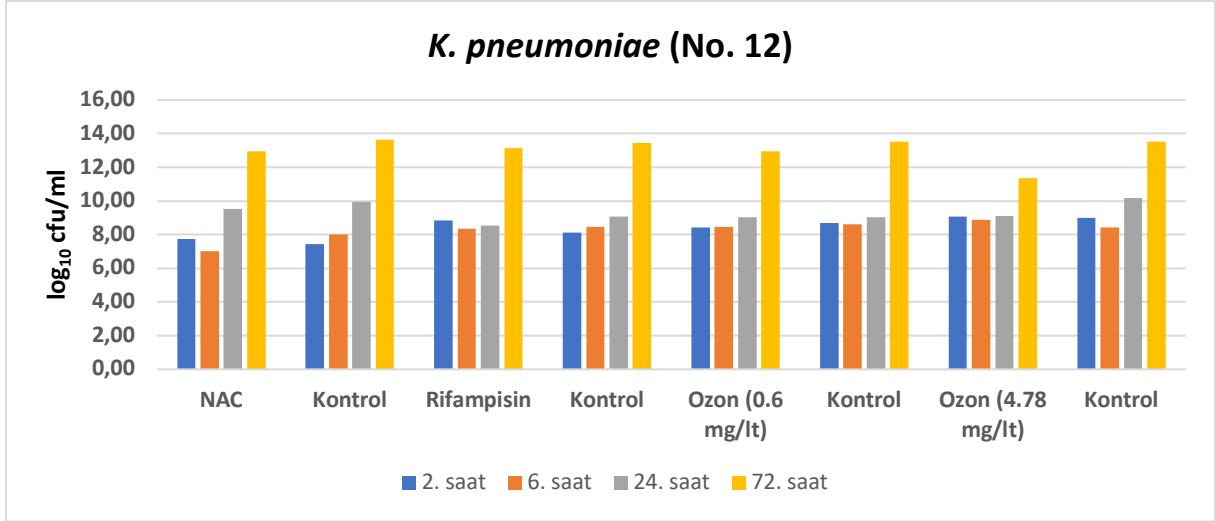
Şekil 4. Koloni sayma yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



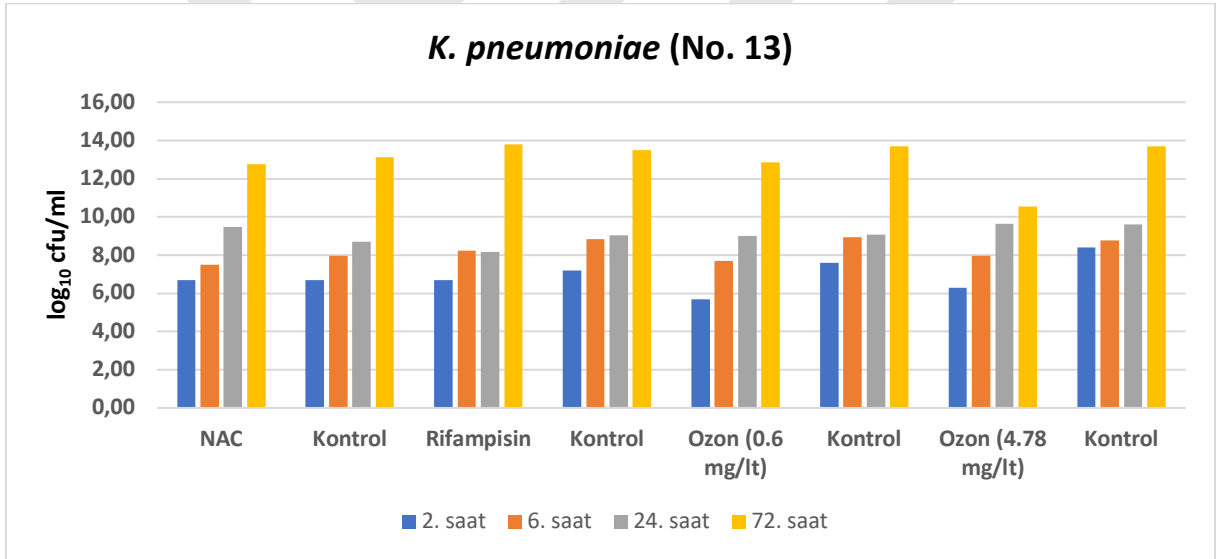
Şekil 5. Koloni sayma yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



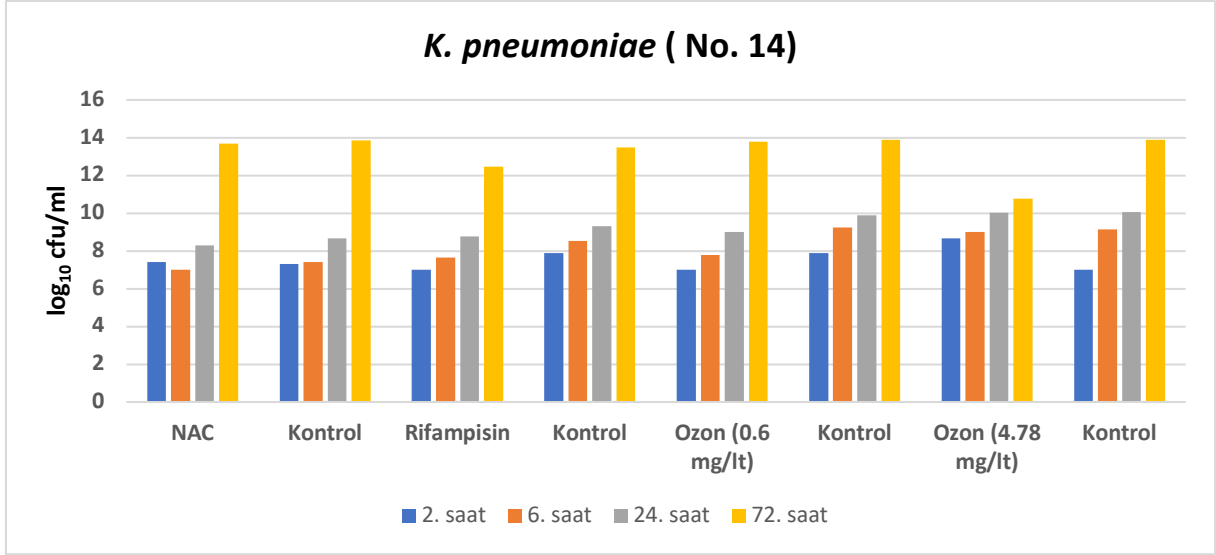
Şekil 6. Koloni sayma yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



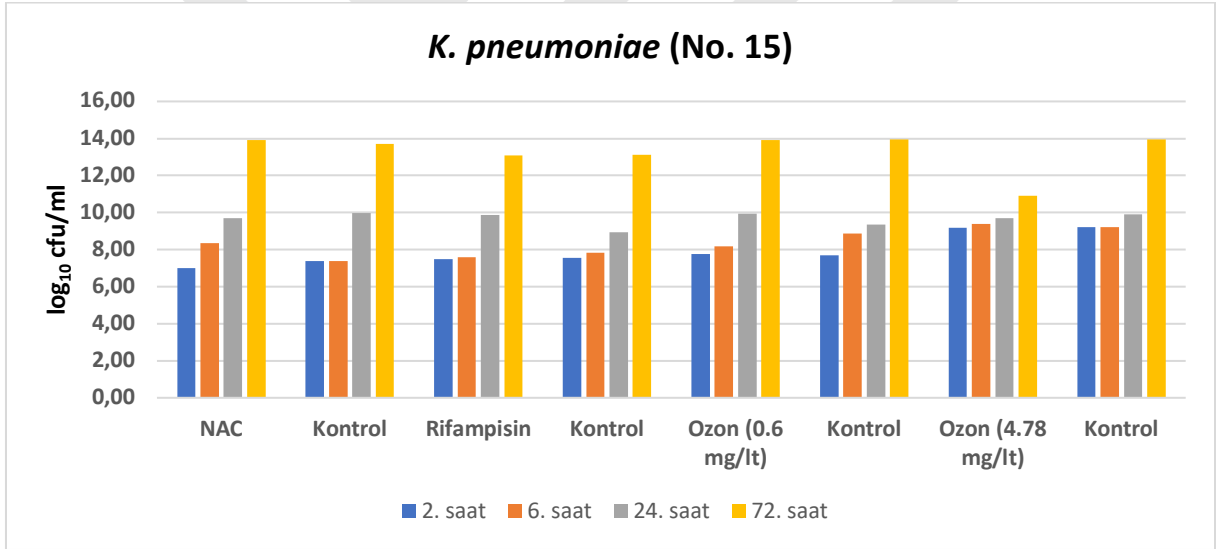
Şekil 7. Koloni sayma yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



Şekil 8. Koloni sayma yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml) uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



Şekil 9. Koloni sayma yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.



Şekil 10. Koloni sayma yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC (2 µg/ml), rifampisin (0.1 µg /ml), ozon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml uygulandığında 2., 6., 24. ve 72. saatlerdeki etkilerinin grafik olarak gösterilmesi.

Son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde biyofilm oluşturmuş (24 saatlik) bakteriler üzerine NAC uygulanmış, 2. saat, 6. saat, 24. saat ve 72. saatlerdeki etkileri incelenmiştir. Tüm izolatlarda kendi kontrollerine göre bakteri sayısında anlamlı bir azalma saptanmamıştır (sırasıyla p değeri >0.05 , >0.05 , >0.05 , >0.05).

NAC ile benzer şekilde son konsantrasyon 0.1 µg/ml olacak şekilde rifampisin biyofilm oluşturmuş (24 saatlik) bakteriler üzerine uygulanmış, 2. saat, 6. saat, 24. saat ve 72. saatlerde kendi kontrollerine göre bakteri sayısında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (sırasıyla *p* değeri >0.05, >0.05, >0.05, >0.05).

Son konsantrasyon 0.6 µg/ml ve 4.78 µg/ml olacak şekilde ozonlu suyun biyofilm tabakası üzerine etkinliği değerlendirilmiştir. 0.6 µg/ml olacak şekilde ozonlu su uygulandığında belirlenen zamandaki kontrolüne göre 6. saat ve 24. saatte bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmekle (sırasıyla *p* değeri <0.05, <0.05) birlikte logaritmik olarak 2 log₁₀ veya üzerinde bir azalma saptanmadığı için etkili olmadığı düşünülmüştür. Bununla birlikte, 2. saat ve 72. saatteki üremeler değerlendirildiğinde biyofilmdeki bakteri sayısında anlamlı bir azalma saptanmamıştır (sırasıyla *p* değeri >0.05, >0.05).

Sudaki ozon konsantrasyonu artırılarak son konsantrasyon 4.78 µg/ml olacak şekilde ozonlu su uygulandığında 2. saat ve 24. saatte biyofilmdeki bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmekle (sırasıyla *p* değeri <0.05, <0.05) birlikte 2 log₁₀ üzerinde azalma saptanmadığı için etkili olmadığı düşünülmüştür. Bununla birlikte, aynı konsantrasyonda 6. saatte istatistiksel olarak bir azalma görülmedi. Ancak, 72. saatteki incelemede biyofilmdeki bakteri sayısında tüm izolatlarda 2.06-4.08 log₁₀ aralığında azalma saptandığı için etkili olarak değerlendirilmiştir.

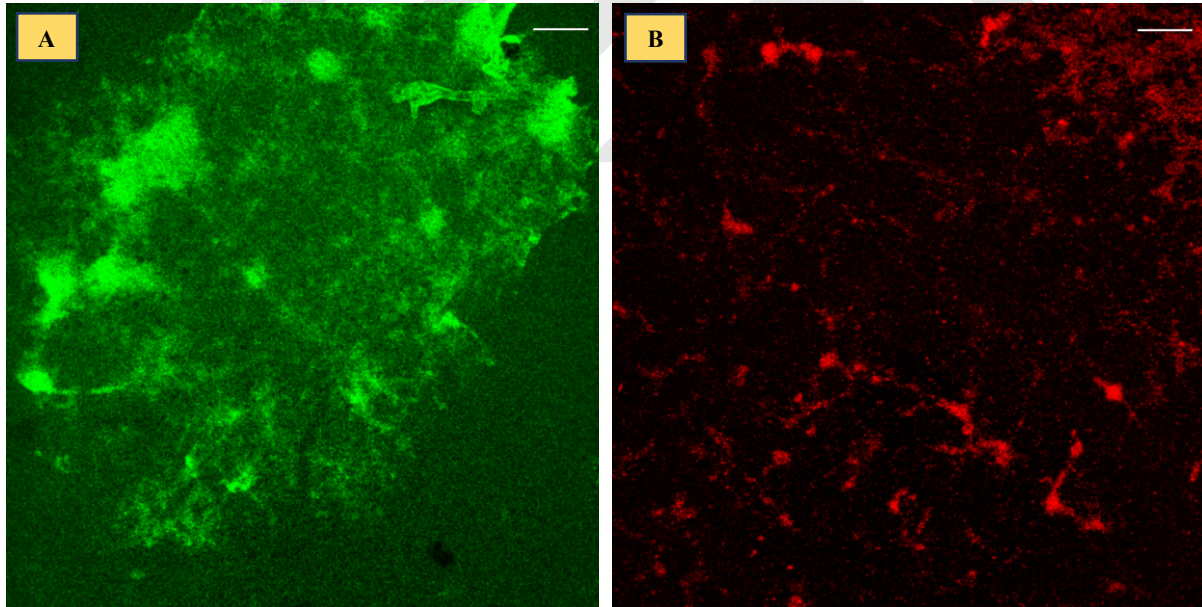
Tablo 8. Koloni Sayma Yöntemiyle NAC, Rifampisin ve Ozonun Bazal Biyofilm Tabakası Üzerine Etkilerinin Her İzolatın, Her Saatte (2., 6., 24. ve 72. saatler) Kendi Kontrolüne Göre Etkinliklerinin Gösterilmesi

Suş no	2. saat fark	Sonuç	6. saat fark	Sonuç	24. saat fark	Sonuç	72. saat fark	Sonuç	Antibiyofilm ajan (mg/lt)
	log ₁₀ cfu/ml		log ₁₀ cfu/ml		log ₁₀ cfu/ml		log ₁₀ cfu/ml		
4/4K	0.17	-	0.03	-	1.49	-	0.04	-	NAC (2)
	0.7	-	0.52	-	0.02	-	0.52	-	RİF (0.1)
	0.14	-	0.8	-	0.52	-	0.42	-	Ozon (0.6)
	0.06	-	0.49	-	0.06	-	2.06	+	Ozon (4.78)
6/6K	1.27	-	0.12	-	0.14	-	0	-	NAC (2)
	1.1	-	0.66	-	0.3	-	0.12	-	RİF (0.1)
	0.05	-	0.06	-	0.11	-	0.03	-	Ozon (0.6)
	0.11	-	0.06	-	1.27	-	2.4	+	Ozon (4.78)
7/7K	1.85	-	0.6	-	0.24	-	1	-	NAC (2)
	0.05	-	0.21	-	0.12	-	0.43	-	RİF (0.1)
	0.52	-	0.34	-	0.79	-	0.85	-	Ozon (0.6)
	0.34	-	0.1	-	0.92	-	2.07	+	Ozon (4.78)
8/8K	1.05	-	0.11	-	0.03	-	0.46	-	NAC (2)
	0.06	-	0.2	-	0.43	-	0.31	-	RİF (0.1)
	0.85	-	0.08	-	0.22	-	0.45	-	Ozon (0.6)
	0.28	-	0.21	-	0.17	-	4.08	+	Ozon (4.78)

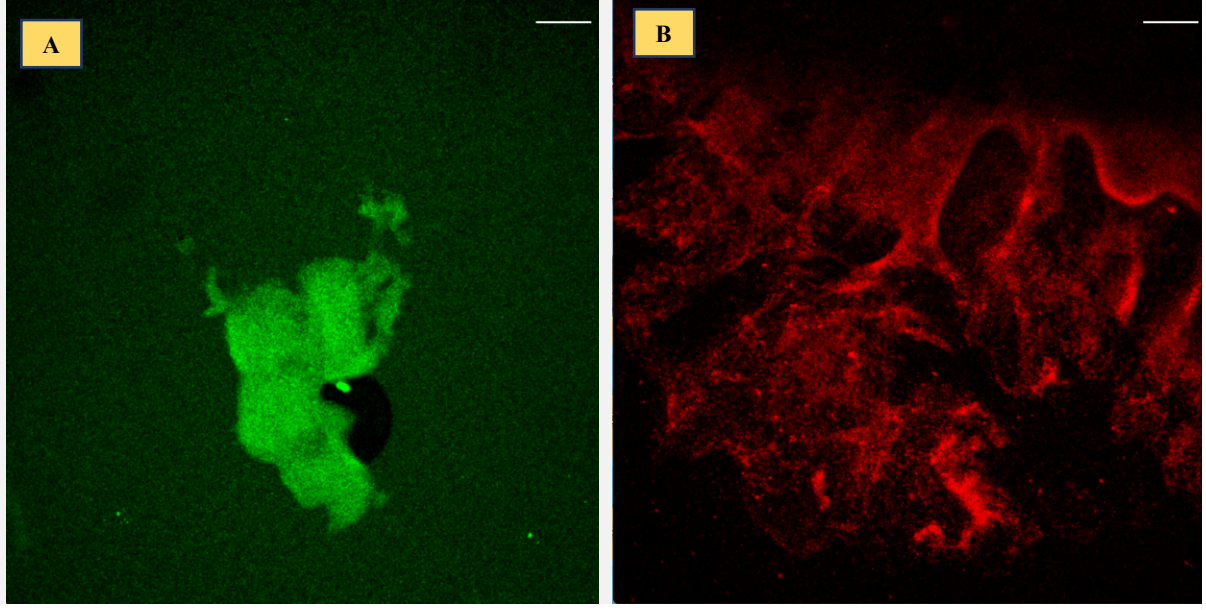
9/9K	1.3	-	0.39	-	1.23	-	0.69	-	NAC (2)
	0.86	-	0.06	-	0.07	-	0.46	-	RİF (0.1)
	0.58	-	0.14	-	0.1	-	0	-	Ozon (0.6)
	0.39	-	0.11	-	0.59	-	3.4	+	Ozon (4.78)
12/12K	0.29	-	1	-	0.41	-	0.71	-	NAC (2)
	0.72	-	0.1	-	0.14	-	0.28	-	RİF (0.1)
	0.27	-	0.12	-	0	-	0.56	-	Ozon (0.6)
	0.05	-	0.45	-	1.07	-	2.15	+	Ozon (4.78)
13/13K	0	-	0.47	-	0.78	-	0.39	-	NAC (2)
	0.48	-	0.59	-	0.86	-	0.31	-	RİF (0.1)
	1.9	-	1.22	-	0.08	-	0.85	-	Ozon (0.6)
	2.1	-	0.81	-	0.05	-	3.16	+	Ozon (4.78)
14/14K	0.1	-	0.4	-	0.37	-	0.18	-	NAC (2)
	0.88	-	0.87	-	0.52	-	1	-	RİF (0.1)
	0.9	-	1.46	-	0.88	-	0.13	-	Ozon (0.6)
	1.65	-	0.13	-	0.04	-	3.12	+	Ozon (4.78)
15/15K	0.4	-	0.96	-	0.28	-	0.21	-	NAC (2)
	0.06	-	0.26	-	0.95	-	0.03	-	RİF (0.1)
	0.08	-	0.7	-	0.59	-	0.02	-	Ozon (0.6)
	0.04	-	0.15	-	0.2	-	3.05	+	Ozon (4.78)

(K: Kontrol, (+): Etkili, (-): Etkisiz)

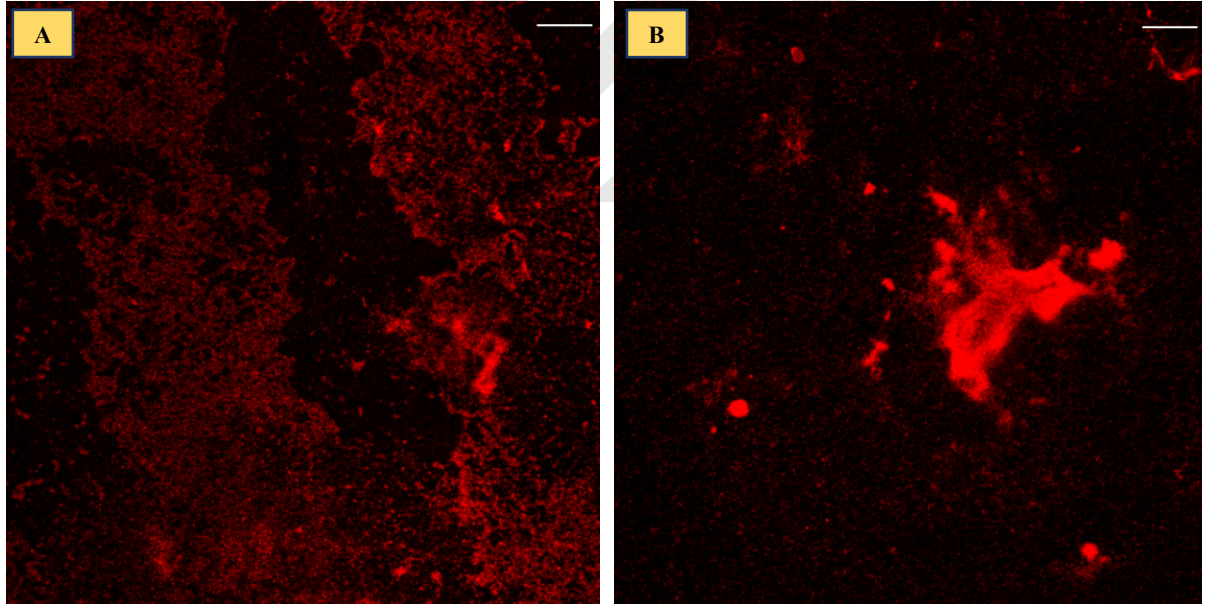
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopunda Biyofilmdeki Canlı ve Ölü/İnaktif Bakterilerin Görüntüleri (10x objektif ve 1x büyütme faktörü)



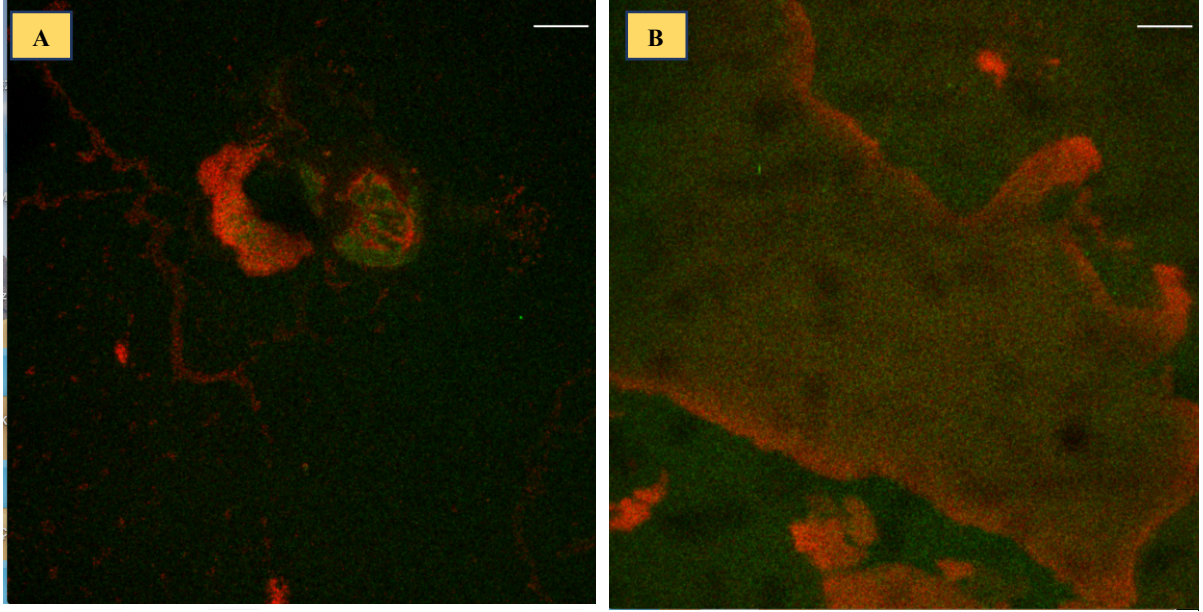
Resim 11. **A:** FDA boyasıyla 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi. **B:** PI boyasıyla 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi.



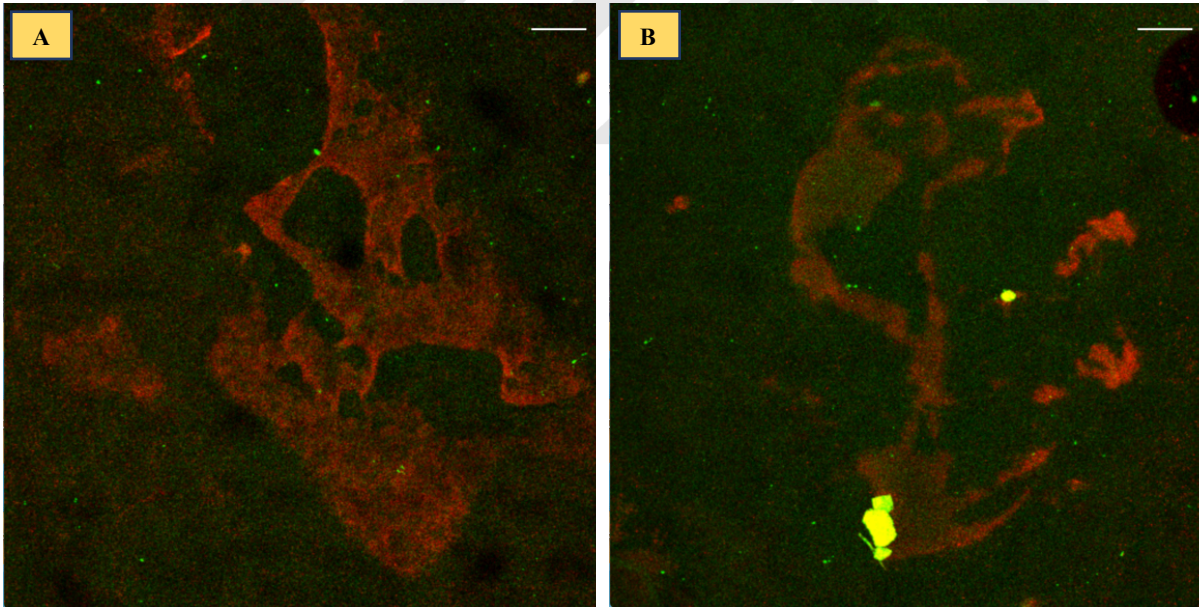
Resim 12. **A:** FDA boyasıyla 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi. **B:** PI boyasıyla 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi.



Resim 13. **A:** PI boyasıyla 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki ölü bakterilerin gösterilmesi. **B:** PI boyasıyla pozitif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853) suşunun biyofilm oluşturduktan 24 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin gösterilmesi.

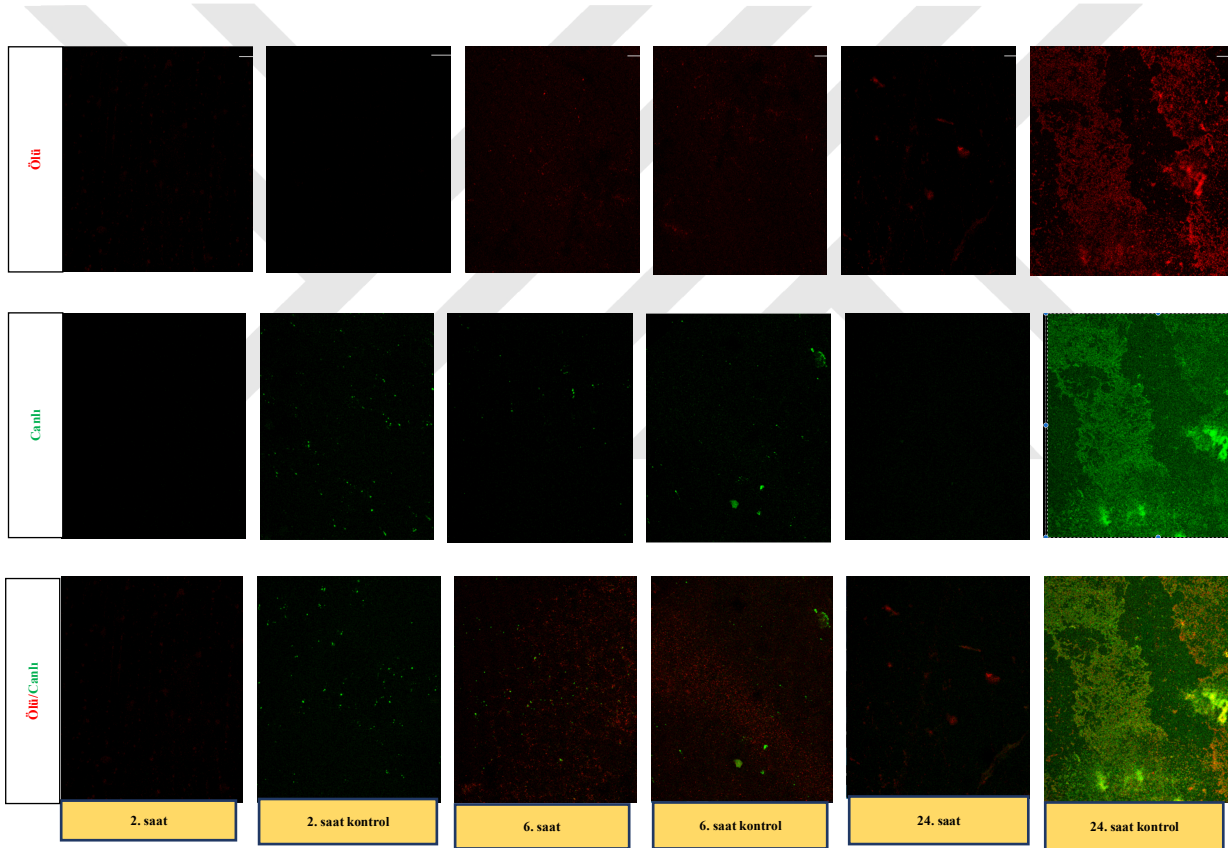
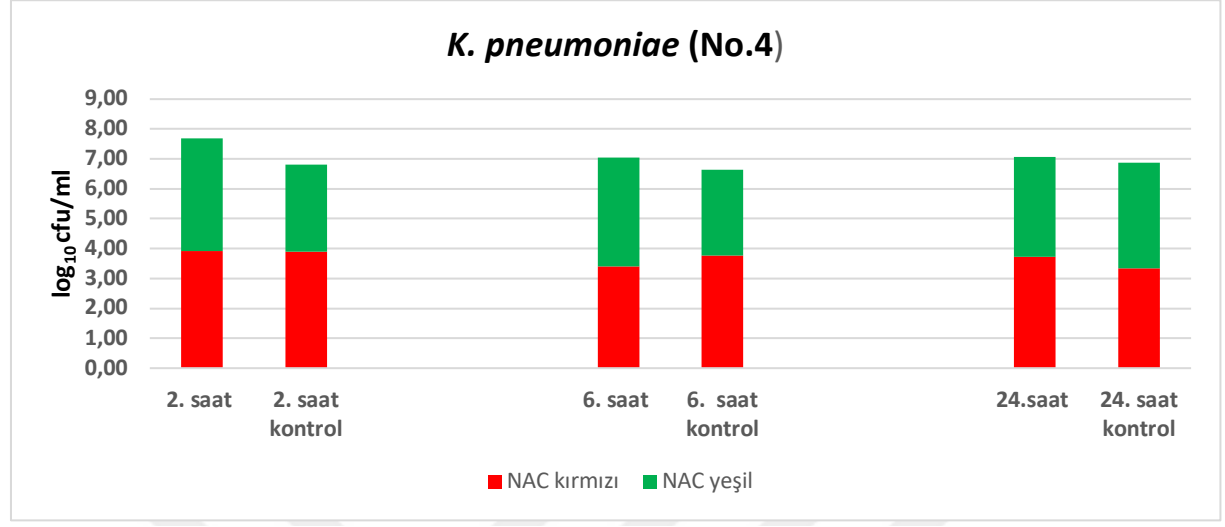


Resim 15. A: FDA ve PI boylarıyla pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 29522) suşunun biyofilm oluşturduktan 6 saat sonraki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi. **B:** FDA ve PI boylarıyla 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi.

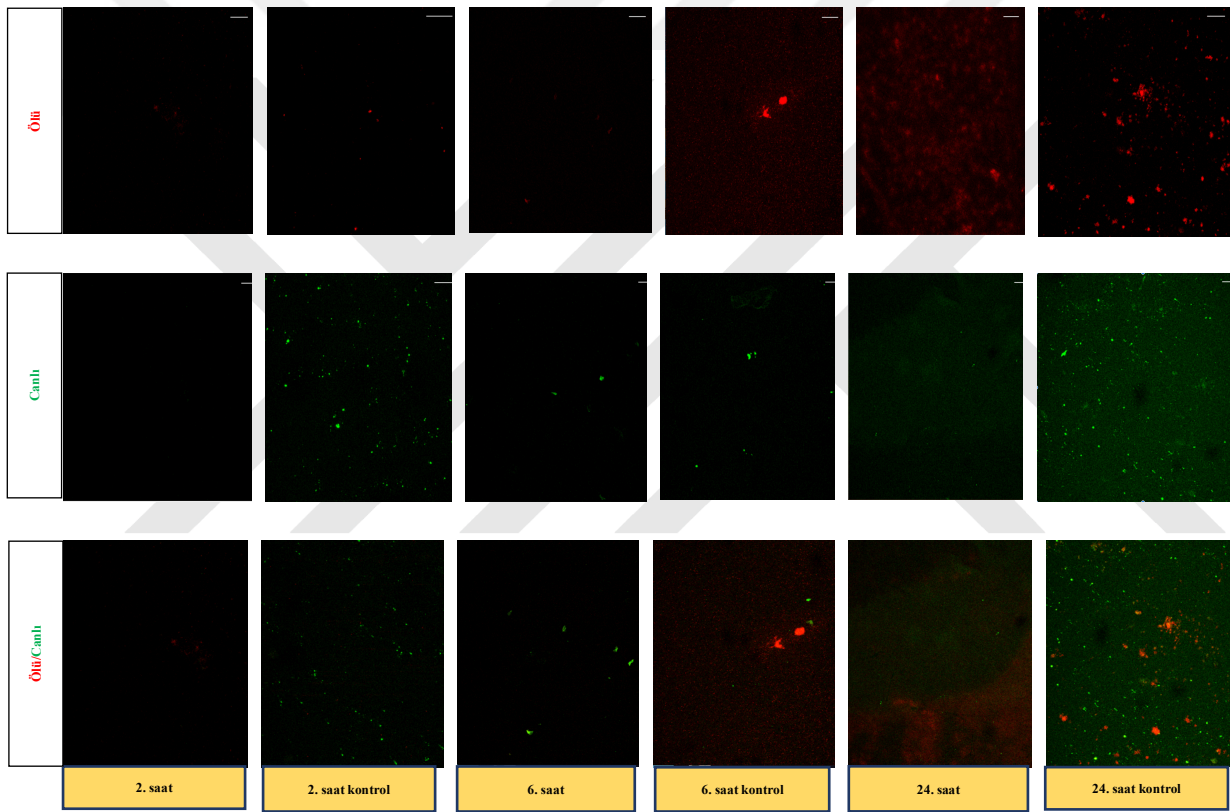
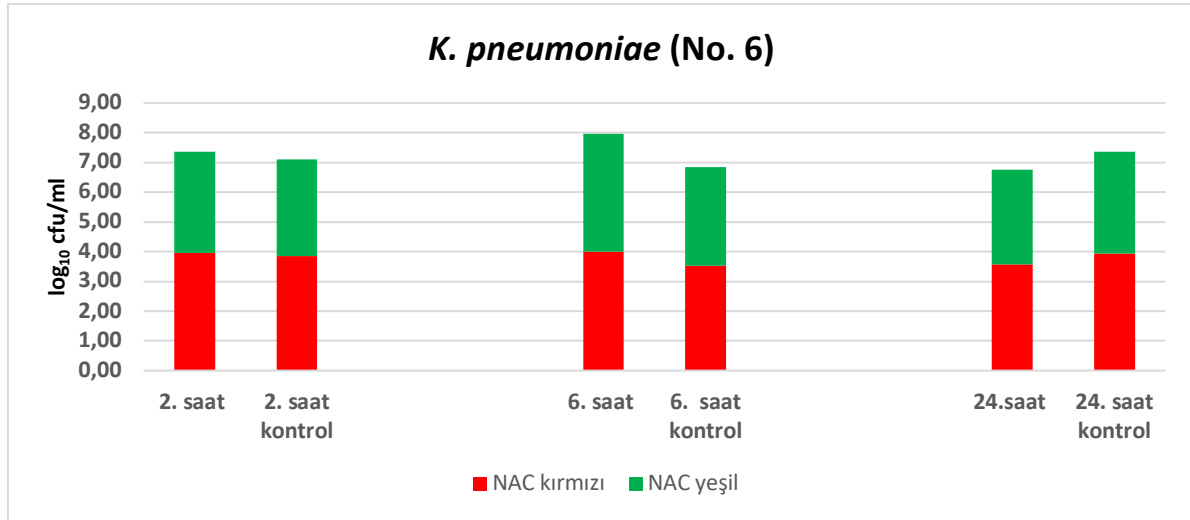


Resim 16. A: FDA ve PI boylarıyla pozitif kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853) suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi. **B:** FDA ve PI boylarıyla 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun biyofilm tabakası üzerine rifampisin uygulandıktan sonra 6. saatteki biyofilm içerisindeki canlı ve ölü bakterilerin gösterilmesi.

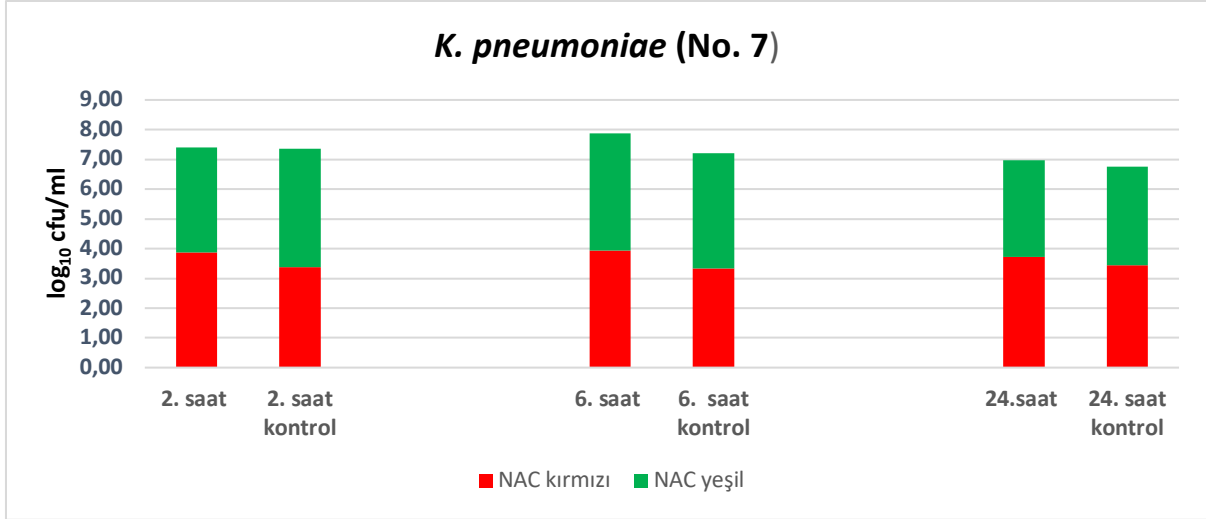
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopisi Yöntemiyle Biyofilmdeki Canlı ve Ölü/İnaktif Bakterilerin Gösterilmesi



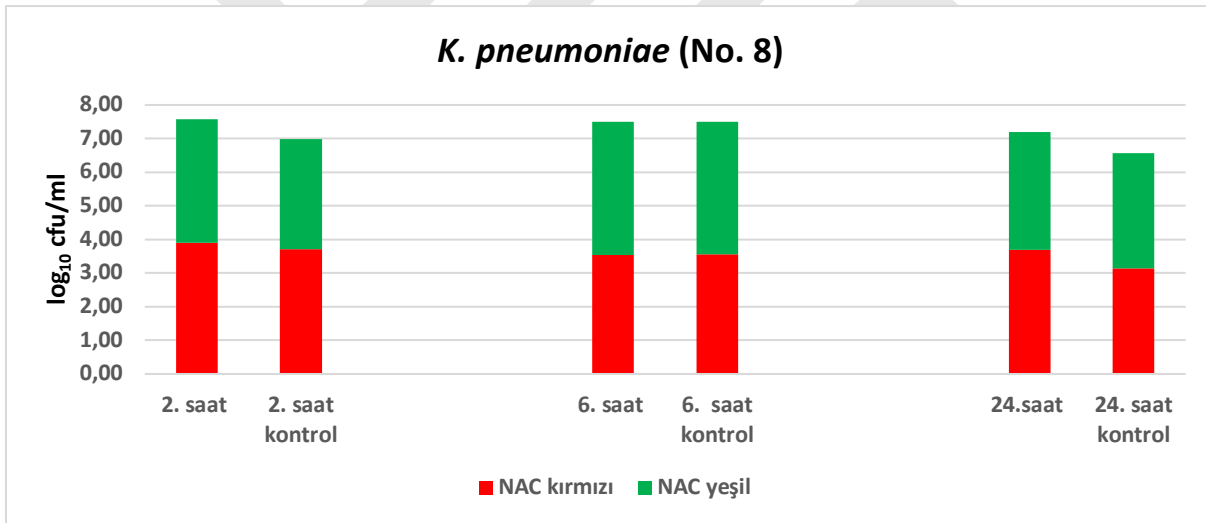
Şekil 11. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında zamana 2., 6. ve 24. saatlerde etkilerinin olarak biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



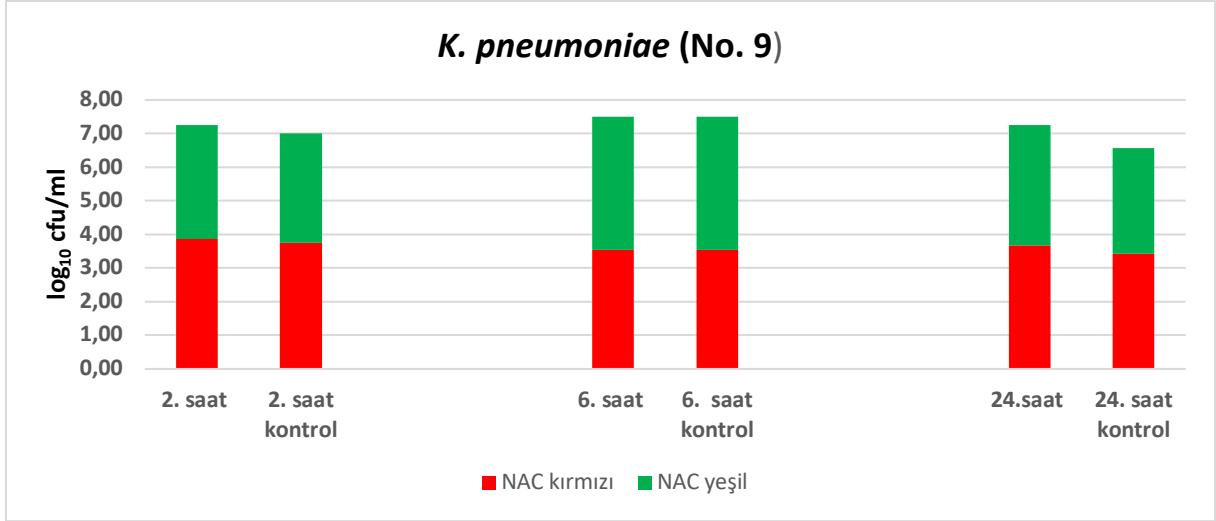
Şekil 12. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında zamana 2., 6. ve 24. saatlerde etkilerinin olarak biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



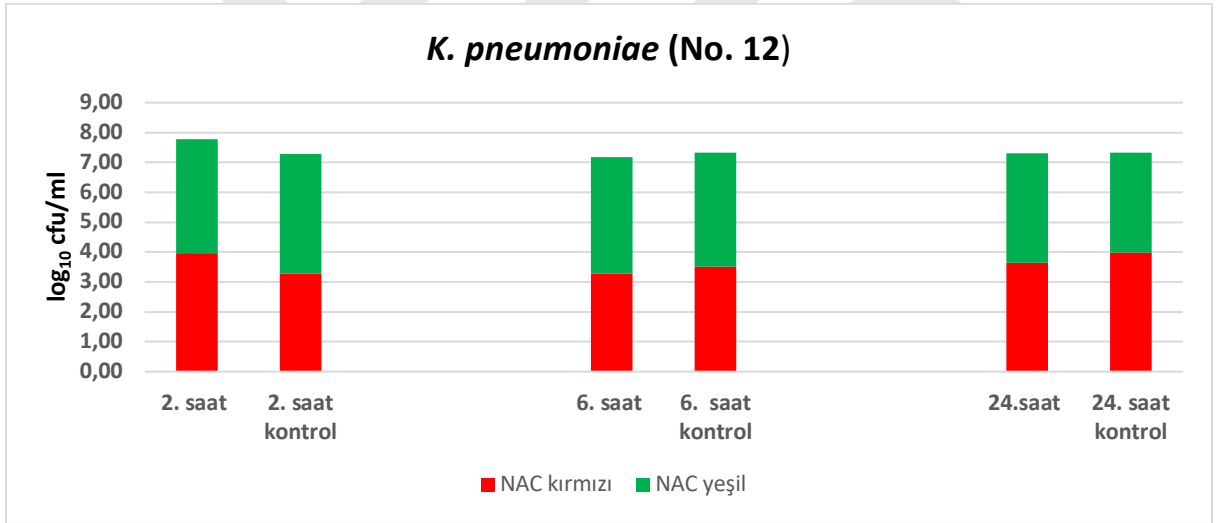
Şekil 13. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



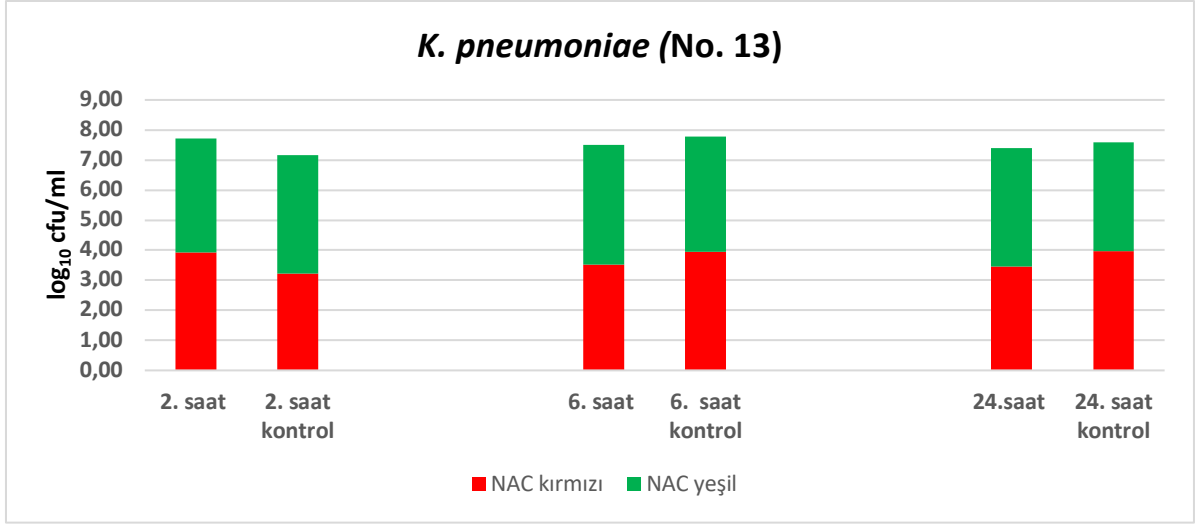
Şekil 14. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



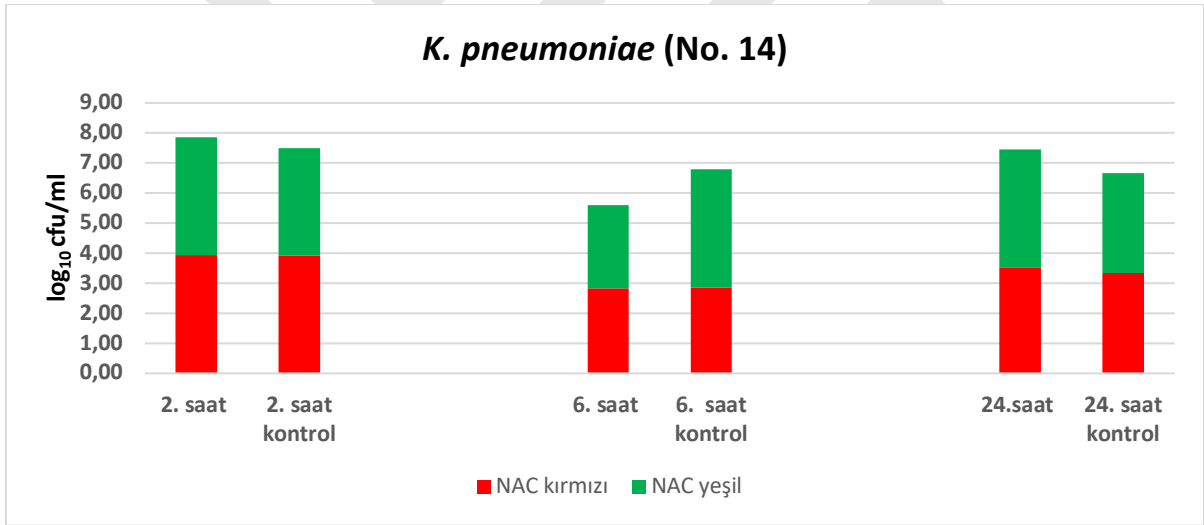
Şekil 15. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



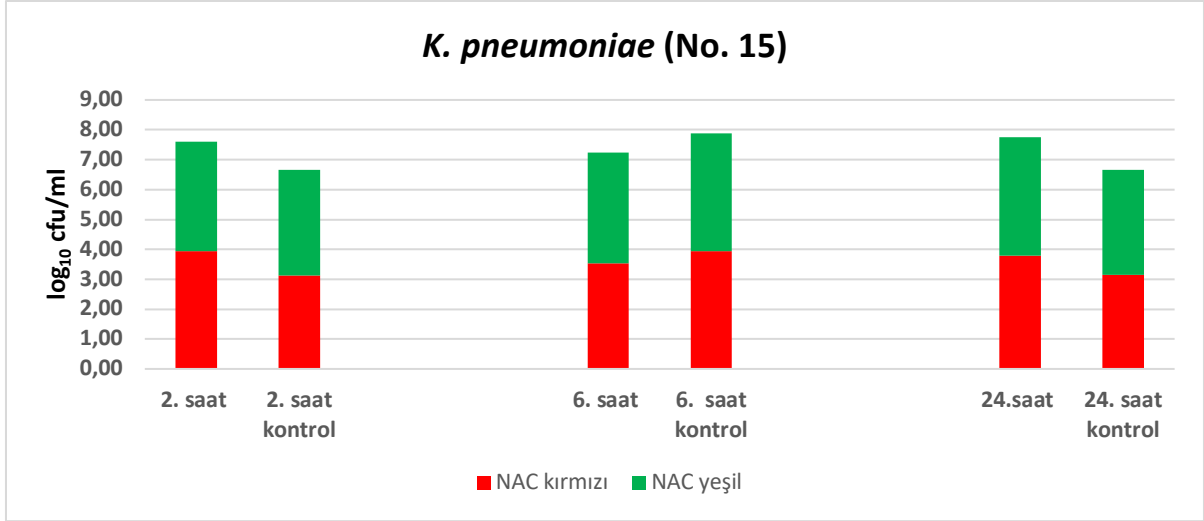
Şekil 16. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun kendi NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



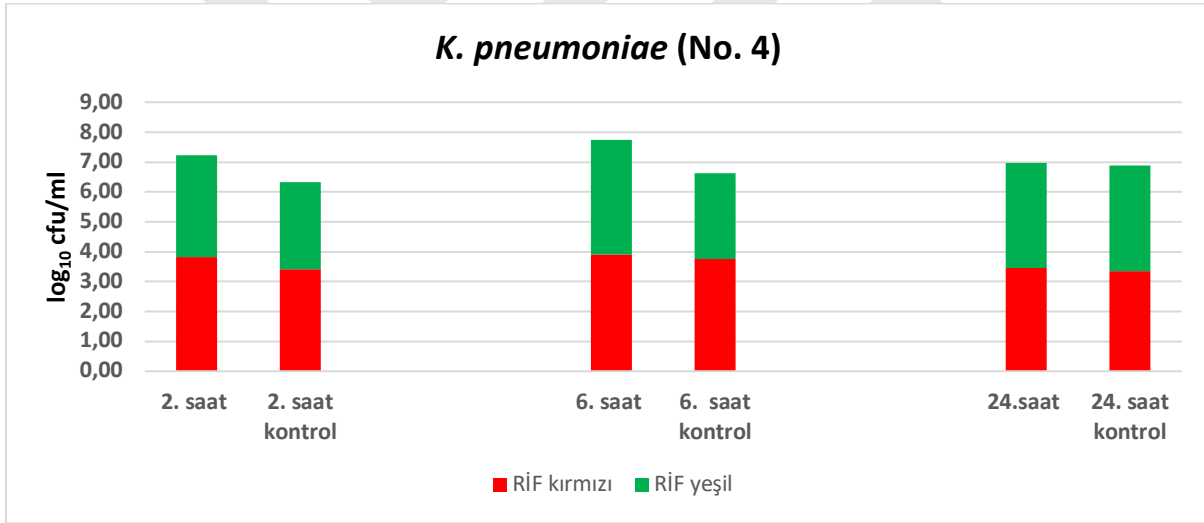
Şekil 17. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



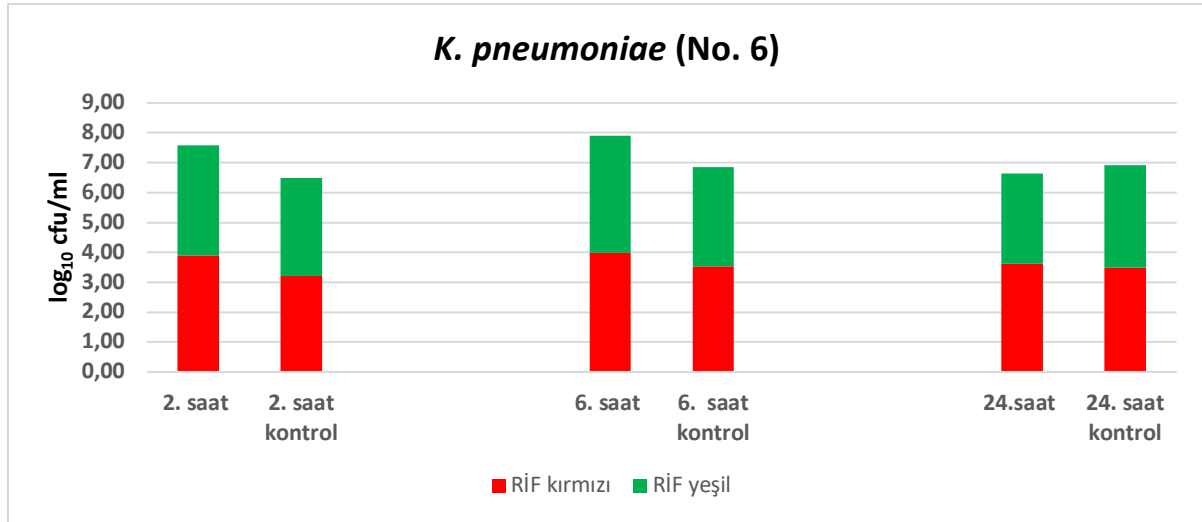
Şekil 18. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



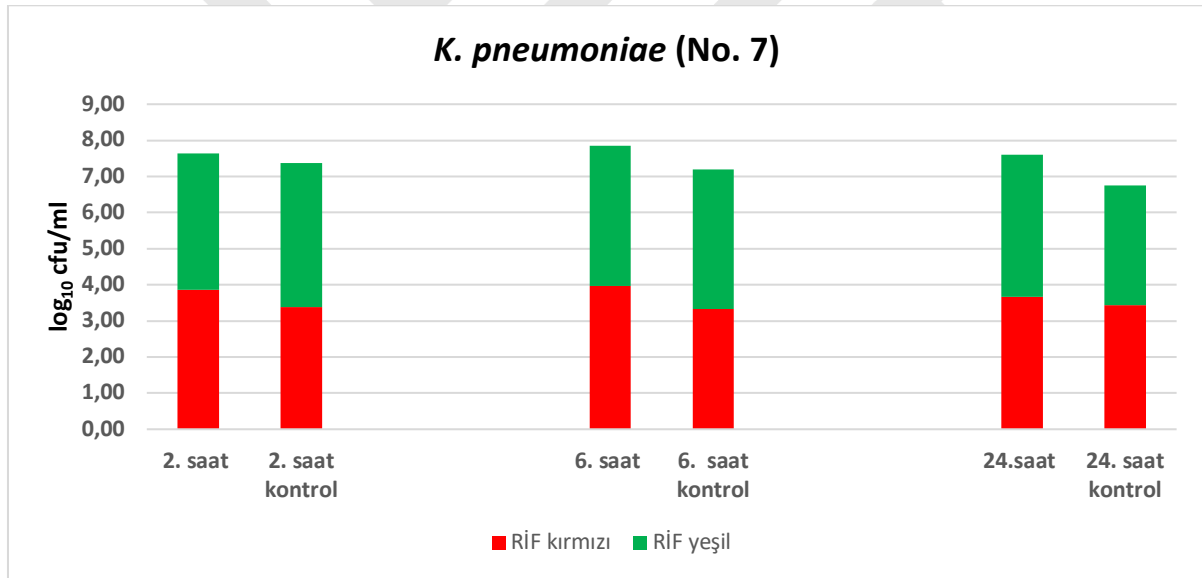
Şekil 19. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun NAC uygulanmamış kendi kontrolleri ve NAC (2 µg/ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



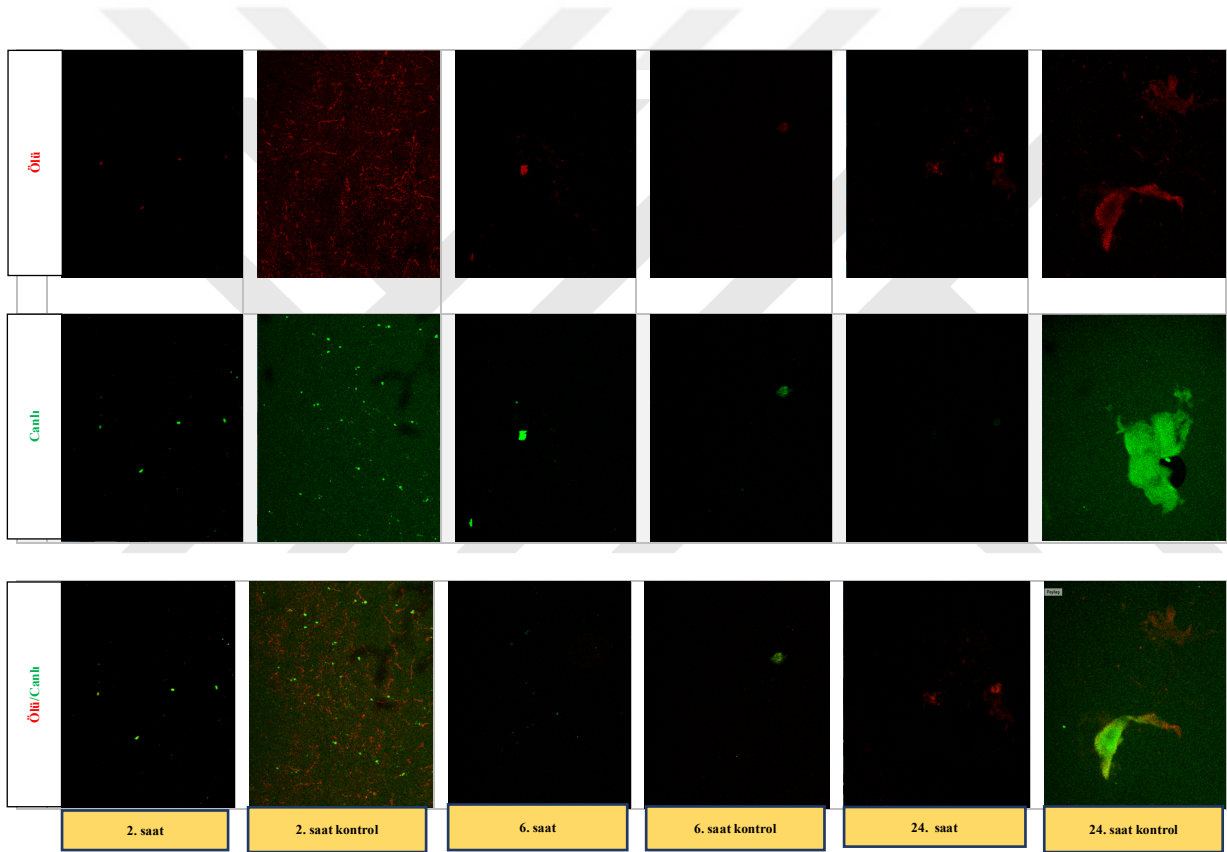
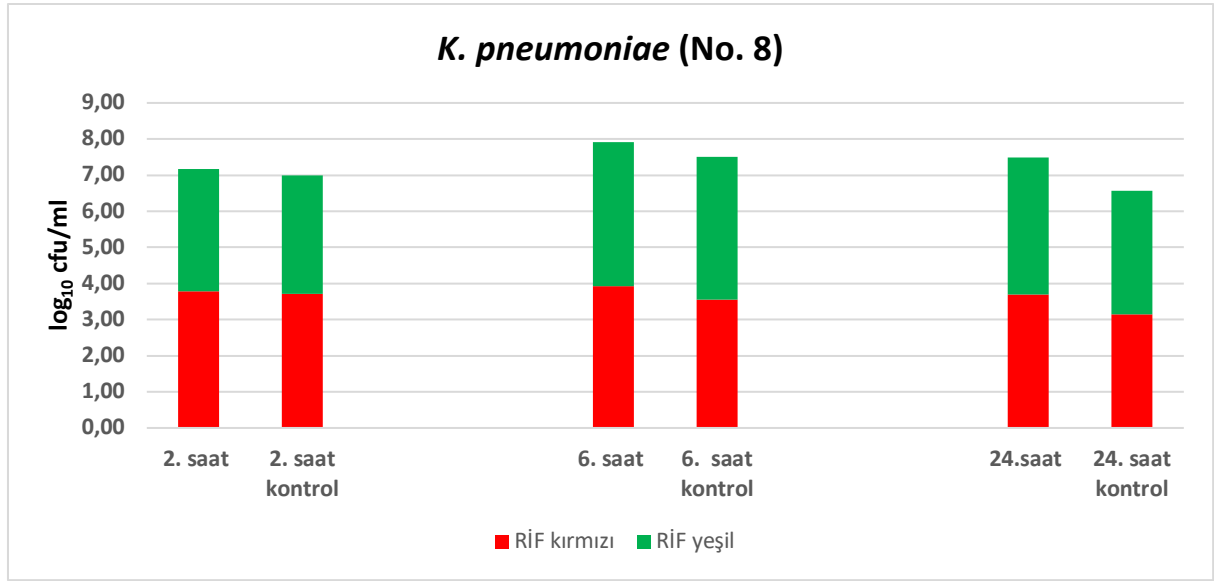
Şekil 20. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 4 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



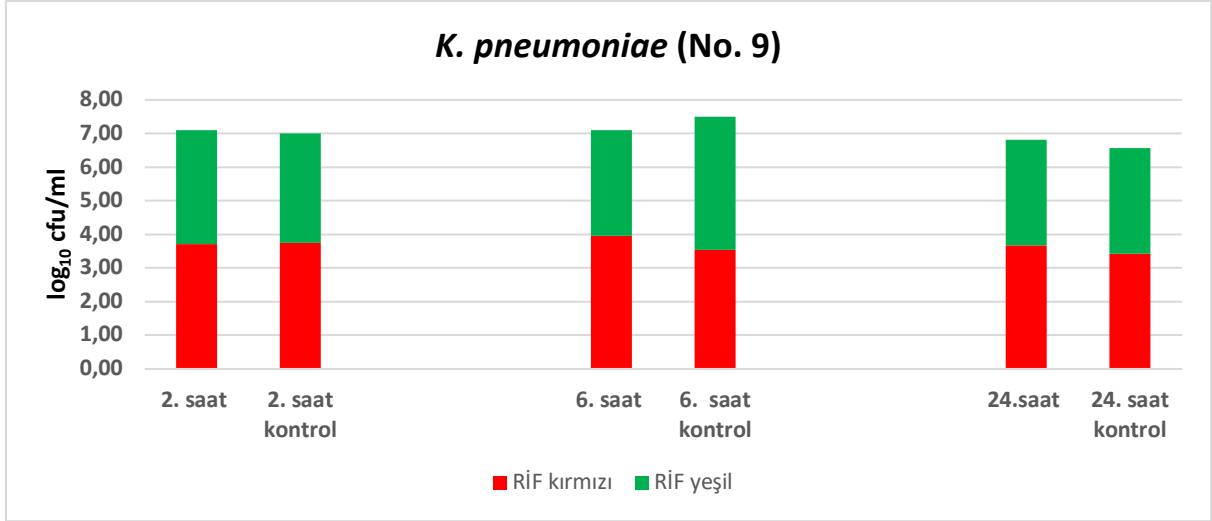
Şekil 21. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 6 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



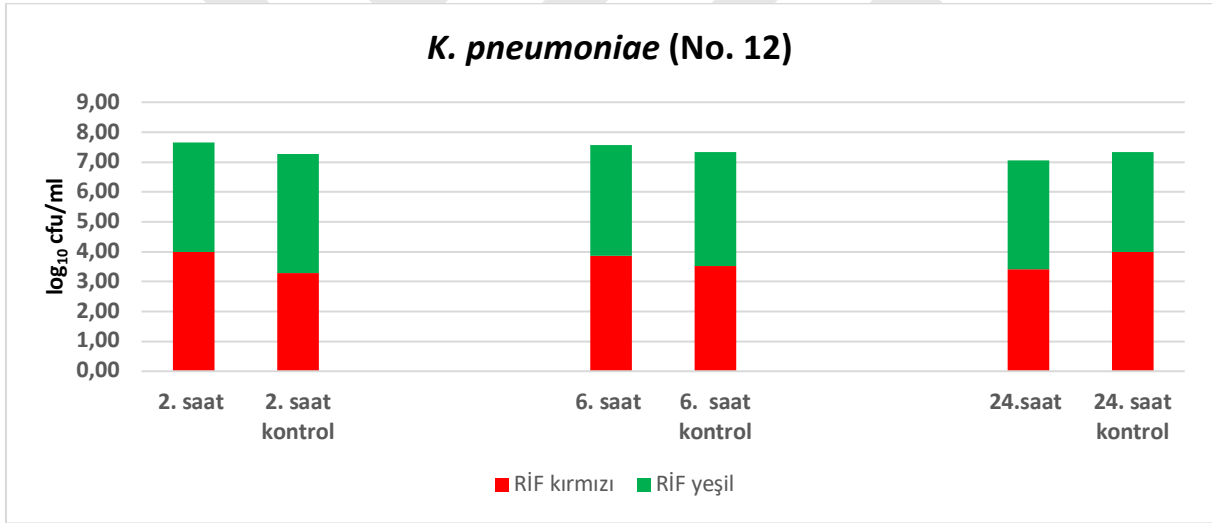
Şekil 22. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



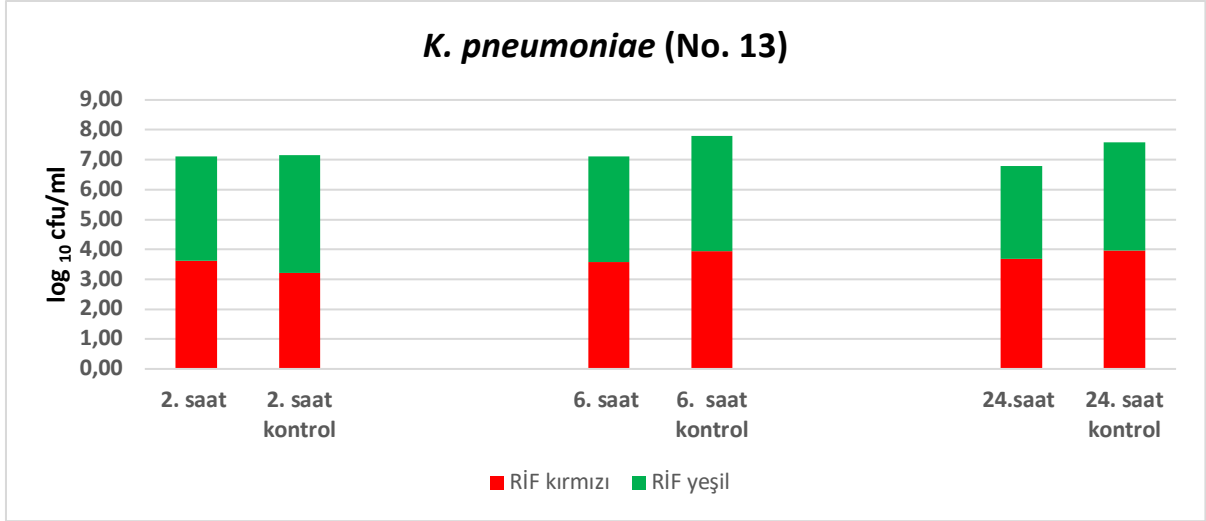
Şekil 23. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 8 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



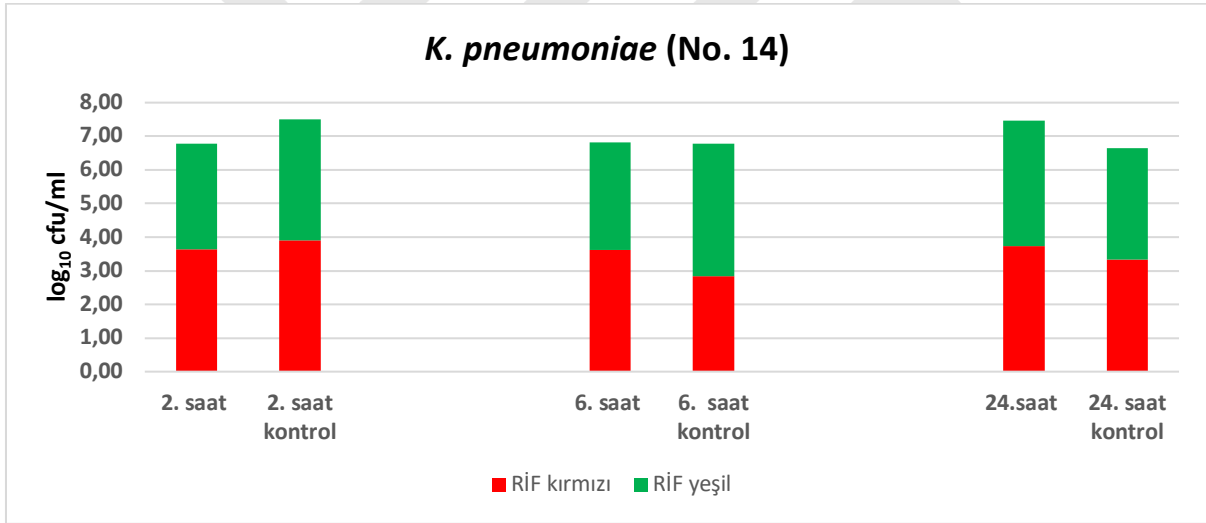
Şekil 24. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 9 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



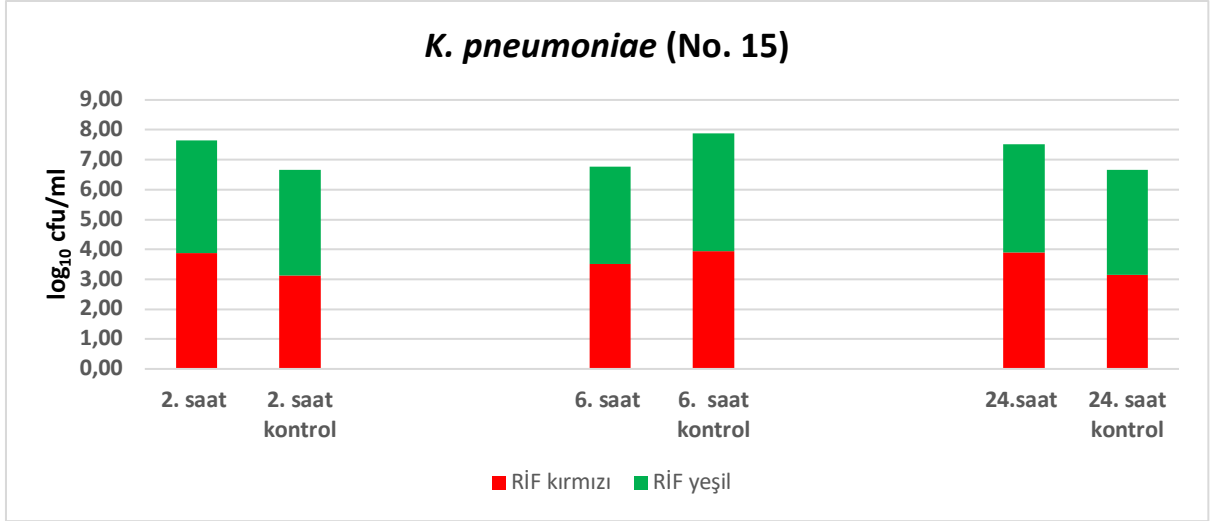
Şekil 25. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



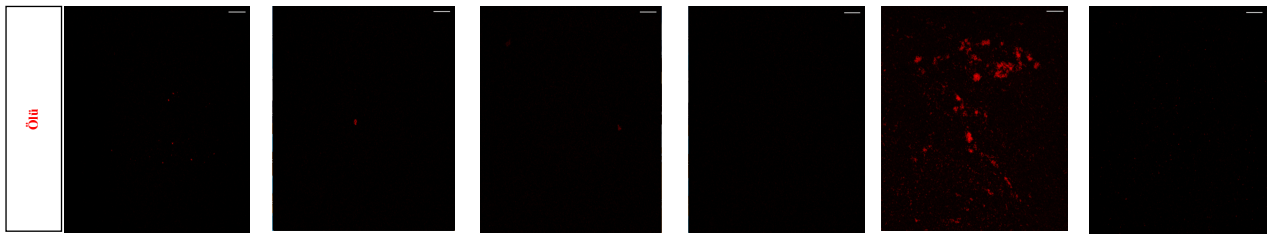
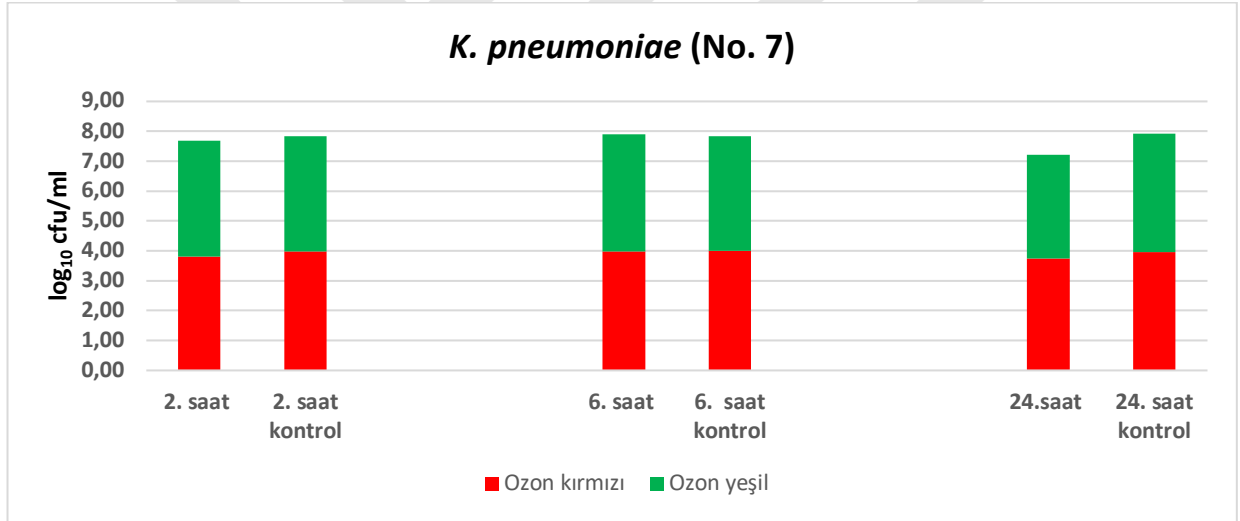
Şekil 26. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 13 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)

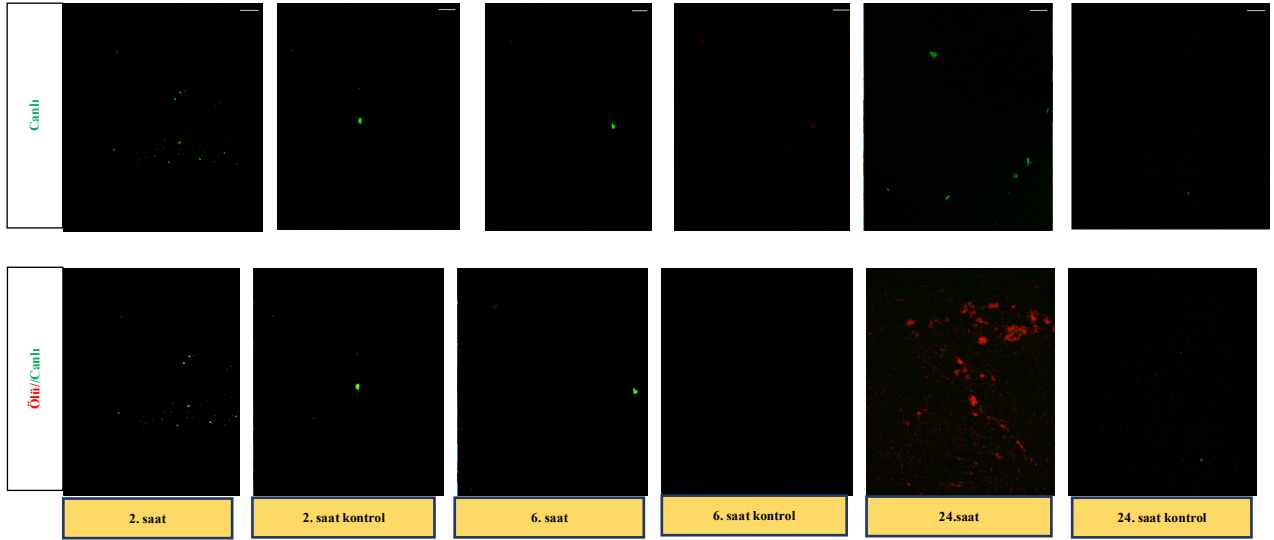


Şekil 27. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 14 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)

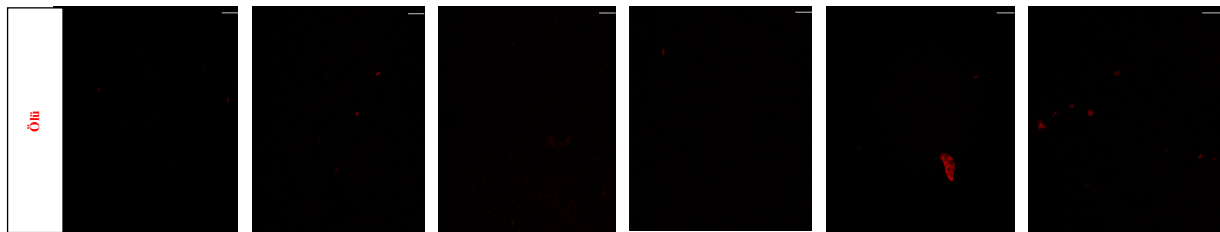
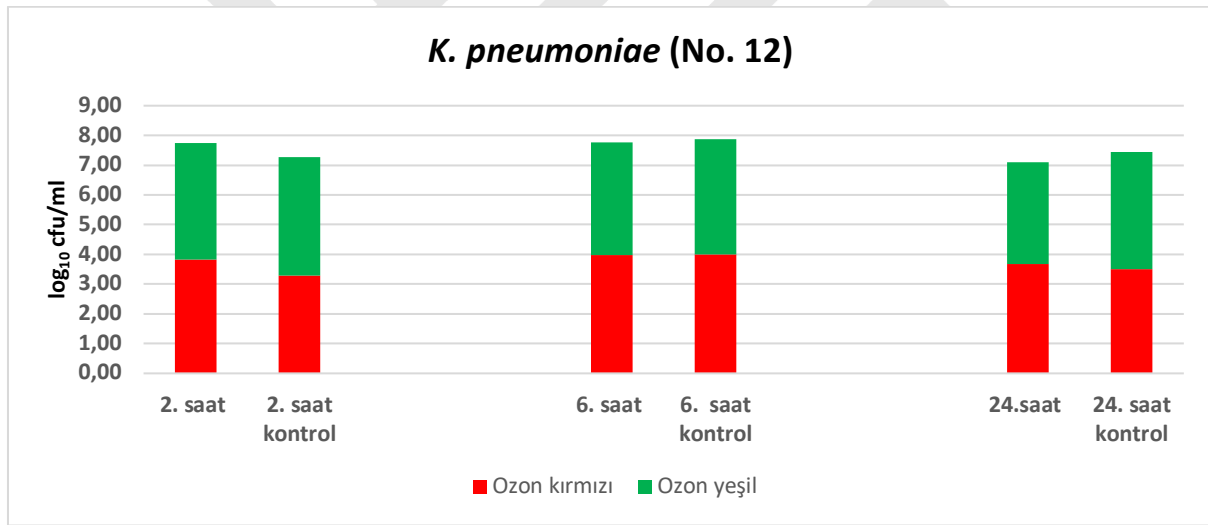


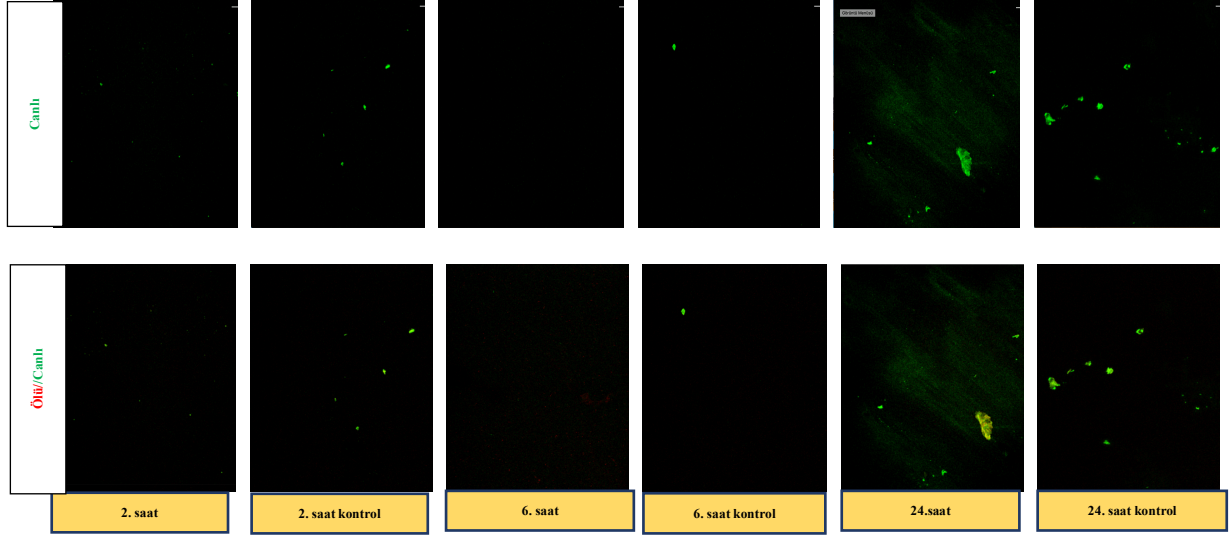
Şekil 28. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı *K. pneumoniae* suşunun rifampisin uygulanmamış kendi kontrolleri ve rifampisin (0.1 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)



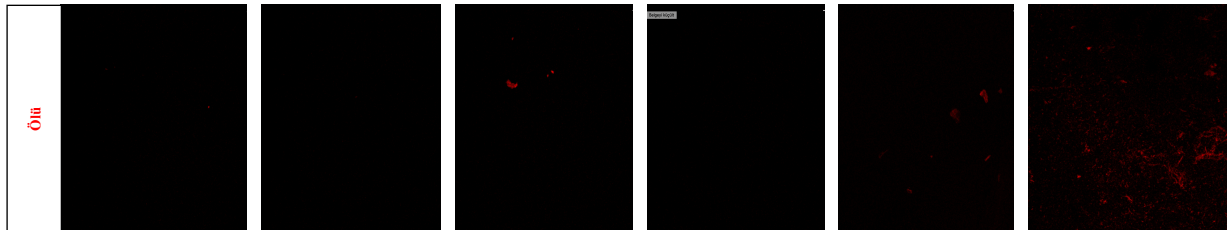
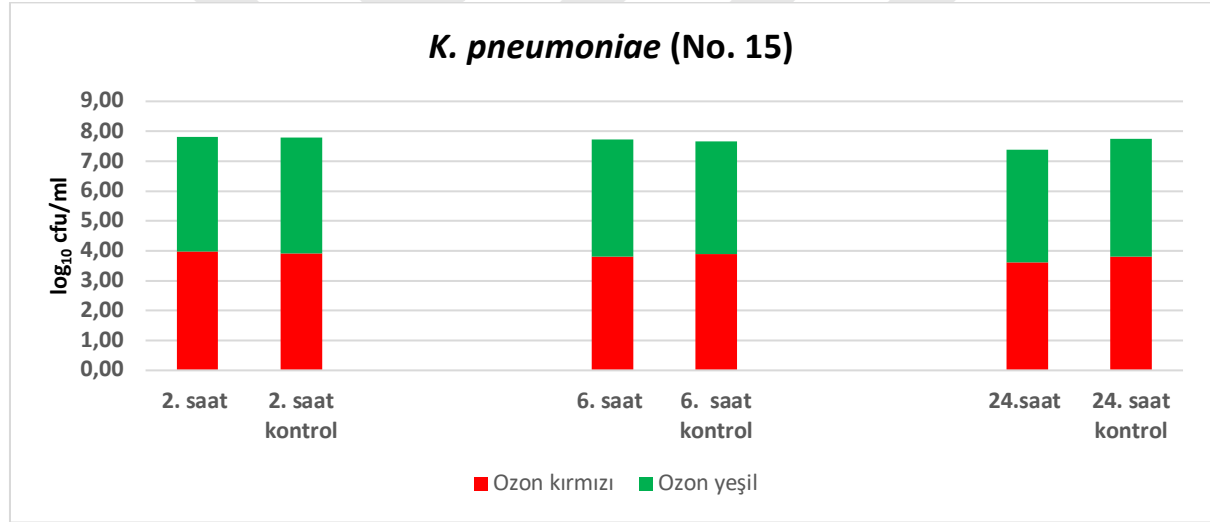


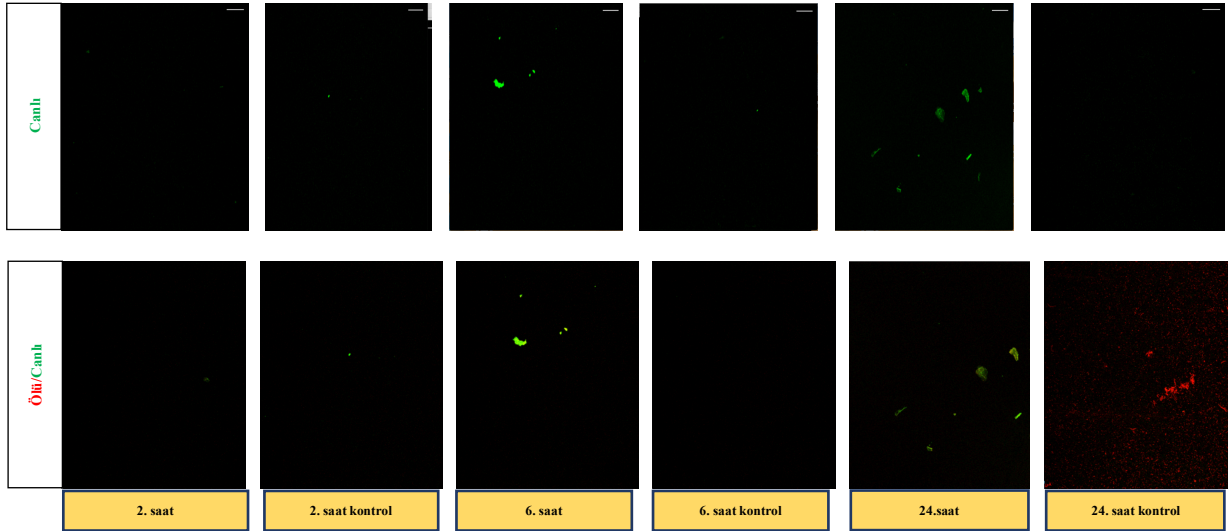
Şekil 29. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 7 numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su ($4.78 \mu\text{g} / \text{ml}$) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)





Şekil 30. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 12 numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su ($4.78 \mu\text{g}/\text{ml}$) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)





Şekil 31. Lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle 15 numaralı numaralı *K. pneumoniae* suşunun ozonlu su uygulanmamış kendi kontrolleri ve ozonlu su (4.78 µg /ml) uygulandığında 2., 6. ve 24. saatlerdeki etkilerinin, biyofilm içindeki canlı ve ölü bakterilerin sayısal ve görüntü olarak gösterilmesi. (Kırmızı: ölü bakteriler. Yeşil: canlı bakteriler.)

Tablo 9. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopisi Yöntemiyle NAC, Rifampisin ve Ozonun Biyofilm Tabakası Üzerine Etkilerinin Görüntülenerek Elde Edilen Canlı ve Ölü Hücrelerin Sayılarının Her izolatın, Her saatte (2., 6. ve 24. saatler) Kendi Kontrolüne Göre Etkinliklerinin Logaritmik Olarak Gösterilmesi.

Suş no	2. saat fark	Sonuç	6. saat fark	Sonuç	24. saat fark	Sonuç	Antibiyofilm ajan (mg/lt)
	log ₁₀ cfu/ml		log ₁₀ cfu/ml		log ₁₀ cfu/ml		
4/4K	0.02	–	0.33	–	0.38	–	NAC _{ölü} (2)
	0.87	–	0.78	–	0.19	–	NAC _{canlı} (2)
	0.4	–	0.14	–	0.12	–	RiF _{ölü} (0.1)
	0.5	–	0.96	–	0.02	–	RiF _{canlı} (0.1)
6/6K	0.11	–	0.47	–	0.36	–	NAC _{ölü} (2)
	0.14	–	0.67	–	0.24	–	NAC _{canlı} (2)
	0.67	–	0.36	–	0.12	–	RiF _{ölü} (0.1)
	0.43	–	0.59	–	0.4	–	RiF _{canlı} (0.1)
7/7K	0.17	–	0.02	–	0.21	–	Ozon _{ölü} (4.78)
	0.03	–	0.08	–	0.47	–	Ozon _{canlı} (4.78)
	0.5	–	0.6	–	0.28	–	NAC _{ölü} (2)
	0.43	–	0.08	–	0.06	–	NAC _{canlı} (2)
	0.48	–	0.63	–	0.23	–	RiF _{ölü} (0.1)
	0.22	–	0.02	–	0.63	–	RiF _{canlı} (0.1)
8/8K	0.19	–	0.02	–	0.54	–	NAC _{ölü} (2)
	0.39	–	0	–	0.1	–	NAC _{canlı} (2)
	0.06	–	0.37	–	0.55	–	RiF _{ölü} (0.1)
	0.13	–	0.03	–	0.38	–	RiF _{canlı} (0.1)
9/9K	0.12	–	0	–	0.23	–	NAC _{ölü} (2)
	0.14	–	0.01	–	0.45	–	NAC _{canlı} (2)
	0.4	–	0.44	–	0.24	–	RiF _{ölü} (0.1)
	0.14	–	0.83	–	0.02	–	RiF _{canlı} (0.1)
	0.53	–	0	–	0.16	–	Ozon _{ölü} (4.78)
	0.06	–	0.09	–	0.52	–	Ozon _{canlı} (4.78)

12/12K	0.68	–	0.23	–	0.33	–	NAC _{öü} (2)
	0.19	–	0.09	–	0.3	–	NAC _{canlı} (2)
	0.7	–	0.36	–	0.57	–	RİF _{öü} (0.1)
	0.32	–	0.11	–	0.30	–	RİF _{canlı} (0.1)
13/13K	0.73	–	0.41	–	0.52	–	NAC _{öü} (2)
	0.15	–	0.13	–	0.33	–	NAC _{canlı} (2)
	0.4	–	0.37	–	0.29	–	RİF _{öü} (0.1)
	0.5	–	0.3	–	0.51	–	RİF _{canlı} (0.1)
14/14K	0.03	–	0	–	0.16	–	NAC _{öü} (2)
	0.33	–	1.19	–	0.64	–	NAC _{canlı} (2)
	0.27	–	0.79	–	0.39	–	RİF _{öü} (0.1)
	0.45	–	0.75	–	0.43	–	RİF _{canlı} (0.1)
15/15K	0.06	–	0.09	–	0.2	–	Ozon _{öü} (4.78)
	0.03	–	0.15	–	0.15	–	Ozon _{canlı} (4.78)
	0.82	–	0.41	–	0.64	–	NAC _{öü} (2)
	0.13	–	0.23	–	0.45	–	NAC _{canlı} (2)
	0.76	–	0.42	–	0.74	–	RİF _{öü} (0.1)
	0.24	–	0.71	–	0.13	–	RİF _{canlı} (0.1)

K: Kontrol, (+) etkili, (–) etkisiz.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

PDR bakterilerle gelişen infeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite nedenleri olarak gündemimizde bulunmaktadır. Bu infeksiyonlar ve etkenleri giderek daha da zor tedavi edilir hale gelmektedir. Bunun sonucunda hastalar uzun süre hastanede yatmak zorunda kalmakta, hastaların önemli bir kısmı hayatını kaybetmekte ve ayrıca yatış maliyetleri de artmaktadır.

Çalışmamızda giderek çözümü zor hale gelen ve hastanemizde de önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan PRKp bakterisi ve geliştirdiği direnç sorununa çözüm aranmaya çalışılmıştır. *K. pneumoniae* söz konusu olduğunda, özellikle çoklu ilaca dirençli kökenlerin neden olduğu epidemik hastane infeksiyonlarından korkulmaktadır. Son yıllarda, *Enterobacteriaceae* üyelerinde, özellikle de *K. pneumoniae* kökenlerinde, hızla yayılmakta olan karbapenem direnci günümüzün en büyük sağlık sorunlarından birisi haline gelmiştir (11,12).

Bu çalışmada, *K. pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemede başlangıçta disk difüzyon yöntemi uygulanmış, daha sonra sıvı mikrodilüsyon ve gradyan testi kullanılarak MİK değerleri belirlenmiştir. İzolatların antimikrobiyal kategorilerde tüm ajanlara dirençli oldukları gösterilmiş ve hepsi PDR olarak tanımlanmıştır. PRKp izolasyonu yapılan hastaların tümünün tedavisinde kolistinle birlikte meropenem veya imipenem kombine olarak kullanılmıştır. Karbapenem grubu antibiyotikler kullanıldığı ve hastanemizde OXA-48 ve NDM-1 tipi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşları endemik hale geldiği için, bu suşlarda karbapenemaz tipi PZR yöntemiyle araştırılmış ve en yaygın karbapenemaz tipinin tüm

suşlarda OXA-48 olduğu belirlenmiştir. Ancak, sadece bir suşta (12 no'lu) OXA-48 ve NDM-1 genleri birlikte saptanmıştır.

Biyofilmin kütlesi, kalınlığı, canlılığı ve EPS miktarını ölçmek için farklı fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmamızda agarda koloni sayma yöntemi, mikropakta kristal viyole boyasıyla optik dansite ölçümü ve lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemi kullanılmıştır.

Bakterilerin biyofilm oluşturup oluşturmadıkları ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla mikropakta kristal viyole boyasıyla optik dansite ölçümü kullanılmıştır. Bu yöntem, çok sayıda izolatın biyofilm oluşturma yeteneğinin hızlı ve basit bir biçimde taranmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu yöntemin, testin yapılması sırasında örneğin yıkama işlemi uygulama hatalarından dolayı duyarlılığı düşüktür. Tekrarlanabilirliğinin olmaması ve bu ölçümle ilişkili standardize edilmiş protokollerin olmaması bu yöntemin dezavantajları arasındadır (170). Çalışmamızda hem biyofilm oluşturma yeteneklerinin gösterilmesi hem de antibiyofilm etkinliği ajanların biyofilme etkilerinin araştırılmasında bu yöntem kullanılmıştır. Sonuçlar her bir suş için iki kez tekrarlanmıştır.

NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm üzerine etkileri kristal viyole boyası kullanılmadan optik dansite ölçümüyle ayrıca belirlenmiştir. İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri bu test edilen ajanların etkileri koloni sayma yöntemiyle belirlendiği için kristal viyole boyası kullanılmadan sadece bir kez uygulanabilmiştir. Boyama yapılamaması nedeniyle elde edilen sonuçlar koloni sayma yöntemiyle elde edilen sonuçlarla korele bulunmamıştır. Bu yüzden bulgularımıza eklenmemiştir. Koloni sayma yöntemi de, iş yükü çok fazla olduğu ve dört gün sürdüğü için üç sefer tekrarlanamamıştır.

Koloni sayma yöntemi, uygulaması kolay ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında rahatlıkla uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yöntemle, sadece kültürde üreyen canlı bakteriler tespit edilirken; canlı ancak kültürde üremeyen bakteriler tespit edilemez. Biyofilm oluşturmak için kullanılan mikropaklarda bakteriler agregatlar oluşturduğu için biyofilmdeki bakteri sayısı olduğundan daha az olarak saptanabilir. Bu testin diğer dezavantajı zaman alıcı ve iş gücünün yoğun olmasıdır (170). Çalışmada bu yöntemin seçilmesinin nedeni; rifampisin, NAC ve ozonun etkilerinin biyofilm üzerine etkinliğinin ilk defa deneniyor olmasından ötürü daha net sayısal verilere ulaşmaktır ve bu nedenle lazer taramalı konfokal mikroskopisiyle birlikte kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu direnç gelişmesine katkıda bulunan diğer önemli faktörler arasında bulunmaktadır. *K. pneumoniae* infeksiyonlarının patogeneğinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunan en önemli virülans faktörleri, kapsüler polisakaridler, tip 1 ve tip 3 pilidir (171-173).

İlk biyofilm oluşturan *K. pneumoniae* suşu 1988'lerin sonunda tanımlanmıştır (174). Biyofilm, bakteriler tarafından bulunduğu ortamda varlığını sürdürebilmek ve adaptasyonu kolaylaştırmak için geliştirilen doğal bir mekanizmadır. Bu yapının antibiyotik geçişini engelleyici özelliği, tedavi şansını çoğu kez ortadan kaldırmaktadır. Biyofilm tabakasına erişen ve burada konsantrasyonu azalan antibiyotiklere karşı, bakteri genetik mekanizmalarını harekete geçirerek adaptif süreci başlatmaktadır. Bunun sonucunda da antibiyotik direncine neden olarak, tedavi sürelerini uzatmakta, tedavi olasılığını azaltmakta ve mortaliteyi artırmaktadır (1,175). Sonuç itibariyle biyofilm yalnızca bakterinin bulunduğu ortamda yaşamsal adaptasyonu sağlamak ve varlığını devam ettirecek bir korunma mekanizması değil, aynı zamanda infeksiyon açısından onu daha virülan kılan ve antibiyotik direnç gelişimine de katkı sağlayan oldukça önemli bir yapıdır (95,96,114,118).

Biyofilm oluşturan bakteriler kateter ve implant ile ilişkili infeksiyonların yanı sıra kistik fibrozlu, kronik yaraları ve kronik otitis mediası olan hastalarda hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olmaktadır. Her yıl dünyada milyonlarca insanı etkilemekte olan bu bakteriler yüksek mortalite oranına sahiptir (176). *K. pneumoniae* gibi nozokomiyal fırsatçı mikroorganizmaların konak doku yüzeylerinde biyofilm oluşturma becerisi infeksiyonun gelişiminde kritik bir aşamadır. Bu nedenlerden dolayı, ilgili infeksiyonların tedavisi için biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşturan bakteriler hakkında ayrıntılı bilgi edinilmesi gereklidir. Ek olarak, baskın türlerin tanımlanması için genetik çeşitliliğin belirlenmesi, infeksiyonların hastanelerde yayılmasını önlemede yararlı olabilir. Baskın izolatların genotipinin bilinmesi bir infeksiyon kaynağının tanımlanmasında, önleyici prosedürlerin ve infeksiyon kontrolünün uygulanmasında önemlidir. Bununla birlikte biyofilm infeksiyonu gelişen hastalarda asıl sorun izole edilen bakterilere yönelik uygun antibiyotiklerin kullanılmasına rağmen, yeterli tedavi yanıtının alınmamasıdır (136,177,178). Planktonik mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları dilüsyon yöntemleri kullanılarak (MİK değerleri) belirlenmektedir (179). MİK testi kullanılarak izolatın dirençli olduğu gösterildiyse, o antibiyotik klinik olarak etkisiz kabul edilmektedir. Bunun dışında, bakteriyel biyofilm varlığına bağlı olarak *in vitro* şartlarda etkili olduğu gösterilen antibiyotikler *in vivo* ortamlarda biyofilm üzerine yeterli etkinliği gösteremezler (180,181). Biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemede farklı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu işlem MBEK değerinin belirlenmesi olup, biyofilmin antibiyotik duyarlılığına etkisi daha rasyonel değerlerle ortaya konulmaktadır.

Sadıç ve arkadaşlarının 2018 yılında hastanemizde yaptığı çalışmada (182), tedavide en çok kullanılan meropenem ve kolistin kombinasyonunun *K. pneumoniae* suşlarının serbest ve

biyofilm formlarında tüm yöntemlerle aldirmazlık etkisi gösterdiği, bu durumda meropenem ve kolistin K. pneumoniae kaynaklı infeksiyonların tedavisinde uygun bir seçenek olmadığı ve biyofilm üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, biyofilmdeki bakteriyi eradike etmek için gereken antibiyotik konsantrasyonunun MİK değerinin çok üzerinde olacağı ve bu dozların klinik uygulamada kullanılamayacağı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, PRKp izolatlarında, biyofilm tabakasına etkili olması beklenen NAC, rifampisin ve ozon gibi antibiyofilm etkinliktli ajanların etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla, başlanguçta klinik örneklerden elde edilen K. pneumoniae izolatlarının biyofilm oluşturma özellikleri, kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak araştırılmış ve izolatların hepsi (%100) biyofilm oluşturma kapasitelerine göre yüksek düzeyde biyofilm oluşturan suşlar olarak sınıflandırılmıştır. Ancak örnek türüne göre biyofilm oluşturma özelliği açısından bir fark gözlenmemiştir.

Seifi ve arkadaşlarının (167) 2016 yılında yaptıkları çalışmada, biyofilm analizine göre 94 K. pneumoniae izolatının %52.1 (n = 49)'i orta düzeyde biyofilm oluşturan, %33 (n = 31)'ü yüksek düzeyde biyofilm oluşturan, %8.5 (n = 8)'i zayıf biyofilm oluşturan ve %6.4 (n = 6)'ü biyofilm oluşturmeyen şekilde sınıflandırılmıştır.

Biyofilm oluşumu antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini ve gelişecek infeksiyonların sonuçlarını etkilemektedir (173, 184). Yang ve arkadaşları (185) 2008'de idrar, balgam, yara sürüntüsü ve kandan izole edilen K. pneumoniae suşlarının biyofilm oluşumu üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada izolatların %62.5'inin biyofilm oluşturduğu bulunmuştur; bu sayı bizim çalışmamızda elde edilen sonuçtan düşüktür. Bu durum suşların genetik özelliklerindeki ve biyofilm oluşturma yeteneklerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir. Seifi ve arkadaşları (167), 94 K. pneumoniae suşunda biyofilm oluşumunu değerlendirmiş ve %93.6'sının biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Saeed ve arkadaşlarının (186) yaptığı başka bir çalışmada ise, üç K. pneumoniae suşunda biyofilm oluşumu değerlendirilmiş ve tümünün biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir.

Bakteri türlerine göre izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Sadıç ve arkadaşlarının (182) hastanemizde yaptığı başka bir çalışmada, Pseudomonas spp., K. pneumoniae, Acinetobacter spp.'de biyofilm oluşturma oranları sırasıyla %63.6, %94, %100 olarak saptanmıştır. Bizim sonuçlarımıza benzer oranda K. pneumoniae suşlarının biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir.

Aynı türün farklı izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri farklı olabilmektedir. Bir çalışmada (187), P. aeruginosa'da biyofilm oluşumu kalitatif tüp yöntemiyle

değerlendirilmiştir. İzolatların %20'si yüksek düzeyde, %21.25'i orta düzeyde ve %58.75'inin zayıf düzeyde biyofilm oluşturan/biyofilm oluşturmayan suşlar olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda örnekler; dört hastada kandan, üç hastada balgamdan, bir hastada yara yerinden ve bir hastada da idrardan izole edildi. Farklı örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri arasında belirgin bir fark saptanmadı. Seifi ve arkadaşları (167) 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, balgam, yara ve idrar örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının kandan elde edilen suşlarla kıyaslandığında yüksek ve orta derecede biyofilm oluşturma yeteneğinin daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, biyofilm oluşturma yeteneğinin balgamdan elde edilen izolatlar arasında en yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir. İki merkezin katılımıyla gerçekleşen başka bir çalışmada (188) ise, farklı infeksiyon bölgelerinden alınan örneklerden elde edilen *K. pneumoniae* suşlarının biyofilm yapma kapasitesi %93.6 iken, solunum yollarından izole edilen suşlarda %100 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla bizim çalışmamız arasındaki farklılık, çalışılan suş sayısının az olmasından kaynaklanabileceği gibi, biyofilm oluşturan suşların aynı zamanda antibiyotiklere de yüksek oranda direnç geliştiren suşlar olduğunun bilinmesi ve çalışmamızdaki tüm suşların panrezistan suşlar arasından seçilmesiyle açıklanabilir.

Bakterilerin biyofilme penetrasyonunun sınırlı olmasının EPS veya matriks varlığına bağlı olduğu öne sürülmektedir. Matriks, bakterilerin antibiyotik varlığında sağkalımına izin verecek şekilde kimyasal bir geciktirici olarak rol oynar. Farklı mikroorganizmalar farklı miktarlarda EPS üretir ve üretilen EPS miktarı biyofilmin yaşıyla birlikte artar (189). Bu nedenle çalışmamızda biyofilm oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırmanın yanında her suş mukoid fenotip ve EPS oluşturma yeteneğine göre de değerlendirilmiştir. Yüksek düzeyde biyofilm oluşturan suşların hepsi mukoid fenotip göstermiş ve PDR suşlarının çoğu güçlü EPS üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Resim 2B ve Resim 4C). Çalışmamızda 24 saatlik bazal biyofilm oluşumu (0. saat) olarak değerlendirilmiş, antibiyofilm etkili ajanların biyofilm tabakasına etkinliği 2.saat, 6. saat, 24. saat ve 72. saatte değerlendirilmiştir. Hem boyama yöntemleri hem de lazer taramalı konfokal mikroskopisi incelemelerinde biyofilm yaşlandıkça özellikle de 72. saate gelindiğinde EPS üretiminin arttığı ortaya konulmuştur (Resim 2B ve 4C). Vuotto ve arkadaşlarının (168) 2017 yılında yaptığı bir çalışmada, XDR izolatlarının, MDR ve duyarlı suşlarla karşılaştırıldığında biyofilm oluşturma (%91-07) ve polisakarid (%78'e 57) üretme yeteneğinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, mukoid fenotip varlığıyla antibiyotik direnç profili ve biyofilm oluşturma becerisi arasında korelasyon saptanmamıştır. Bu çalışmanın aksine, Diago-Navarro ve arkadaşlarının (190) 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, kan dolaşımı infeksiyonuna yol açan *K. pneumoniae* izolatlarının (n=40)

mukoid fenotip göstermesiyle antibiyotik direnç profili ve biyofilm oluşturma becerisi arasında korelasyon gösterilmiştir. Singla ve arkadaşları (191) tarafından 2012 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, yaşlı biyofilme genç biyofilme göre matriksin polisakarid bileşeninin üretiminin arttığı; bu durumun da amikasin ve siprofloksasin direncinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmanın bulguları EPS üretiminin artmasının yaşlı biyofilmi antibiyotiklere dirençli hale getirdiğini ve biyofilmdeki bakterilere karşı antibiyotiklerin erken başlanmasıyla biyofilm yaşlandıkça daha önemli hale geldiğine işaret etmiştir. Bizim çalışmamızda da bakterilerin 24 saat gibi kısa bir sürede biyofilm oluşturmaya başladıkları gözlenmiştir. Yaşlı biyofilmlerin antibiyotiklere daha dirençli oldukları bilindiği için, tedavide kullanılması amaçlanan NAC, rifampisin ve ozon gibi antibiyofilm etkinliği olan ajanların en erken sürede tedaviye eklenmesi ve biyofilm tabakasını ortadan kaldıracak ajanların hangi saatlerde etkili olduklarının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda antibiyofilm etkinliği ajanların biyofilm tabakası üzerine etkileri, *K. pneumoniae* izolatlarının 24 saatlik biyofilm oluşturulduktan sonra denenmiştir. Bunun nedeni; infeksiyon kliniği gelişen hastaların hastaneye başvurana kadar geçen süre içinde çoğunlukla infeksiyona bağlı olarak biyofilm tabakası oluşmuş olarak gelmeleridir. Bunun dışında hastanede yatan hastalarda hastane infeksiyonları gelişmekte, hastalardan örnek alıp kültürde üreme gerçekleştikten sonra, izole edilen bakterinin tanımlanması için gereken süre 24-48 saat gibi uzun bir süre almaktadır. Hastaya antimikrobiyal tedavi için danışılana kadar geçen süreçte bakteri, biyofilm oluşumuna başlamaktadır. Birçok çalışmada, kateter, sonda ucu ve implant gibi farklı yüzeylere geri dönüşümsüz tutunmanın 20 dakika ile maksimum 4 saat arasında bir sürede gerçekleştiğine (192-194); biyofilm oluşumunun ise 24 saat gibi kısa bir sürede, oluşmaya başladığına işaret edilmektedir (195,196). Çalışmamızda, oluşmuş biyofilm tabakası üzerine antibiyofilm etkili ajanların 2. saat, 6. saat, 24. saat ve 72. saatteki etkileri araştırılmıştır. Bunun sebebi de NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm tabakasına etki ettiği en erken zamanın ve etkinliğinin ne kadar süreyle devam ettiğinin tespit edilerek klinik kullanımda uygulama zamanlamasının belirlenebilmesini sağlamaktır.

Biyofilm içerisindeki bakterilerin dirençli olması nedeniyle hem kimyasal (antibiyotikler, dezenfektanlar) hem de biyolojik (bakteriyofaj, enzimler) antimikrobiyal ajanlar biyofilmi tümüyle ortadan kaldırmada etkisiz kalmaktadır. Bakterilerde direnç problemini çözmeye biyofilm oluşumunu önlemek, oluşmuş biyofilmleri parçalayarak antibiyotiklerin biyofilm içine girişini artırmak için NAC, ozon, rifampisin gibi yeni farmakolojik yaklaşımlar denenmektedir.

NAC, sistein aminoasidinden türetilmiş bir moleküldür. Reaktif oksijen türleri dengesi ve homeostazında yer alan glutatyonun hücrel üretimini artırdığı için genellikle antioksidan olarak kullanılır. NAC kullanımı, bakterinin biyofilm oluşturmasını önlemede alternatif farmakolojik yaklaşım olarak önerilmektedir. Bazı *in vitro* çalışmalarda NAC'ın çeşitli bakterilerin biyofilm oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Dahası, NAC hem oluşmuş olan biyofilmi parçalayabilir hem de EPS (197) üretimini azaltarak biyofilmin oluşmasına engel olabilir (198,199). Tıbbi uygulamada inhalasyon, oral ve intravenöz olarak bu ajan yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, topikal NAC mukusun içine geçip fizyokimyasal özelliklerini değiştirerek belirgin bir mukolitik etki ve doğru anatomik hedefe yüksek konsantrasyonlarda ulaşma sağlamaktadır. Birçok çalışmada, inhale NAC formülasyonlarının antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında etkili olduğu gösterilmiş, bu etki ise büyük olasılıkla NAC'ın biyofilm oluşumunu önleyici ve biyofilmi parçalayıcı etkisine bağlanmıştır (200-203). Bu konuda yapılan diğer iki çalışma, Aslam ve arkadaşları (204), El-Feky ve arkadaşları (201) tarafından yapılmıştır. Vasküler ve üreteral kateterler üzerinde *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilen biyofilm oluşumunun önlenmesinde tipik antimikrobiyal ilaçlarla birlikte NAC'ın etkinliğini gösteren *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Her iki makalede, kateterlerin uzun süre kullanılmasında tek başına antibiyotiklerle yapılan tedaviye göre antibiyotikle birlikte NAC verilen hasta grubunda daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu çalışmalardan yola çıkarak, yüksek dozlarda dahi güvenle kullanılabilir olması ve yan etki görülme oranının düşük olması nedeniyle PRKp infeksiyonuna çözüm bulmak umuduyla çalışmamızda NAC'ın biyofilm üzerine etkinliği incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Ancak, etkili bulunamamıştır.

Rifampisin, Gram-pozitif bakterilere karşı bakteriyel proteinlerin sentezini inhibe ederek etki gösterir (205). Rifampisin biyofilm içine iyi penetre olduğu ve biyofilmdeki bakterileri öldürdüğü birçok çalışmada gösterilmiştir (206). Rifampisin etkinliği ile ilgili çalışmalar, genellikle Gram-pozitif bakterilerin oluşturduğu biyofilm üzerine yapılmıştır. (207-209). Günümüzde PRKp infeksiyonlarının mortalite oranlarının yüksek olması ve tedavi etmede yaşanan zorluklar nedeniyle antibiyotik kombinasyon çalışmaları yapılmaktadır. Tascini ve arkadaşlarının (210) yaptıkları çalışmada, 13 adet kolistine dirençli KPC üreten *K. pneumoniae* izolatında on antibiyotik kombinasyonu ile dama tahtası yöntemi denenmiştir. Bu on antibiyotik kombinasyonunda en fazla (8/13) kolistin ve rifampisin kombinasyonunda sinerjistik bakteriyel etkinlik elde edilmiştir. Elemam ve arkadaşlarının (211) yaptıkları çalışmada, 12 adet kolistine dirençli KPC üreten *K. pneumoniae* izolatının hepsinde rifampisin ve kolistinle sinerjistik etki

gözenmiştir. Zimmerli ve arkadaşlarının (212) yaptığı çalışmada, stafilokokların etken olduğu ortopedik implantlarla ilişkili infeksiyonu olan ve siprofloksasin ve rifampisinle tedavi edilen hastalarda %100 kür oranı elde edildiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, rifampisin ve siprofloksasin kombine kullanıldığında *Enterobacteriaceae* ailesi üzerine sinerjistik etki gösterdikleri belirlenmiştir (213). Bizim ülkemizde de OXA-48 ve son dönemde NDM-1 pozitif PRKp izolatlarında artış görüldüğü için biyofilm oluşturma kapasitesine sahip bu suşların tedavisinde alternatif olarak kullanılabilir bir ajan olan rifampisinin biyofilm üzerine etkinliği araştırılmıştır. Biyofilm oluşturan *Enterobacteriaceae* ailesindeki Gram-negatif bakterilerde rifampisinin biyofilm üzerine etkisiyle ilgili literatürde araştırdığımız kadarıyla çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada rifampisinin biyofilm üzerine etkisi araştırılmış, ancak etkili bulunamamıştır. Test sonuçlarına göre etkili olduğu gösterilseydi siprofloksasin veya kolistin gibi antibiyotiklerle kombine edilerek daha ileri çalışmalarla sinerjistik etkisinin olup olmadığı araştırılacaktı.

Ozon, atmosferde oluşan oksijenin (O_2) üç değerlikli (O_3) formudur. Ozon inaktif formda bulunur ve 20-30 dakikalık bir sürede tekli oksijen atomunu salınarak iki atoma parçalanır ve aktif hale gelir. Doğada bulunan en güçlü oksidanlardan biri olarak kabul edilir, ancak terapötik etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Etki mekanizmasının olası açıklamalarından bazıları; hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin ozonoliziyle peroksitlerin üretilmesi; çeşitli biyolojik işlemlerin (ATP'nin artan üretimi de dahil olmak üzere) fizyolojik güçlendiricileri olarak işlev gören reaktif oksijen türlerinin üretimi veya aktivasyonu; antioksidan aktivitesi olan hücre içi enzimlerin artan ekspresyonu olarak bildirilmektedir. Ozona maruz kalan dokularda sitokinler (IFN- γ , TNF- α , TGF- β ve IL-8) gibi çeşitli biyolojik faktörlerin, CD11b gibi adezyon moleküllerinin ve akut faz reaktanların seviyesinde değişiklik olduğu; epitel hücrelerine periferik kan polimorfonükleer hücrelerin hareketliliğinin, fagositik aktivitelerinin ve adezyonunun arttığı gösterilmiştir. Biyo-oksidatif tedavilerin ardındaki mantık (ozonun güçlü bir oksitleyici ajan olduğu gibi); vücudun antioksidan ihtiyacının karşılanması koşuluyla belirli oksidatif maddelerin kullanımının kan dolaşımından hücrelere oksijen atomlarının hareketini artırmasıdır. Dokulardaki daha yüksek oksijen seviyeleriyle hasarlı dokulardaki bakteriler, mantarlar ve viruslar öldürülürken sağlıklı hücreler daha hızlı çoğalacak ve daha güçlü bir bağışıklık yanıtı elde edilecektir. Bununla birlikte, dokulardaki yüksek oksijen seviyeleri mikroorganizmaların yaşayabilmesi için gerekli anaerobik ortam bozulacak ve bu şekilde zararlı mikroorganizmalar öldürülebilecektir.

Ozon ve ozonasyon tedavilerinin kullanımının tıp, tarım, denizcilik ve gıda sektörü gibi birçok farklı alanda, mikroorganizmaları ortamdaki kaldırmak için antimikrobiyal ajan olarak kullanıldığı kanıtlanmıştır (214,215). Periodontolojide de ozon tedavisinin standart dezenfektan ve antiseptiklere alternatif olarak kullanımı son zamanlarda popüler bir araştırma konusu olarak ortaya çıkmaktadır. Ozonlanmış distile su (4 mg/lit), ağız ortamındaki Gram-negatif bakterileri, Gram-pozitif bakterileri, *Candida albicans*'ı ve buna ek olarak plak biyofilmindeki bakterileri öldürebilme kapasitesine sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (216).

Gıda sektöründe ozonun süt ürünleri, meyve, sebze, et ve balık gibi farklı kategorilerdeki ürünlerin dekontaminasyonunun yanı sıra, gıdaların doku özelliklerini modifiye etmek ve enzimatik aktiviteleri inaktivite etmekte etkin bir ajan olduğu gösterilmiştir (217,218). Günümüzde, gıda zincirinde besinlerde oluşan mikrobiyal biyofilmlere karşı ozonun etkinliği konusunda çalışmalar oldukça nadirdir. Gıda sektöründe de ozonun gıdaların dekontaminasyonunda farklı bakteri türleri üzerinde, farklı konsantrasyonlarda gaz (0.1-20 ppm) ve sıvıda (0.5 ppm) dinamik veya statik etkileri araştırılmıştır (219-221). Statik şartlardaki işlemlerde, ozonlu su ilk uygulandığında ozon konsantrasyonunun yüzeylerde maksimum düzeyde olduğu, ancak stabil olmaması nedeniyle ozonun yarılanma ömrünün 10 dakika gibi kısa bir sürede aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Dinamik şartlardaki işlemlerde ise, ozonlu su devamlı çalışan bir ozon jeneratöründen sürekli akım halinde ozon konsantrasyonu sabit tutularak işleme tabi tutulmuştur. Çalışmada, bakteri türüne bağlı olmadan, yüzeye tutunan (2 saatte) ve gerçek biyofilm oluşturmuş (48 saatte) bakterilerin, ozonlu suyla inaktivasyon hızı, dinamik şartlarda statik şartlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada, statik şartlardaki daha düşük biyofilm inaktivasyon hızlarının, ozonun stabil olmaması ve buna bağlı olarak sudaki ozon konsantrasyonunun progresif olarak azalıyor olmasına bağlanmıştır. Aynı çalışmada test edilen işlem şartlarında ozonun yarılanma zamanı 10 dakika olarak vurgulanmıştır. Buna rağmen statik şartlarda işlem sonunda (20 dakika), mikrobiyal yükteki logaritmik azalma üç tür içinde benzer (2.24-2.43 log₁₀ cfu/cm²) olarak bulunmuştur. Ancak dinamik şartlarda uygulanan işlemlerde, mikroorganizmaların işleme duyarlılığının farklı olduğu gösterilmiştir (222). Bizim çalışmamızda da iki farklı ozon konsantrasyonu 0.6 mg/lit'de 15 dakika ve 4.78 mg/lit 10 dakika olarak statik şartlarda uygulanmıştır. Statik şartlardaki ozonun biyofilm tabakası üzerine etkinliği koloni sayma yöntemi ve lazer taramalı konfokal mikroskopi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. 0.6 mg/lit'de denenen ozonlu suyun 2. saat, 6. saat ve 72. saatlerde her bakterinin kendi kontrolüne göre etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Konsantrasyon artırılarak 4.78 mg/lit'de elde edilen ozonlu su denendiğinde ise, 72. saatte her

bakterinin kendi kontrolüne göre etkili olduğu (2.06-4.08 log₁₀ azalma) gösterilmiştir. Ozon konsantrasyonu yükseldikçe etkisinin arttığı bariz olarak gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada, ozonlu su kullanılan cihaza bağlı olarak en yüksek 4.78 mg/lit konsantrasyonda elde edilebilmiş, daha yüksek konsantrasyonda ozonlu elde edilememiştir. Gürsoy ve arkadaşlarının (223) 2018 yılında ozon ve negatif iyon uygulamasının çeşitli bakteriler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde yapılan ozon gazı konsantrasyon testlerinde; beklenildiği gibi ozon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak çok daha güçlü bakteriyel inhibisyon sağlandığı gözlenmiştir. İlk 10 dakika içerisinde yaklaşık 2 logaritmalık bir düşüşle en hızlı inhibisyon *E. coli*'de görülmüş ve ozon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak 40 dakikalık uygulama sonunda bakteri sayısı tamamen sıfırlanmıştır. *S. aureus*'ta benzer şekilde ozon konsantrasyonunun artırılmasıyla birlikte daha hızlı bir azalma olduğu gösterilmiş ve üçüncü saatte bakteri sayısının sıfırlandığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da daha yüksek ozon konsantrasyonu (örneğin, 80-100 mg/lit) elde edilebilseydi etkisinin daha yüksek olacağı ve daha başarılı sonuçların elde edileceği düşünülmektedir. Bunun ileri çalışmalarla test edilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda medikal ozon daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı şeklinde konsantrasyonu 1 ve 100 µg/ml (%0.05–5 O₃) arasında kullanıldığı gösterilmiştir (224). Dolayısıyla bizim kullandığımız ozon konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu görülmekte ve vücutta dokulara toksik etkisi olmadan daha yüksek konsantrasyonlarının kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Ozonun genç ve yaşlı biyofilmler üzerine etkinliğinin değiştiği çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Örneğin, Bialoszewski ve arkadaşlarının (225) 2011 yılında yaptığı çalışmada, 48-72 saatlik yaşlı biyofilmlerin ozonlu suyun bakterisid etkisine daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ramzy ve arkadaşlarının (226) yaptığı başka bir çalışmada ise, periodontitis tanısı olan 22 hastaya haftada bir kez olmak üzere (7 günlük biyofilm tabakasına) dört hafta süresince her seansta en az 5-10 dakika, 150 ml ozonlu su uygulanmıştır. Plak biyofilmindeki bakteri sayıları tedavi öncesi ve sonrası kaydedilmiştir ve bakteri sayılarında önemli miktarda azalma saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer şekilde 72 saatlik biyofilm tabakası üzerine ozonlu suyun etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ozonlu suyla biyofilmdeki bakteri sayısında 2.06-4.08 log₁₀'luk azalma saptanmasıyla birlikte, tam eradikasyon sağlanamamıştır. Bunun nedeni; ozon konsantrasyonunun düşük olmasının yanı sıra tüm izolatların mukoid fenotip göstermesi ve biyofilmdeki bakteri yükünün çok yüksek olmasıyla ilişkili olabilir. Bialoszewski ve arkadaşlarının (225) yaptığı çalışmada, ozonlu suyun *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarının oluşturduğu biyofilmlere karşı bakterisid etkinliği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, *P.*

aeruginosa biyofilmleri, *S. aureus*'un oluştuğu biyofilmlere kıyasla ozonlu suya daha dirençli saptanmıştır. Bunun sebebinin, *P. aeruginosa* suşlarının kistik fibrozisli hastalardan elde edilmeleri ve mukoid formda olmaları nedeniyle hem su hem de gaz halindeki ozonun hücre dışı matriks boyunca daha zayıf penetrasyonundan kaynaklanabileceği düşünölmüştür. Ozonun etkinliği bakteri sayısıyla değişmektedir. Daha az bakteri yüküne sahip biyofilmlerde daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Gürsoy ve arkadaşlarının (223) yaptığı çalışmada, özellikle 1.5×10^5 cfu/ml ve daha düşük bakteri yükünde ortalama yarım saat içerisinde bakterilerin tamamen inhibe edilebildiği gösterilmiştir.

Hücre dışında abiyotik ya da biyotik ortamlarda biyofilm oluşturan bakterilerin dışında bazı bakteriler hücre içerisinde biyofilm benzeri yapılar oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, hücre içi patojen olmadığı düşünölen *E. coli* gibi bakterilerin konak hücresi içerisinde biyofilm benzeri bir yapı oluşturarak hücre içi yaşama adaptasyon sağladığını ve bu şekilde persistan hale gelebildiğini göstermektedir (227). Bu yapı, "biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluk" olarak adlandırılmaktadır ve ilk olarak üropatojenik *E. coli* (UPEC) izolatlarında belirlenmiştir (227,228). UPEC hücre içerisinde bakteri toplulukları, abiyotik yüzey biyofilmindeki ekstrasellöler matrikse benzer bir yapıyı barındırmaktadır. Bu topluluk genişledikçe, infekte konak hücresinin membranını dışa doğru ittirerek ayak benzeri bir çıkıntı oluşmasına sebep olur (229). Bunun sonucunda tek veya filamanlar halinde infekte hücreden ayrılabilir ve naif epitel hücrelerine tekrar tutunabilirler. Böylelikle, önceden infekte olmamış bir epitel hücresinin içerisine girerek biyofilm benzeri hücre içi topluluğunun oluşumunu başlatabilirler. Tersine olarak da, epitelin tekrar infeksiyonu sonucu pasif hücre içi rezervuarlar oluşturulabilir. Bu rezervuarların içerisindeki bakteriler metabolizmalarını yavaşlatıp inaktif hale geçerek aylarca hücre içerisinde kalarak reküransa sebep olurlar (230). Biyofilm benzeri hücre içi bakteri topluluğunun, böyle mekanizmalarla kronik infeksiyon gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Bu konuda yapılan literatür araştırması yaptığımızda *K. pneumoniae* ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için bu çalışmada PRKp suşlarının hücre içerisinde biyofilm oluşturma yetenekleri ayrıca araştırılmıştır. Akciğer kanseri hücreleriyle hazırlanmış tek tabaka hücre kültürlerine bakteriler inoküle edilerek, hücre içerisinde biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir. Hatta özellikle hücrelerin olmadığı alanlarda bakterilerin biyofilm oluşturmaya eğilimli olduğu tespit edilmiştir.

Lazer taramalı konfokal mikroskopisi, biyofilm heterojenliğini (canlı/ölü) değerlendirmede en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntem lokal biyofilm morfolojisinin

doğrudan mikroskopik görüntülenmesinin yanı sıra biyofilm kalınlığının da ölçümüne olanak sağlamaktadır. Konfokal mikroskopisi yönteminde floresan veren çok farklı boyalar kullanılmaktadır. Ticari olarak hazırlanmış ve standardize edilmiş canlı/ölü bakteri ayırımı yapan kitler piyasada bulunmaktadır (170). Bu çalışmada metabolizması aktif canlı bakterileri göstermek için FDA; ölü bakterileri göstermek için PI kullanılmıştır. Bu yöntemde NAC, rifampisin ve ozonun biyofilm üzerine etkileri 24. saate kadar denenmiş. NAC ve rifampisin için tüm izolatlarla, ozon için ise sadece 7, 12 ve 15 numaralı izolatlarla denenmiştir. Koloni sayım yöntemindeki sonuçlarla paralel olarak NAC ve rifampisinin biyofilm üzerine etkinliğinin olmadığı, her izolatin her saat için kendi kontrolüne göre canlı ve ölü hücre sayımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ozon için ise 24. saatte ölü ve canlı hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark (p değeri ≤ 0.05) saptanmıştır. Ancak, $2 \log_{10}$ ve üzerinde bir azalma sağlamadığı için etkili olmadığı düşünülmüştür.

Bu çalışmada, kültür yöntemiyle biyofilm içindeki canlı bakterilerin yükü ve sayısı hakkında kantitatif sonuçlar elde ederken; lazer taramalı konfokal mikroskopisi yöntemiyle de biyofilm içindeki canlı ve ölü hücrelerin oranı gösterilmiştir. Her iki yöntemin de kullanılması ile biyofilm hakkında önemli veriler elde edilmiştir. Her iki yöntemde avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte sonuçlarımıza göre bu tür biyofilm çalışmalarında her iki yöntemin çalışılması da önerilmektedir.

Bu çalışmaya dahil edilen hastaların beşi Genel Yoğun Bakım Ünitesi'nde, ikisi Travma Yoğun Bakım Ünitesi'nde, biri Ortopedi Servisi'nde, sonuncusu ise Nefroloji Servisi'nde yatmaktaydı. Bu hastalarda PRKp'nin etken olduğu nozokomiyal infeksiyonlar gelişti. Hastaların dördü bakteriyemi, üçü VİP, biri protez infeksiyonu, diğeri ise komplike idrar yolu infeksiyonu tanısı aldı. Tedavi başladıktan ortalama 9 gün (4-21) sonra hastalardan 7 (%77.7)'si geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmasına karşın kaybedildi. Hayatta kalan hastalarla ilgili olarak dikkat çekici olan, komplike idrar yolu infeksiyonu tanısı olan hastada idrar sondasının bulunması; protez infeksiyonu tanısı olan hastanın ise total eklem protezinin bulunmasıydı. İdrar sondası ve total eklem protezi gibi yabancı cisimlerin hastalarda biyofilm infeksiyonlarına neden olma olasılığı çok yüksektir. Yabancı cisimlerinin çıkarılması ve böylelikle biyofilmin ortadan kalkmasıyla bu hastaların iyileşmesi, çalışmamızdaki hipotezi desteklemektedir. Biyofilm infeksiyonu gelişen hastalarda oluşmuş biyofilm tabakasına yönelik ajanlar mevcut olsaydı ve bu hastaların tedavisinde kullanılabilseydi tedavi olarak hayatta kalabilirdi.

Sonuç olarak, PRKp izolatları ülkemizde ve dünyada tedavi açısından sorun oluşturan önemli bir patojendir. Bu çalışmada PRKp suşlarının büyük bir kısmı (%55.5) yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilmiştir ve hastane infeksiyonuna neden olan bakterilerdir.

Bu çalışmayla hastanemizde PRKp suşlarının oluşturduğu biyofilmler ile ilgili ilk veriler elde edilmiştir.

Biyofilm varlığının gösterilmesinde; koloni sayma yönteminin canlı bakterileri göstermesi açısından, lazer taramalı konfokal mikroskopisi yönteminin ise hem canlı hem ölü bakterileri birlikte göstermesi nedeniyle her iki yöntemin de kullanılması önerilmektedir.

Bu izolatlar OXA-48 ve NDM-1 tipi karbapenemaz üretmektedir. Özellikle Yoğun Bakım Ünitesi hastalarında kolonize olan bu bakteriler, hastanemizde endemik hale geçmişlerdir ve tedavi açısından büyük sorunlara neden olmaktadır. Bu izolatların hem PDR olmaları hem de biyofilm oluşturma yetenekleri tedavi şansını olanaksız hale getirmektedir. Bu çalışmada, sondası ve protezi çıkarılan hastaların infeksiyon kaynağı ortadan kaldırıldığı için sağ kaldıkları gözlenmiştir.

PRKp biyofilm oluşturma özelliğini karakterize etmenin yanı sıra, yüksek düzeyde biyofilm oluşturan bu izolatların tedavisinde kullanılacak farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle dirençli suşların tedavisinde NAC (2 mg/lt), rifampisin (0.1 mg/lt) ve ozon (0.6 mg/lt ve 4.78 mg/lt) gibi diğer ajanların belirli konsantrasyonlarda etkinliği ilk defa bu çalışmada test edilmiştir. Test sonuçlarına göre NAC ve rifampisin etkili bulunmamakla birlikte, ozonlu suyla 4.78 mg/lt konsantrasyonda bile bakteri sayısında $\geq 2 \log_{10}$ 'luk azalma sağlandığı gözlenmiştir. Daha yüksek ozon konsantrasyonunun kullanılması durumunda tedavi açısından başarılı sonuçların alınabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, ozonun daha yüksek konsantrasyonlarda denendiği takdirde başarılı sonuçlar alınabileceğine dair önemli veriler elde edilmiştir ve ön çalışma olması bakımından değer taşımaktadır.

Daha fazla suşla *in vitro* testlerin yapılmasının yanı sıra *in vivo* deneylerle de bu antibiyofilm etkinlikli ajanların etkinliklerinin gösterilmesi gerekmektedir. Bakterilerin hem biyofilm oluşturma kapasiteleri hem de panrezistan olmaları nedeniyle halihazırda kullanılacak tedavi seçeneklerinin bulunmaması, bu hastalarda mortalite oranlarının yüksek olması gibi nedenlerden dolayı, ilk etapta hastane infeksiyonu kontrol önlemlerinin sıkı olarak uygulanması ve eğitimlerin düzenli ve devamlı olarak yapılmasının ne kadar önemli olduğunu bir kez daha vurgulamıştır.

6. KAYNAKLAR

- 1) Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology Med Microbiol.* 2010; 59(3): 227-38.
- 2) Lin YT, Siu LK, Lin JC, *et al.* Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. *BMC microbiology.* 2012; 12(1): 13.
- 3) Martin, RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8(4): 1-15.
- 4) Iraz M, Düzgün A, Sandallı C, Doymaz MZ. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015; 35(6): 595-601.
- 5) Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(10): 1791-8.
- 6) Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa A, *et al.* NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2784-5.
- 7) Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arc Intern Med.* 2002; 162(9): 1021-7.
- 8) Victor LY, Hansen DS, Ko WC, *et al.* Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):986.
- 9) Yu WL, Ko WC, Cheng KC, *et al.* Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(10):1351-8.
- 10) Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(3): 284-93.
- 11) Akova M, Daikos GL, Tzouslevakis L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(5): 439-48.
- 12) Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(1): 60-7.

- 13) Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo- β -lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(5): 1868-73.
- 14) Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs.* 2009; 69(14): 1879-901.
- 15) Boyle DP, Zembower TR. Epidemiology and management of emerging drug-resistant Gram-negative bacteria: extended-spectrum β -lactamases and beyond. *Urol Clin North Am.* 2015; 42(4): 493-505.
- 16) Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms. *Curr Infect Dis.* 2018; 20(6): 13-8.
- 17) Infectious Diseases Society of America. The 10 \times 20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(8): 1081-3.
- 18) Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005; 40(9): 1333-41.
- 19) Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9): 2070-4.
- 20) Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of “old” polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(3): 213-23.
- 21) Dudhani RV, Turnidge JD, Coulthard K. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 1117-24.
- 22) Raz R. Fosfomycin: an old—new antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(1): 4-7.
- 23) Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomycin: an old, new friend? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29(2): 127-42.
- 24) Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, *et al.* Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10(1): 43-50.
- 25) Keating GM. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs.* 2013; 73(17): 1951-66.

- 26) Sauermann R, Karc R, Langenberger H, *et al.* Antibiotic abscess penetration: fosfomycin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(11): 4448-54.
- 27) Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos De, Rafilidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(2): 111-20.
- 28) Endimiani A, Patel G, Hujer KM, *et al.* In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 526-29.
- 29) Alexandre K, Fantin B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of temocillin. *Clin Pharmacokinet.* 2018; 57(3): 287-96.
- 30) Glupczynski Y, Huang TD, Berhin C, *et al.* In vitro activity of temocillin against prevalent extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae from Belgian intensive care units. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26(11): 777-83.
- 31) Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL, *et al.* In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 69(2): 564-67.
- 32) Balakrishnan I, Awad-El-Kariem F, Aali A, *et al.* Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(11): 2628-31.
- 33) Yaneja N, Kaur H. Insights into newer antimicrobial agents against Gram-negative bacteria. *Microbiol Insights.* 2016; 9: 9-19.
- 34) Yau W, Owen RJ, Poudyal A, *et al.* Colistin heteroresistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect.* 2009; 58(2): 138-44.
- 35) Lesho E, Yoon EJ, Mcgann P, *et al.* Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis.* 2013; 208(7): 1142-51.
- 36) Drapeau C, Grilli E, Petrosillo N. Rifampicin combined regimens for Gram-negative infections: data from the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35(1): 39-44.

- 37) Stein GE, Babinchak T. Tigecycline: an update. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2013; 75(4): 331-36.
- 38) Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN, *et al*. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase-and metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2): 570-3.
- 39) Zarkotou O, Pournaras S, Altouvas G, *et al*. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin-and carbapenem-resistant gram-negative pathogens. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(11): 3747-50.
- 40) Giamarellou H, Poulakou G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of tigecycline. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011; 7(11): 1459-70.
- 41) Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, *et al*. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012; 55(7): 943-50.
- 42) Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, *et al*. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4): 2322-8.
- 43) Nigo M, Cevallos CS, Woods K, *et al*. Nested case-control study of the emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(11): 5743-6.
- 44) Golkar Z, Bagasra O, Pace D. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*. 2014; 8(2): 129-36.
- 45) Venugopalan V, Nogid B, Le TN, Rahman SM, Bias TE, *et al*. Double carbapenem therapy (DCT) for bacteremia due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP): from test tube to clinical practice. *Infect Dis*. 2017; 49(11-12): 867-70.
- 46) Mawal Y, Critchley IA, Riccobene TA, Talley AK. Ceftazidime-avibactam for the treatment of complicated urinary tract infections and complicated intra-abdominal infections. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015; 8(6): 691-707.
- 47) Zasowski EJ, Rybak JM, Rybak MJ. The β -Lactams strike back: ceftazidime-avibactam. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(8): 755-70.
- 48) Solomkin J, Hershberger E, Miller B, *et al*. Ceftolozane/tazobactam plus metronidazole for complicated intra-abdominal infections in an era of multidrug resistance: results from a

randomized, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cIAI). *Clin Infect Dis*. 2015; 60(10): 1462-71.

49) Hong MC, Hsu DI, Bounthavong M. Ceftolozane/tazobactam: a novel antipseudomonal cephalosporin and β -lactamase-inhibitor combination. *Infect Drug Resist*. 2013; 6: 215-23.

50) Roberts JA, Lipman J. Editorial commentary: closing the loop – a colistin clinical study to confirm dosing recommendations from PK/PD modeling. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(12): 1727-9.

51) Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(6): 1119-25.

52) Paterson DL, Rogers BA. How soon is now? The urgent need for randomized, controlled trials evaluating treatment of multidrug-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(11): 1245-7.

53) Paul M, Benuri-Silbiger I, Soares-Weiser K, Leibovici L. Beta lactam monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside combination therapy for treating sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2004; 28: 668.

54) Vardakas KZ, Tansarli GS, Bliziotis IA, Falagas ME. β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41(4): 301-10.

55) Martin A, Fahrbach K, Zhao Q, Lodise T. Association between carbapenem resistance and mortality among adult, hospitalized patients with serious infections due to Enterobacteriaceae: results of a systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 5(7): ofy150.

56) Solomkin J, Evans D, Slepavicius A, *et al*. Assessing the efficacy and safety of eravacycline vs ertapenem in complicated intra-abdominal infections in the Investigating Gram-negative infections treated with eravacycline (IGNITE 1) trial: a randomized clinical trial. *JAMA Surg*. 2017; 152(3): 224-32.

57) Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. In vitro activity of eravacycline against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(6): 3840-4.

58) Castanheira M, Davis AP, Mendes RE, Serio AW, Krause KM, Flamm RK, *et al*. In vitro activity of plazomicin against Gram-negative and Gram-positive isolates collected from US hospitals and comparative activities of aminoglycosides against carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae and isolates carrying carbapenemase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(8): 313-8.

59) Abdelraouf K, Kim A, Krause KM, Nicolau DP. In vivo efficacy of plazomicin alone or in combination with meropenem or tigecycline against Enterobacteriaceae isolates exhibiting various resistance mechanisms in an immunocompetent murine septicemia model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(8): 1074-8.

60) Sbrana F, Malacarne P, Viaggi B, *et al.* Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2012; 56(5): 697-700.

61) Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Trans Med.* 2016; 4(17): 326.

62) Fraimow HS, Tsigrelis C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms epidemiology, and management of specific resistant pathogens. *Crit Care Clin.* 2011; 27(1): 163-205.

63) Bush K., Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 969-76.

64) Kaye KS, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents; epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am.* 2000; 14: 293-319.

65) Kilic A, Aktas Z, Bedir O, *et al.* Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci.* 2011; 41(2): 161-6.

66) Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 1369-73.

67) Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(8): 2950-4.

68) Chen LF, Chopra T, Kaye KS. Pathogens resistant to antibacterial agents. *Med Clin North Am.* 2011; 95(4): 647-76.

69) Bush K. Bench-to-bedside review: the role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.* 2010; 14(3): 224.

70) Shahid M, Sobia F, Singh, *et al.* AmpC β -lactamases and bacterial resistance: an updated mini review. *Rev Med Microbiol.* 2009; 20(3): 41-55.

- 71) Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(1): 160-201.
- 72) Cantón R, Novais A, Valverde A, *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(Suppl. 1): 144-53.
- 73) Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(5): 466-75.
- 74) Lascols C, Hackel M, Hujer AM, *et al.* Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: a snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5): 1632-9.
- 75) Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 35(2): 281-94.
- 76) Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods.* 2014; 107: 106-18.
- 77) Kim HK, Park JS, Sung H, Kim MN. Further modification of the modified hodge test for detecting metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Ann Lab Med.* 2015; 35(3): 298-305.
- 78) van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One.* 2015; 10(3): 0123690.
- 79) Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(1): 274-6.
- 80) Carvalhaes CG, Silva ACR, Streling AP, *et al.* Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol.* 2015; 64(8): 946-7.
- 81) Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15(1): 5.
- 82) Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1): 103-14.

- 83)** Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(4): 906-9.
- 84)** Liu YY, Wang Y, Walsh, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(2): 161-8.
- 85)** Olaitan AO, Morand S, Roland JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5: 643.
- 86)** Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4): 593-656.
- 87)** Helander IM, Kato Y, Kilpelainen I, *et al.* Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem.* 1996; 237: 272-8.
- 88)** Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed.* 2010; 17: 60.
- 89)** Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, *et al.* In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(11): 5521-6.
- 90)** Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 2009; 5(12): 1000788.
- 91)** Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(9): 821-30.
- 92)** Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(11): 1604-13.
- 93)** Ramasamy M, Lee J. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 1851242.
- 94)** Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg.* 2008; 39(2): 82-8.
- 95)** Sauer K, Rickard AH, Davies DG. Biofilms and biocomplexity. *Microbe.* 2007; 2(7): 347-53.
- 96)** Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science.* 1999; 283(5409): 1837-9.

- 97) Jones CG, Lawton JH, Shachak M. Organisms as ecosystem engineers, in Ecosystem management. *Oikos*. 1994; 69(3): 373-86.
- 98) Corning, PA. The re-emergence of “emergence”: A venerable concept in search of a theory. *Complexity*. 2002; 7(6): 18-30.
- 99) Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437: 41-7.
- 100) Wilking JN, Zaburdaev V, de Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz DA. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci*. 2013; 110(3): 848-52.
- 101) Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(9): 881-90.
- 102) Jones HC, Roth IL, Sanders WM. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*. 1969; 99(1): 316-25.
- 103) <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/microbial-genetics-1/infection/biofilms>.
- 104) Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? *J Hosp Infect*. 2006; 64(4): 313-25.
- 105) Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30(3): 236-41.
- 106) Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 319-46.
- 107) Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* 2012; 12(3): 2519-38.
- 108) Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 415-28.
- 109) Fuqua WC, Winans, SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxRLuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol*. 1994; 176(2): 269-75.
- 110) Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387(2): 409-14.
- 111) Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*. 2007; 19(1): 83-8.
- 112) Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*. 2009; 12(2): 182-91.

- 113)** Rumbaugh, KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* 2000; 2(14): 1721-31.
- 114)** Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1771-6.
- 115)** Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002; 292(2): 107-13.
- 116)** Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1): 34-40.
- 117)** Foley I, Marsh P, Wellington EM, Smth AW, Brown MR. General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *Antimicrob Chemother.* 1999; 43(1): 164-5.
- 118)** Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis.* 1990; 161(1): 37-40.
- 119)** Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(9): 2125-33.
- 120)** Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003; 5(13): 1213-9.
- 121)** Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 34-9.
- 122)** Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-22.
- 123)** Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(9): 1824-8.
- 124)** Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Chauhan A, *et al.* Management of infections related to totally implantable venous-access ports: Challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(2): 146-59.
- 125)** Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriol.* 2002; 184(4): 1140-54.
- 126)** Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35(4): 322-32.

- 127)** Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 677-701.
- 128)** Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, *et al.* Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *Immunol Med Microbiol.* 2012; 65(2): 127-45.
- 129)** Chao J, Wolfaardt GM, Arts MT. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures. *Can J Microbiol.* 2010; 56(12): 1028-39.
- 130)** Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 21: 1-25.
- 131)** Guembe M, Martin-Rabadan P, Echenagusia A, *et al.* How should long-term tunneled central venous catheters be managed in microbiology laboratories in order to provide an accurate diagnosis of colonization? *J Clin Microbiol.* 2012; 50(3): 1003-7.
- 132)** Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, *et al.* Diagnosis of biofilms infections in cystic fibrosis patients. *APMIS.* 2017; 125(4): 339-43.
- 133)** Aasnæs K, Johansen HK, Poulsen SS, Pressler T, Buchwald C, Høiby N. Secretory IgA as a diagnostic tool for early *Pseudomonas aeruginosa* colonization. *J Cystic Fibrosis.* 2013; 12(1): 81-7.
- 134)** Davies JC, Bilton D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care.* 2009; 54(5): 628-40.
- 135)** Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, Robinson DA. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(9): 2014-8.
- 136)** Bauer TT, Torres A, Ferrer R, Heyer CM, Schultze-Werninghaus G, Rasche K. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2002; 57(1): 84-7.
- 137)** Oztürk I, Yurtman AN, Erac B, Gul-Yurtsever S, Ermertcan S, Hosgor-Limoncu M. In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratisl Lek Listy.* 2014; 115(8): 483-6.
- 138)** 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.
- 139)** Bense T, Stotz M, Borneff-Lipp M, Wollschlager B, *et al.* Lactate in cystic fibrosis sputum. *J Cyst Fibros.* 2011; 10(1): 37-44.
- 140)** Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2683-90.

- 141)** Hengzhuang W, Ciofu O, Yang L, *et al.* High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1): 196-204.
- 142)** Lebrun E, Tomic-Canic M, Kirsner RS. The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(5): 433-8.
- 143)** Caputo WJ, Beggs DJ, DeFede JL, Simm L, Dharma H. A prospective randomised controlled clinical trial comparing hydrosurgery debridement with conventional surgical debridement in lower extremity ulcers. *Int Wound J.* 2008; 5(2): 288-94.
- 144)** Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351(16):1645–54.
- 145)** Rijnders BJ, Van WE, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(1): 90-4.
- 146)** Fortun J, Grill F, Martin-Davila P, *et al.* Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic-lock therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(4): 816-21.
- 147)** Del Pozo JL, Garcia CM, Hernaez S, *et al.* Effectiveness of teicoplanin versus vancomycin lock therapy in the treatment of port-related coagulase-negative staphylococci bacteraemia: a prospective case-series analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(5): 482–5.
- 148)** Capdevila JA, Gavalda J, Fortea J, *et al.* Lack of antimicrobial activity of sodium heparin for treating experimental catheter-related infection due to *Staphylococcus aureus* using the antibiotic-lock technique. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7(4): 206–12.
- 149)** Sakarya S. Anti-biyofilm stratejileri. *Türkiye Klinikleri Derg.* 2018; 11(3): 66-72.
- 150)** Song Z, Borgwardt L, Høiby N, Høiby N, Wu H, Sørensen TS, Borgwardt A. Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. *Orthop Rev (Pavia).* 2013; 5(2): 65-71.
- 151)** Petronella P, Scorzelli M, Fiore A, *et al.* Antibiotic prophylaxis in catheter-associated urinary infections. *New Microbiol.* 2012; 35(2): 191-8.
- 152)** Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis.* 1994; 170(3): 720-3.
- 153)** Ozturk B, Gunay N, Ertugrul BM, Sakarya S. Effects of vancomycin, daptomycin, and tigecycline on coagulase-negative staphylococcus biofilm and bacterial viability within biofilm: an in vitro biofilm model. *Can J Microbiol.* 2016; 62(9): 735-43.

- 154)** Gattringer KB, Suchomel M, Eder M, Lassnigg AM, Graninger W, Presterl E. Time-dependent effects of rifampicin on staphylococcal biofilms. *Int J Artif Organs*. 2010; 33(9): 621-6.
- 155)** Raad I, Hanna H, Dvorak T, Dvorak T, Chaiban G, Hachem R. 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): 78-83.
- 156)** Mecikoglu M, Saygi B, Yildirim Y, Karadag-Saygi E, Ramadan SS, Esemeli T. The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88(6): 1208-14.
- 157)** Sakarya S, Gunay N, Karakulak M, Ozturk B, Ertugrul B. Hypochlorous acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds*. 2014; 26(12): 342-50.
- 158)** Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*. 1998; 144(11): 3039-47.
- 159)** Leber AL, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol. 2. Fourth ed. Washington, DC: ASM Press, 2016: 5.1: 12-23.
- 160)** Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3): 268-81.
- 161)** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, valid from 2019-01-01 [Internet]. Basel: EUCAST [erişim 21 Mayıs 2019]. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- 162)** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.0, July 2017 [Internet]. Basel: EUCAST [erişim 21 Mayıs 2019]. <https://pdfs.semanticscholar.org/8fa9/0d4e48d77c9fb0e33a4e700d45cdde09b232.pdf>.
- 163)** Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg*. 2016; 30(2): 62-75.
- 164)** Durham-Colleran MW, Verhoeven AB, van Hoek ML. Francisella novicida forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol*. 2010; 59(3): 457-65.

- 165)** Dosler S, Karaaslan E, Gerceker AA. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *J Chemother.* 2016; 28(2): 95-103.
- 166)** Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2): 175-9.
- 167)** Seifi K, Kazemian H, Heidari H, *et al.* Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(1): 30682.
- 168)** Vuotto C, Longo F, Pascolini C, *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol.* 2017; 123(4): 1003-18.
- 169)** Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(3): 841-50.
- 170)** Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43(3): 313-51.
- 171)** Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014; 9(9): 1071–81.
- 172)** Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(4): 589–603.
- 173)** Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 991–1002.
- 174)** LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54(3): 649–54.
- 175)** Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens.* 2014; 3(3): 743–58.
- 176)** Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* 2013; (136): 1–51.
- 177)** Rello J, Mariscal D, March F, *et al.* Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in ventilated patients: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(3): 912-6.
- 178)** Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care.* 2012; 16(3): R93.

- 179)** Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, *et al.* Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995; 49(1): 711-45.
- 180)** Boisvert AA, Cheng MP, Sheppard DC, Nguyen D. Microbial biofilms in pulmonary and critical care diseases. *Ann Am Thorac Soc.* 2016; 13(9): 1615-23.
- 181)** Tarquinio K, Confreda K, Shurko J, LaPlante K. Activities of tobramycin and polymyxin E against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-coated medical grade endotracheal tubes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(3): 1723-9.
- 182)** Sadıç B. *Ventilatörle İlişkili Pnömonilere Neden Olan Etkenlerde Biyofilm Oluşumunun ve Biyofilm Tabakalarına Etkili Antibiyotiklerin Araştırılması* [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2017.
- 183)** Laishram S, Anandan S, Devi BY, *et al.* Determination of synergy between sulbactam, meropenem and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance. *J Chemother.* 2016; 28(4): 297-303.
- 184)** Borges A, Saavedra MJ, Simoes M. Insights on antimicrobial resistance, biofilms and the use of phytochemicals as new antimicrobial agents. *Curr Med Chem.* 2015; 22(21): 2590–614.
- 185)** Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Hosp Infect.* 2008; 68(4): 369–71.
- 186)** Saeed EA, Bnyan IA, Saadi M. Quorum sensing and Biofilm formation by Bacterial Isolates from Hemodialysis Patients. *Res Pharm.* 2013; 3(2): 33–40.
- 187)** Saxena S, Banerjee G, Garg R, Singh M. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(5): DC09–11.
- 188)** Ermertcan S, Hosgor M, Tunger O, Cosar G. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33(11): 818-21.
- 189)** Leriche V, Sibille P and Carpentier B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(5): 1851-56.
- 190)** Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, *et al.*, Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J Infect Dis.* 2014; 210(5): 803-13.

- 191)** Singla S, Harjai K, Chhibber S. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *J Antibiot.* 2013; 66(2): 61-66.
- 192)** Gilbert P, Evans DJ, Evans E, *et al.* Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol.* 1991; 71(1): 72-7.
- 193)** Lunden JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J Food Prot.* 2000; 63(9): 1204-7.
- 194)** Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, *et al.* Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(2): 860-863.
- 195)** Williams DL, Woodbury KL, Haymond B, *et al.* A modified CDC biofilm reactor to produce mature biofilms on the surface of PEEK membranes for an in vivo animal model application. *Curr Microbiol.* 2011; 62(6): 1657-63.
- 196)** Corcoran M, Morris D, De Lappe N, *et al.* Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(4): 1507-14.
- 197)** Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(8): 4814-22.
- 198)** Schwandt LQ, Van Weissenbruch R, Stokroos I, *et al.* Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. *Acta otolaryngol.* 2004; 124(6): 726-31.
- 199)** Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, *et al.* Effect of fosfomicin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Intern J Antimicrob Agent.* 2003; 22: 95-100.
- 200)** Roveta S, Debbia EA, *et al.* Confronto tra gli effetti di N-acetil-cisteina, Ambroxol, Bromexina e Sobrerolo sui biofilm di *Staphylococcus aureus*. *GIMMOC*, 2004;8:131-42.
- 201)** El-Feky MA, El-Rehewy MS, *et al.* Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J microbiol.* 2009; 58(3):261-7.
- 202)** Riise GC, Qvarfordt I, Larsson S, Eliasson V, Andersson BA. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Respiration*, 2000; 67(5): 552-58.
- 203)** Kirmusaoğlu S, Yurdugül S, Koçoğlu ME. The effect of N-acetylcysteine on growth and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* strains. *Turk J Med Sci.* 2012; 42 (4): 689-94.

- 204)** Aslam S, BW Trautner, V Ramanathan, *et al.* Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(4): 1556-58.
- 205)** Coiffier G, Albert JD, Arvieux C, *et al.* Optimizing combination rifampin therapy for staphylococcal osteoarticular infections. *Joint Bone Spine.* 2013; 80(1): 11-17.
- 206)** Goldman E, Green LH. *Practical Handbook of Microbiology.* Second ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- 207)** Perlroth J, Kuo MJ, *et al.* Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. *Arc Intern Med.* 2008;168(8):805-819.
- 208)** Rose W, Poppens PT. Impact of biofilm on the *invitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 485-88.
- 209)** Reiter KC, Sambrano GE, *et al.* Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(4): 471-74.
- 210)** Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, *et al.* Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2013; 57(8): 3990-93.
- 211)** Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3558-62.
- 212)** Zimmerli W, AF Widmer, Blatter M, *et al.* Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1998; 279(19): 1537-41.
- 213)** Moody JA, Gerding DN, Peterson LR. Evaluation of ciprofloxacin's synergism with other agents by multiple in vitro methods. *Am J Med.* 1987; 82(4A): 44-54.
- 214)** Srikanth A, Sathish M, Harsha AVS. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013; 5(Suppl 1): 89-94.
- 215)** Guo Z, Wang Q. Efficacy of ozonated water against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Ozone: Science & Engineering.* 2017; 39(2): 127-36.
- 216)** Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious resins in vitro. *Caries Res.* 2000; 34: 498- 501.

- 217)** Segat A, Misra NN, Cullen PJ, *et al.* Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase. *Food and Bioproducts Processing*. 2016; 98: 181-88.
- 218)** Pinto L, Caputo L, Quintieri L, *et al.* Efficacy of gaseous ozone to counteract postharvest table grape sour rot. *Food Microbiol*. 2017; 66: 190-98.
- 219)** Jullien C, Benezech T, Carpentier P, *et al.* Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J Food Eng*. 2003; 56(1): 77-87.
- 220)** Norwood D, Gilmour A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J Appl Microbiol*. 1999; 86(4): 576-82.
- 221)** Giltner CL, Van Schaik EJ, Audette GF, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol*. 2006; 59(4): 1083-96.
- 222)** Marino M, Maifreni M, Baggio A, *et al.* Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2024.
- 223)** Gürsoy NC. *Negatif İyon ve Ozon Uygulamasının Çeşitli Bakteriler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Soğutma Kulesi ve Hastane Atık Sularının Dezenfeksiyonunda Kullanımının Değerlendirilmesi* [Doktora Tezi]. Malatya: İnönü Üniversitesi, 2009.
- 224)** Korkut Y, Ayada C, Toru Ü. Ozone Therapy and Its Effect on Cervical-Lumbar Disc Herniation. *Ankara Med J*. 2015; 15(3): 161-8.
- 225)** Bialoszewski D, Pietruczuk-Padzik A, Kalicinska A, *et al.* Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Med Sci Mon*. 2011; 17(11): 339-44.
- 226)** Ramzy MI, Gomaa HE, Mostafa MI, Zaki BM. Management of aggressive periodontitis using ozonized water. *Egypt Med JNR C*. 2005; 6(1): 229-45.
- 227)** Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(4): a010306.
- 228)** Justice SS, *et al.* Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101(5): 1333-1338.
- 229)** Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, *et al.* Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 2003; 301(5629): 105-7.
- 230)** Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(5): 269-84.

EKLER

EK 1: ETİK KURUL KARAR FORMU



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1437
Konu: Prof. Dr. Atahan ÇAĞATAY hk.

Tarih : 13.12.2017

Sayın Prof. Dr. Atahan ÇAĞATAY
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

İlgi : Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalının 20/11/2017 gün ve 434985 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Gülşah TUNÇER' in yürüteceği 2017/1414 dosya numaralı "N-asetil sisteinin, Rifampisin ve Ozonun Panrezistan Klebsiella pneumonia İzolatlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Etkinliği" başlıklı çalışma kurulumuzun 08/12/2017 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"N-asetil sisteinin, Rifampisin ve Ozonun Panrezistan Klebsiella pneumonia İzolatlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Etkinliği"						
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Atahan ÇAĞATAY						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı						
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi						
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---						
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>					
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>					
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>					
FAZ 4		<input type="checkbox"/>						
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>						
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>						
	Diğer ise belirtiniz :							
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	ULUSAL	<input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI	<input type="checkbox"/>

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"N-asetil sisteinin, Rifampisin ve Ozonun Panrezistan Klebsiella pneumonia İzolatlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Etkinliği"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	■	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
	OLGU RAPOR FORMU	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	□		Türkçe □ İngilizce □ Diğer □
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	□	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	□		
	SİGORTA	□		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	□		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	□		
	İLAN	□		
	YILLIK BİLDİRİM	□		
	SONUÇ RAPORU	□		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	□		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:20	Tarih: 08/12/2017		
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Atahan ÇAĞATAY' in sorumluluğunda ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Gülşah TUNÇER' in yürütmeye yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ■	K □	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E □	K ■	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K □	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K □	E □	H ■	E ■	H □	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E □	K ■	E □	H ■	E ■	H □	

- * :Araştırma ile ilişkisi
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

ÖZGEÇMİŞ

Dr. Gülşah Tunçer

Doğum Tarihi ve Yeri: 24/06/1988 ve Niğde

İlk ve Ortaokul: 100. Yıl İlköğretim Okulu (1994-2002)

Lise: Bor Akın Gönen Anadolu Lisesi (2002-2006)

Üniversite: On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi (2007-2013)

Yabancı Dil: İngilizce

E-posta adresi: gulsahuncer40@gmail.com

Mesleki Deneyim:

Eylül 2013-Şubat 2014 arasında Şırnak Uludere Devlet Hastanesi'nde pratisyen hekim olarak çalıştım.

Haziran 2014'te İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık öğrencisi olarak göreve başladım ve halen bu görevimi sürdürmekteyim.

Yayımlar:

1. Başaran S, **Tunçer G**, Sarıbuğa A, Şimşek-Yavuz S, Çağatay A, Öncül O, Özsüt H, Eraksoy H. Farklı antibiyotikler kullanılan hastalarda eozinofil sayılarının seyri ve klinik yansımaları [Özet]. *In: Tekin S, ed. Klimik 2016 30. Yıl Kurultayı* (9-12 Mart 2016, Antalya) *Özet Kitabı*. İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2016: 441-2.
2. **Tunçer G**, Başaran S, Erdem S, Yılmaz E, Şimşek-Yavuz S, Eraksoy H. Lenfoproliferatif hastalıklarla karışan kronik bir Q ateşi endokarditi olgusu [Özet]. *In: Tekin S, Şimşek F, eds. XVIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi* (22-16 Mart 2017, Antalya) *Kitabı*. İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2017: 296.
3. Başaran S, **Tunçer G**, Menemenlioğlu D, Şimşek-Yavuz S, Çağatay A, Eraksoy H. İstanbul'dan ilk Batı Nil virusu meningoensefaliti olgusu [Özet]. *In: Tekin S, ed. XIX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi* (28-31 Mart 2018, Antalya) *Kitabı*. İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2018: 458.

4. **Tunçer G**, Başaran S, Kapmaz M, Menemenlioğlu D, Şimşek-Yavuz S, Çağatay A, Eraksoy H. Hindistan'dan İstanbul'a gelen yurtdışı kaynaklı bir çikungunya ateşi olgusu [Özet]. *In: Tekin S, ed. XIX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (28-31 Mart 2018, Antalya) Kitabı.* İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2018: 455-6.
5. Başaran S, **Tunçer G**, Şimşek-Yavuz S, Agüloğlu-Bali E, Çağatay A, Öncül O, Özsüt H, Eraksoy H. Kolistin direncini saptamak için pratik bir yöntem: kolistin diskleriyle tüpte makrodilüsyon [Özet]. *In: Tekin S, ed. XX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (13-16 Mart 2019, Antalya) Kitabı.* İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2019: 230-1.
6. Başaran S, Aydın B, **Tunçer G**, Şimşek-Yavuz S, Çağatay A, Öncül O, Özsüt H, Eraksoy H. Kan kültüründe gördüğünüz mayalar kriptokok olabilir: HIV enfeksiyonlu bir olguda kriptokoksemi [Özet]. *In: Tekin S, ed. XX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (13-16 Mart 2019, Antalya) Kitabı.* İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2019: 463.
7. Başaran S, Agüloğlu-Bali E, Şimşek-Yavuz S, **Tunçer G**, Çağatay A, Öncül O, Özsüt H, Eraksoy H. Fosfomisin direncini saptamak için pratik bir yöntem: fosfomisin diskleriyle tüpte makrodilüsyon [Özet]. *In: Tekin S, ed. XX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (13-16 Mart 2019, Antalya) Kitabı.* İstanbul: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2019: 270-1.