



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIYABETİK AYAK ENFEKSİYONU OLAN
HASTALARDA ETKEN MİKROORGANİZMALARDA
BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DİRENÇ GELİŞİMİYLE
İLİŞKİSİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ASLI VATAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. NEŞE SALTOĞLU

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Asistanlığımız süresince tecrübelerini ve bilgilerini cömertlikle bizlerle paylaşan, hayatımın zorlu dönemeçlerinde yardım ve hoşgörülerini esirgemeyen, kendilerini tanımaktan ve birlikte çalışmaktan büyük onur duyduğum başta tez danışmanım Prof. Dr. Neşe Saltoğlu ve değerli hocalarım Prof. Dr. Recep Öztürk, Prof. Dr. Fehmi Tabak, , Prof. Dr. Reşat Özaras, Prof. Dr. Ali Mert, Prof. Dr. Gökhan Aygün' e

Her daim desteklerini esirgemeyen, sorularımıza her koşulda yanıt veren ve bizlere bu yolda en güzel örnekler olan çok sevgili doçentlerim Birgül Mete, Mücahit Yemişen ve İlker İnanc Balkan'a...

Çok sevgili dostlarım bu altı yıl bitse de hayatımda hep varolacak olan Seven Uludokumacı, Sibel Yıldız Kaya, Bahar Kaçmaz ve Berna Karaismailoğlu'na... Ayrıca birlikte severek çalıştığım ve tanımaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma...

Laboratuvarda başta eğitimime katkılarından dolayı sevgili Ayşe Nur Hondur'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarıma...

En büyük yardımcılarımız başta Nihal Küçükboyacı olmak üzere özveriyle, sabırla ve güler yüzle çalışan sevgili hemşirelerimize ve personel arkadaşlarımıza...

Asistanlığımın her döneminde arkadaşlığı, zorlu tez çalışma dönemimde de hakkını ödeyemeyeceğim yardımları için sevgili Sinem Kansız'a...

Kıymetlilerim fedakar annem ve babama bu güzel hayatı bana sundukları ve sonsuz sevgileri ile beni zor anlarımda yalnız bırakmadıkları için... Yanımda olamasalarda sevgi ve desteklerini hep hissettiğim canım kardeşlerim Berna ve Hasan'a...

En büyük şansım; altı yıldır aramızdaki mesafelere yollara rağmen koşulsuz sevgisi, sabrı ve yardımları için sevgili eşim Bülent Vatan'a...

Ve yaşama sevincim güzel kızım Elâm' a kendisinden çaldığım zaman için özür dileyerek...

İçten teşekkürlerim, sevgi ve saygılarımla...

Dr. Aslı Vatan

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DİYABETES MELLİTUS.....	3
2.1.1. DİYABET TANISI.....	3
2.1.2. DİYABETTE FİZYOLOGİ / ETİYOLOJİ	4
2.1.3. DİYABET KOMPLİKASYONLARI (6).....	4
2.1.4. DİYABET VE ENFEKSİYON	5
2.1.5. DİYABETİK AYAK ÜLSERİ	6
2.1.5.1. DİYABETİK AYAK ÜLSERİ FİZYOLOGİSİ.....	7
2.1.6. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONLARI.....	8
2.1.6.1. TANIM	8
2.1.6.2. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONU OLUŞUM MEKANİZMASI VE RİSK FAKTÖRLERİ	9
2.1.6.3. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONU SINIFLANDIRILMASI....	10
2.1.6.4. DİYABETİK AYAK MİKROBİYOLOGİSİ.....	12
2.1.6.5. DİYABETİK AYAKTA OSTEOMİYELİT	15
2.1.6.6. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ.....	16

2.2.	BİYOFİLM	18
2.2.1.	TANIM	18
2.2.2.	BİYOFİLM OLUŞUMUNDA BAKTERİLER ARASI HABERLEŞME: “QUORUM SENSING”(QS)	19
2.2.3.	MİKROORGANİZMALARDA BİYOFİLM OLUŞTURMA NEDENLERİ	19
2.2.4.	BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI	21
2.2.5.	BİYOFİLM ENFEKSİYONLARI VE DİRENÇ	22
2.2.6.	DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONLARINDA BİYOFİLM.....	24
3.	HASTALAR VE YÖNTEM.....	27
3.1.	ÇALIŞMA GRUBU	27
3.2.	MİKROBİYOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	27
3.3.	BİYOFİLM TESPİTİ İÇİN MODİFİYE MİKROPLAK YÖNTEMİ	28
3.4.	İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	29
4.	BULGULAR.....	30
4.1.	BİYOFİLM OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ FAKTÖRLER.....	32
4.2.	ELDE EDİLEN ETKENLER VE BİYOFİLM POZİTİFLİĞİ ORANLARI ..	34
4.3.	BİYOFİLM OLUŞUMU İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİ.....	36
4.4.	Çoklu doğrusal regresyon analizi (Multivariate analiz).....	39
5.	TARTIŞMA.....	40
6.	SONUÇLAR	50
7.	KAYNAKLAR	52

TABLO DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo 1. Diyabette sık rastlanan enfeksiyonlar.....	6
Tablo 2. DAE oluşum mekanizmaları ve risk faktörleri.....	9
Tablo 3. PEDIS Sınıflandırması	10
Tablo 4. Türkiye’de diyabetik ayak enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalar .	13
Tablo 5. Hastalara ait demografik veriler	31
Tablo 6. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri.....	31
Tablo 7. Hastalara ilişkin demografik veriler, risk faktörleri, komorbiditeler ve sonuç ölçütleri ile biyofilm ilişkisi.....	33
Tablo 8. Klinik ve laboratuvar bulguları ile biyofilm ilişkisi	34
Tablo 9. PEDIS enfeksiyonevrelmesi ve biyofilm ilişkisi	34
Tablo 10. Mikroorganizmaların dağılımı ve biyofilm oranları.....	35
Tablo 11. Biyofilm oluşumu ile MDR ve XDR gelişimi arasındaki ilişki	37
Tablo 12. Non-fermentatif bakterilerde biyofilm oluşumu ile MDR ilişkisi.....	37
Tablo 13. Biyofilm oluşumu ile dirençli diğer etkenler arasındaki ilişki	38
Tablo 14. GSBL yapan <i>Enterobacteriaceae</i> spp. ve biyofilm ilişkisi	38
Tablo 15. Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler	39

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.	Biyofilm üretiminin Modifiye Mikroplak Yöntemi ile gösterilmesi.....	29
Şekil 2.	Elde edilen etkenler ve biyofilm oluşturma oranları	36



KISALTMALAR DİZİNİ

ABI	: Ayak bileği-kol indeksi (ankle-brachial index)
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CRP	: C-reaktif protein
CTF	: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
DA	: Diyabetik ayak
DAE	: Diyabetik ayak enfeksiyonu
DM	: Diyabetes Mellitus
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
EPS	: Ekzopolisakkarid
FISH	: Fluorescence in situ hybridization
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
HbA1c	: Hemogloblin A1c
HEKK	: Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
IDSA	: Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America)
IL-6	: İnterlökin-6
IWGDF	: Uluslararası Diyabetik Ayak Çalışma Grubu (International Working Group on the Diabetic Foot)
KNS	: Koagülaz negatif stafilocoklar
MDR	: Çoklu ilaç direnci (Multi drug resistant)
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MR	: Manyetik Rezonans
MRKNS	: Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok

MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
OD	: Optik dansite
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
PAH	: Periferik arter hastalığı
PEDIS	: "Perfusion", "extent", "depth", "infection", "sensation" akrostişi
PNL	: Polimorf nüveli lökosit
QS	: Quorum Sensing
SCCmec	: mec stafilokokkal kaset kromozomu
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
TBI	: Ayak başparmağı-kol indeksi (toe-brachial index)
TCP	: Tissue culture plate (doku kültür plağı)
TcPO2	: Transkutanöz oksijen basıncı
TGF-β	: Transforming growth factor-β
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü
TSB	: Triptik Soy Buyyon
XDR	: Yaygın ilaç direnci (Extensively drug resistant)
VRE	: Vankomisine dirençli enterokok

ÖZET

Giriş ve amaç: Bu tez çalışmasında hastanemizde diyabetik ayak enfeksiyonu (DAE) nedeniyle takip ve tedavisi yapılan hastaların doku kültürlerinden üretilen etken mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun direnç gelişimi ile ilişkisi ve biyofilm oluşumunun prognostik önemini değerlendirmek hedeflenmiştir.

Hastalar ve Yöntem: Ocak 2008 - Aralık 2015 tarihleri arasında DAE tanısı ile CTF Diyabetik Ayak Konseyinde takip edilen 165 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastaların demografik kayıtları, laboratuvar bulguları ve yara özelliklerine ait bulgular yatış sürecinde doldurulan "diyabetik ayak hasta kayıt formu" ndan elde edilmiştir. Klinik takip kayıtları ise epikriz rapolarından retrospektif olarak elde edilmiştir. Bu hastalardan standart yöntemlerle alınmış doku kültürlerinde konvansiyonel biyokimyasal testlerle tanımlanmış ve disk diffüzyon yöntemine göre duyarlılıkları belirlenmiş olan 339 etkende mikropalak yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Biyofilm ilişkili risk faktörleri ve biyofilm oluşumunun antimikrobiyal direnç ve hastanın prognozuna olan etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar univariate ve multivariate analiz ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Elde edilen 339 etkende biyofilm üretim oranı % 34; gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumu gram pozitiflere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p = 0,01$). Biyofilm oluşturma oranı en yüksek olan bakteriler sırasıyla *A. baumannii* (% 62), *P. aeruginosa*'dır (% 52). Univariate analizde son 3 ayda antibiyotik kullanım öyküsü ($p = 0,002$), son 6 ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü ($p = 0,01$), geçmişte amputasyon varlığı ($p = 0,01$), 3 ay içinde aynı ayakta tekrarlayan enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış ($p = 0,03$), mikroorganizmalarda çoklu ilaç direnç ($p < 0,001$) ve yaygın ilaç direnci ($p < 0,001$) biyofilm üretiminde belirleyici faktörlerdir. Multivariate analizde çoklu ilaç direnç ($p = 0,002$) ve yaygın ilaç direnci ($p = 0,01$) biyofilm oluşumunda bağımsız belirleyiciler olarak bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda hastalarda tekrarlayan enfeksiyonlar ve antibiyotik direnci ile biyofilm ilişkisi gösterilmiştir. Kronik yaralar gibi biyofilm oluşumunun öngörüldüğü enfeksiyonlarda biyofilm varlığının laboratuvar tespiti ve önlenmesinin hedeflenmesi, etkin tedavinin başlanması DAE' lu hasta yönetiminde önemlidir.

SUMMARY

Background and Aim: In this study, we aimed to investigate the association between antimicrobial resistance profile and biofilm formation in the isolates obtained from diabetic foot ulcer (DFU). In addition, we sought to determine prognostic importance of biofilm production.

Methods: We performed a study on 165 DFI in patients treated in a multidisciplinary based diabetic foot ulcer center of Cerrahpasa School of Medicine during the period of January 2008 - December 2015. Individual demographic, laboratory data, and diabetic foot ulcer characteristics were obtained prospectively at the time of hospitalization. Clinical follow-up data was collected retrospectively from past records and discharge summaries. Standard methods of sample collection and identification of microorganism were adopted. Among a total of 339 bacteria were isolated, antimicrobial susceptibility of the isolates were determined by disk diffusion method. Biofilm forming ability of the isolates were investigated by modified microplate method. Using univariate and multivariate logistic regression analyses, risk factors associated with biofilm formation ability and association between biofilm production and antimicrobial resistance profile were determined.

Results: The overall biofilm producing infection rate among 339 isolates was 34 %. The biofilm production rate was significantly higher in Gram negative isolates in comparison with Gram positive microorganism ($p = 0.01$). *A. baumannii* (62 %) and *P. aeruginosa* (52 %) were the most prominent bacteria show biofilm positivity. On univariate analysis, significant risk factors for biofilm producing infection were previous antibiotic use within 3 month ($p = 0.002$), previous recurrent DFI within 6 months ($p = 0.01$), amputation history ($p = 0.01$), hospitalization within 3 months due to ipsilateral recurrent DFI ($p = 0.03$), multidrug resistance of microorganism ($p < 0.001$) and extensive drug resistance of microorganism ($p < 0.001$). Multivariate regression analysis also determined two variables to be potential independent risk factors for biofilm formation: multidrug resistance of microorganism ($p = 0.002$) and extensive drug resistance of microorganism ($p = 0.01$).

Conclusions: This study revealed that biofilm formation was significantly associated with antimicrobial drug resistance and recurrent DFI. The detection of biofilm production from isolates obtained in DFU might represent a useful method to identify patients with high risk and to refine antimicrobial management of DFI.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes Mellitus (DM), insülin yetersizliği veya insülin etkisindeki sorunlar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet prevalansı dünyada ortalama % 9 iken, ülkemizde ise % 13,7 oranıyla daha yüksek bir prevalansta görülmektedir (3, 4) Diyabetli hastalarda mikronöroanjiyopatinin sonucunda uç organ yetmezliğine bağlı olarak nefropati, retinopati, ağrısız kardiyak iskemiye bağlı geniş miyokardiyal infarktüsler, akral bölgelerde nekrozlar ve diyabetik ayak ülserleri oluşabilir (5). Enfeksiyon, DA yaralarının yarısından fazlasında karşılaşılan bir sorundur; orta derece enfeksiyonların % 20'sinde, şiddetli enfeksiyonların % 50 - 60'ında osteomyelit de gelişir (14).

Diyabet hastalarında hayat boyunca % 15 - 25 oranında diyabetik ayak ülseri gelişmektedir. (11). Diyabetik ayak enfeksiyonu (DAE), diyabetin en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olup; diyabetin hastanede yatışa en sık neden olan ayrıca travmaya bağlı olmayan uzuv amputasyonlarının en sık nedenidir. Diyabetik hastaların dörtte birinde hayatlarının bir döneminde diyabetik ayak enfeksiyonu gelişmekte ve bu komplikasyon uzun süreli hastane yatışlarına, önemli iş gücü kaybına, sakatlıklara, psikososyal travmaya neden olmakta ve yüksek maliyetlerle sonuçlanmaktadır (12, 13). Bu komplikasyon dünyada her 30 saniyede bir ayak kaybına neden olmaktadır. Ülkemizde yaklaşık beş yüz bin DAE tanılı hasta mevcut olup bu enfeksiyonların tedavisi oldukça güçtür. DAE'nin tedavisi birçok açıdan değerlendirme gerektiren kompleks bir sorundur. Bu hasta grubunda uygun antibiyotik tedavisi yanında nekrotik ve ölü dokuların debridmanı yapılarak; hastanın ayağını ve yaşamını kurtarmak hedeflenmelidir (7).

Diyabetik ayak gibi kronik yaralarda biyofilm oluşumuna zemin hazırlayan pek çok faktör vardır. Biyofilm; bir virülans faktörü olup, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş bir matrikstir (37). Biyofilm oluşturan bakterilerde serbest formlara oranla antibiyotiklere 100 - 1000 kat oranında direnç gelişebilmektedir (40).

Yabancı cisim ilişkili biyofilm enfeksiyonları ile ilgili kılavuz oluşturulabilecek düzeyde yeterli bilimsel kanıt mevcuttur. Kronik yaralarda tanısal anlamda güçlü kanıta

dayalı yaklaşımlar mevcut olmasına rağmen buna ilişkin tedavi yaklaşımları tam olarak oluşturulmamıştır. Bu nedenle diyabetik ayak gibi kronik yaralarda biyofilm üzerine çalışmaların arttırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda diyabetik ayak enfeksiyonu nedeniyle izlem ve tedavisi yapılan hastaların doku kültürlerinde üretilen etken mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun direnç gelişimi ile ilişkisi ve prognostik önemini değerlendirmeyi hedefledik. Amacımız biyofilm oluşumu ile diyabetik ayak enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi göstererek biyofilm üreten bakterilerin tespitini sağlayan tekniklerin laboratuvar uygulamalarında önemine ve biyofilme yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğine dikkat çekmektir.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 13/04/2016 tarihinde ve 83045809-604.01.02 – 136318 sayılı karar ile uygun bulunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABETES MELLİTUS

Diyabet, insülin yetersizliği veya insülin etkisindeki sorunlar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Diyabet tip I ve tip II olarak iki kategoriye ayrılır. Tip I diyabet, sıklıkla 30 yaşından önce başlar, mutlak insülin eksikliği olarak tanımlanır ve ilerleyici beta hücre hasarı temeline dayanır. Tip IA otoimmün tip olup hastaların % 90'ını oluştururken, tip IB ise otoimmün değildir. Tip II diyabet insülin direnci ve pankreastan kan glukoz düzeyine yanıt olarak yeteri kadar insülin salgılanamaması temeline dayanır ve sıklıkla 30 yaşından sonra gelişir (1).

Diyabet, oluşan mikrovasküler ve makrovasküler değişiklikler ve nöropatiye bağlı komplikasyonlar nedeni ile önemli morbidite ve mortalite nedenidir (2). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre dünya genelinde diyabetli birey sayısı yaklaşık 415 milyon olup, bu sayının 2040 yılında 642 milyona kadar yükselebileceği öngörülmektedir. DM prevalansı ve artış hızı gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha yüksektir (3). Diyabet prevalansı dünyada ortalama % 9 iken, ülkemizde ise prevalansı daha yüksek % 13,7 olarak bildirilmiştir (4, 5). Hastalarda mikronöroanjiyopatinin sonucunda uç organ hasarına bağlı olarak nefropati, retinopati, ağrısız kardiyak iskemiye bağlı geniş miyokardiyal enfarktüs, akral bölgelerde nekrozlar ve diyabetik ayak ülserleri oluşabilir (3).

2.1.1. DİYABET TANISI

Diyabet tanısı aşağıdaki yöntemlerden herhangi biri kullanılarak konulabilir:

1. En az 8 saatlik açlık sonrası açlık plazma glukozunun ≥ 126 mg/dl ölçülmesi
2. 75 g glukoz ile uygulanan oral glukoz tolerans testinde (OGTT) 2. saatteki plazma şekerinin ≥ 200 mg/dl ölçülmesi
3. Standardize metotlarla ölçülmüş glikozillenmiş hemoglobin A1c düzeyinin $\geq$ % 6,5 olarak ölçülmesi (1).

2.1.2. DİYABETTE FİZYOPATOLOJİ / ETİYOLOJİ

Tip 1 DM, insülin eksikliği temeline dayanır. Tip 1A, tip 1 diyabetin % 90' lık kısmını oluşturur. Genetik olarak eğilimi olan kişilerde toksinler, virüsler, stres gibi dış etkenlere bağlı otoimmünite uyarılması ile ilerleyici beta hücre hasarı oluşur ve kanda adacık otoantikorları tespit edilebilir. Diyabet semptomları yüksek oranda beta hücre kaybından sonra başlar. Tip 1B diyabette ise insülin eksikliği otoimmün olmayan bazı nedenlere bağlıdır ve kanda adacık oto antikorları tespit edilemez. Tip 2 DM ise insülin direnci ve insülin sekresyonunda azalma temelinde gelişir. İnsülin direnci diyabet tanısı konulmadan yıllar önce başlar ve vücutta üretilen insülinin kullanımında reseptör düzeyinde oluşan sorunlara bağlı olarak glukoz hücre içine alınıp enerji olarak kullanılamaz. İnsülin sekresyonunda azalma daha ileri dönemlerde ortaya çıkar. Kan glukoz düzeyine cevap olarak yeterli düzeyde insülin salgılanamaz. İnsülin salınım defekti ve insülin karşıtı hormonlara bağlı karaciğerde glukoz yapımı kontrolsüz olarak artar (1).

2.1.3. DİYABET KOMPLİKASYONLARI (6)

A. DİYABETİN AKUT METABOLİK KOMPLİKASYONLARI

1. Diyabetik ketoasidoz
2. Ketotik olmayan hiperozmolar koma
3. Hipoglisemi
4. Laktik asidoz

B. DİYABETİN KRONİK KOMPLİKASYONLARI

1. Mikrovasküler komplikasyonlar
 - Diyabetik retinopati
 - Diyabetik nefropati
 - Diyabetik nöropati
2. Makrovasküler komplikasyonlar
 - Hipertansiyon
 - İskemik kalp hastalığı ve miyokard enfarktüsü

- Periferik arter hastalığı
- Serebrovasküler atak (inme, geçici iskemik atak)

3. Diğer kronik komplikasyonlar

- Gastrointestinal (gastroparezi, diyare)
- Genitoüriner (üropati, seksüel disfonksiyon)
- Dermatolojik
- Kemik ve mineral metabolizma bozuklukları
- Diyabetik ayak
- Psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklar

2.1.4. DİYABET VE ENFEKSİYON

Hiperglisemik ortamın çeşitli mekanizmalarla enfeksiyonlara eğilimi arttırdığı uzun zamandır bilinmektedir. Kontrolsüz diyabette hiperglisemi; nötrofillerin fagositer ve bakterisidal işlevlerinde bozulmaya, oksidatif strese ve inflamatuvar sitokinlerde artışa yol açar. Hipergliseminin hiperozmotik etkisiyle nötrofil kemotaksisi azalır. Ek olarak tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), “transforming growth factor- β ” (TGF- β), interlökin (IL-6) ve diğer inflamatuvar faktörlerin üretimi artar. Tüm bunlar antibakteriyel savunmanın yetersiz kalmasına ve bakteriyel temizlenmenin bozulmasına neden olur (7).

Diyabette enfeksiyona yatkınlığın en önemli nedeni lökosit fonksiyon bozukluğudur. Nötrofillerin aderans, kemotaksis, fagositoz ve mikrobisidal fonksiyonlarında bozukluk (mieloperoksidaz eksikliği, kompleman yolağı ve sitokin etkilerinde bozukluk) ortaya çıkar. Mikroorganizmaların lökositler tarafından ortadan kaldırılması hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu gibi toksik ürünlerin oluşması ile meydana gelir. Diyabette ise hiperglisemi düzeyi ile orantılı olarak bu kaskad bozulur (8). Süperoksit radikallerin oluşması için gereken NADPH, DM’de glukoz metabolizmasında artma nedeni ile poliyol yolu ile fazla harcanmakta ve bu nedenle lökositlerin oksidatif öldürme kapasitesi azalmaktadır (9). Diyabete bağlı hümmoral immunitede bozulma; IgA ve IgG düzeylerinde azalma, C3’ ün opsonik bağlanma yüzeyinde defektler, özellikle C4’ de eksiklik olarak karşımıza çıkar (10).

Diyabette enfeksiyon oluşumunu artıran ikincil nedenler arasında ise ketoasidoz oluşumu, yapılan intravasküler girişimler, yanlış antibiyotik kullanımı ve direnç gelişimi, hastaneye sık ve uzun süreli yatışlar, üriner kateter uygulanması, periferik vasküler hastalık, nöropati, iskemi ve nöropatiye bağlı deri bütünlüğü kaybı, gastropareziye bağlı reflü ve aspirasyon, kronik renal yetmezlik ve diyaliz, total parenteral beslenme varlığı yer almaktadır (10, 11). DM’de sık rastlanan enfeksiyonlar tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Diyabette sık rastlanan enfeksiyonlar		
Hastalık	Mikroorganizma	Risk Faktörleri
Mukormikozis	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Rhizomucor</i> spp.	Hiperglisemi
Stafilokok taşıyıcılığı	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hiperglisemi
İdrar yolu enfeksiyonları	<i>E. coli</i> , diğer gram-negatifler	Hiperglisemi, kadın cinsiyet
Pnömoni	<i>S. pneumoniae</i> , influenza, mantarlar	Hiperglisemi, ileri yaş
Amfizematöz kolesistit	<i>Clostridium perfringens</i>	Hiperglisemi, ileri yaş, erkek cinsiyet
Polimikrobiyal yumuşak doku enfeksiyonları	Streptokoklar, anaeroplara, gram negatif bakteriler	Hiperglisemi, anjiyopati
Malign otitis eksterna	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hiperglisemi

2.1.5. DİYABETİK AYAK ÜLSERİ

Diyabet hastalarında hayat boyunca diyabetik ayak ülseri % 15 - 25 oranında gelişmekte; ciddi morbidite, alt ekstremitte amputasyonu, tedavi maliyeti ve mortalite artışı ile karşımıza çıkmaktadır (11). Travmaya bağlı olmayan ayak amputasyonlarının % 40 - 60’ında sebep diyabet olup; bunların çoğunda zeminde bir ülser veya yaralanma bulunmuştur (1).

2.1.5.1. DİYABETİK AYAK ÜLSERİ FİZYOPATOLOJİSİ

Diyabetik ayak ülserleri nöropatik, nöro-vasküler ya da vasküler kökenli olabilir. Diyabetik duysal ve motor nöropati, diyabetik ayak ülserlerinin en sık nedenidir. Diyabeti olan hastaların % 60'ında periferik nöropati vardır (7). Diyabetik hastalarda duysal nöropatiye bağlı olarak ayakkabı vurması, yanık, kesi ve böcek sokması gibi küçük travmalarla bile ülser gelişebilir. Nöropati sıklıkla metabolik polinöropati mekanizmasıyla oluşur. Daha çok ekstremitelerde distallerinde simetrik ve kronik tutulum yaparak özellikle alt ekstremitelerde çorap şeklinde tutulum gösterir. Yürüme biyomekaniği nöropati zemininde bozulur ve keratoz artışına yol açar. Yük dağılımında oluşan dengesizlikle beraber intrinsik kaslarda atrofi olur ve ayak üzerindeki basınç kallus üzerinde yoğunlaşır (7). Ayrıca namaz kılan hastalarda, namaz sırasında altta kalan ayakta dış malleol üzerinde kronik basıya bağlı kallus gelişimi görülür. Kallus zemininde dokuda kanama ve iskemiye bağlı ülserler gelişir ve enfeksiyona ciddi bir zemin oluşturur (1).

Ateroskleroz anlamına gelen diyabetik makroanjiyopati, nöropatiyi tetikleyebilir. Diyabetik mikroanjiyopati ise kapiller düzeyde mikrosirkülasyonu işlevleri bozar (7). Diyabetik hastalarda vasküler hasar, büyük ve orta boy arterlerdeki ateroskleroza bağlı periferik arter hastalığı nedeniyle periferik doku beslenmesini bozarak yara oluşumu ve sonucunda gangren gelişimine zemin hazırlar. Bunun dışında arteriyel bir tıkanıklık olmaksızın kutanöz arteriyovenöz kaçaklara bağlı kapiller beslenmede hasar oluşur ve bu zeminde nöropatik ödem ve sıcaklık artışı ile birlikte interlökin salınımıyla inflamasyon oluşur. Bunlarla birlikte osteoklastik aktivite de artar. Bu süreç, Charcot ayağı olarak bilinen nöroosteoartropati ile sonlanır (7). Genellikle ağrılı olmayan, kızarıklık, şişmiş ve sıcak bir ayak deformasyon gelişmemiş olsa da Charcot ayağı olarak değerlendirilmelidir. Yanlış ve gereksiz antibiyoterapi kullanımını önlemek için bu durumun ayak enfeksiyonundan ayırt edilmesi gerekir (1).

Diyabetli hastalarda gelişebilen görme kaybı, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalığa bağlı sekeller, ayak hijyenindeki bozukluk, otonom nöropatiye bağlı aşırı kuruluk ve deride çatlamalar ülser gelişimini kolaylaştıran diğer nedenlerdir. Hastalar ülseri ayak üzerine basmaya devam ettiği ve hastaneye başvurma süresi uzadığı için iyileşme gecikmektedir. Ayrıca kontrollü olmayan yüksek seyreden kan şekeri etkisi

ile lökositlerde migrasyon, adezyon, fagositoz ve opsonizasyonun bozulması iyileşmeyi zorlaştırır. Bu nedenle ayak yarası iyileşmesinde iyi glisemik kontrol esastır (1).

2.1.6. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONLARI

Diyabetik ayak, diyabetin en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olup; hastane yatışlarının ve travmaya bağlı olmayan uzuv amputasyonlarının en sık nedenidir. Diyabetik hastaların dörtte birinde hayatlarının bir döneminde diyabetik ayak enfeksiyonu gelişmektedir. Bu komplikasyon; önemli iş gücü kaybına, sakatlıklara, psikososyal travmaya neden olmakta, yüksek maliyetlerle sonuçlanmaktadır (12, 13). Enfeksiyon, diyabetik ayak yaralarının yarısından fazlasında karşılaşılan bir sorundur. Orta derece enfeksiyonların %20'sinde, şiddetli enfeksiyonların ise % 50 - 60'ında osteomyelit de gelişmektedir. Dünyada her yarım dakikada bir bu komplikasyon ayak kaybına neden olmaktadır (14).

Ülkemizde yapılan araştırmalarda diyabet tanılı hasta sayısının yaklaşık 7 milyon olduğu belirlenmiştir (15). Diyabetik ayak enfeksiyonu olan hasta sayısı yaklaşık 500 bin olup, Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK) Medulla Sistemi kayıtlarına göre bu hastaların tedavi maliyeti 475 milyon TL'dir (7). Diyabetik ayak ülserleri ve enfeksiyonları kontrollü diyabet ve ayak bakımı eğitimi ile oluşması engellenebilecek bir komplikasyondur. Ayrıca erken tanı ve uygun tedavi ile oluşabilecek ağır sonuçlar önlenabilir. Giderek artan diyabet prevalansını öngörerek bu önemli sağlık sorununda akılcı yaklaşımlar geliştirmek esastır. Ayak ülserleri ve enfeksiyonlarına bağlı amputasyonların mümkün olduğunca azaltılması amacıyla hastaların multidisipliner bir anlayış içinde yakın takip ve tedavisi, yeni ülser gelişiminin önlenmesi için hasta, hasta yakınları ve tıbbi ekibin düzenli olarak eğitimi gereklidir. Koruyucu hekimlik, diyabetik ayak tedavisinin merkezinde yer almalıdır.

2.1.6.1. TANIM

Diyabetik ayak enfeksiyonu; mikroanjyopatiye bağlı ayak ülseri zemininde, regüle olmayan kan şekerleri ve diyabete bağlı bağışıklık sistemi sorunları ile gelişmesi kolaylaşan enfeksiyon tablosudur (16). Enfeksiyonun tanısı mikrobiyolojik, laboratuvar ve radyolojik tetkiklerden önce klinik olarak konulur (17). Yara yerinde pürülan sekresyon ve kızarıklık, ağrı, gerginlik, endürasyon, sıcaklık, lenfanjit, kötü koku ve gaz oluşumunda enfeksiyon düşünülmelidir. Bu tanıma uyan lezyonlar paronişi, selülit,

miyozit, apse, nekrotizan fasiit, septik artrit, tendinit ve osteomiyelit şeklinde görülebilir (18).

2.1.6.2. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONU OLUŞUM MEKANİZMASI VE RİSK FAKTÖRLERİ

DAE oluşum mekanizmaları ve risk faktörleri aşağıda tablo 2' de gösterilmiştir (18).

Tablo 2. DAE oluşum mekanizmaları ve risk faktörleri	
Risk Faktörleri	Hasar Oluşum Mekanizması
Periferik motor nöropati	Pençe parmaklar, yüksek ayak arkı, metatarsofalangeal eklemlerde çıkıklık nedeniyle bozulmuş anatomi ve biyomekanik denge nedeniyle aşırı basınca, kallus ve ülser gelişimine yol açar
Periferik sensorial nöropati	Koruyucu duyunun yokluğu, aşırı basınç, mekanik ya da ısı ile oluşan minör hasarların algılanamaması
Periferik otonom nöropati	Terlemeyle kayıp, cildin kuruma ve çatlamasına yol açar.
Nöro-osteoartropatik deformite (Charcot eklemi)	Anormal anatomi ve bozulmuş biyomekanik denge, özellikle de midplantar alanda olmak üzere aşırı basınca yol açar
Vasküler (arteriyel) yetmezlik	Dokunun canlılığında, yara iyileşmesinde ve nötrofil dağılımında bozukluk oluşumu
Hiperglisemi ve diğer Metabolik bozukluklar	İmmünolojik fonksiyonlarda (özellikle de nötrofillerde) bozukluk ve aşırı kollajen çapraz halka oluşumu
Hastaya ait yetmezlikler	Görmede azalma, hareketlerde sınırlılık ve amputasyonlar
Hasta davranışlarında uyum bozukluğu	Koruyucu önlemlere uymama, ayak bakımı hijyenini yerine getirmeme, tıbbi bakıma tolerans azlığı, uygunsuz aktiviteler, aşırı yük kaldırma ve kötü ayakkabı kullanımı
Sağlık sisteminde eksiklikler	Yetersiz hasta eğitimi, kötü glisemik kontrol ve ayak bakımı

2.1.6.3. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONU SINIFLANDIRILMASI

Diyabetik ayak enfeksiyonlarının uygun tedavi ve takiplerinin yapılabilmesi ayrıca iyileşmeyle ilgili öngörü sağlanabilmesi için uygun bir sınıflama yapılması esastır. PEDIS sınıflandırması ucuz ve diyabet ilişkili ayak komplikasyonlarını öngörü değeri yüksek bulunduğu için yaygın olarak kabul görmüştür. Uluslararası Diyabetik Ayak Çalışma Grubu (International Working Group on the Diabetic Foot) tarafından yayınlanan uzlaşi raporu ile bu sınıflama uygulamaya girmiştir: Doku beslenmesi (Perfusion), Yaygınlık/büyüklik (Extent/size), Derinlik/doku kaybı (Depth/tissue loss), enfeksiyon (Infection) Duyu (Sensation) akrostişi PEDIS olarak tanımlanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. PEDIS Sınıflandırması (19)
<i>Doku beslenmesi</i>
Derece 1: PAH belirti ve bulgularının olmaması ve bununla birlikte: • Arteria dorsalis pedis ve arteria tibialis posterior'un palpe edilebilmesi veya • ABI 0,9-1,1 veya • TBI > 0,6 veya • TcPO2 > 60 mmHg.
Derece 2: PAH belirti ve bulgularına karşın bacakta ciddi iskemi olmadığına ilişkin: • Claudicatio intermittens (kesik topallama) veya • ABI <0,9; ancak sistolik ayak bileği basıncı > 50 mmHg veya • TBI <0,6; ancak sistolik ayak parmağı basıncı > 30 mmHg veya • TcPO2 30-60 mmHg veya • İnvazif olmayan testlerle saptanan PAH ile uyumlu diğer bozukluklar.
Derece 3: Bacakta ciddi iskemi olduğuna ilişkin: • Sistolik ayak bileği basıncı < 50 mmHg veya • Sistolik ayak parmağı basıncı < 30 mmHg veya • TcPO2 < 30 mmHg olması.
<i>Yaygınlık/büyüklik</i>
Yara büyüklüğü cm ² olarak (mümkünse) debridman sonrasında belirlenmelidir. Yaranın dış sınırı, yarayı çevreleyen sağlam deriden itibaren ölçülmelidir.

Tablo 3. (Devamı)

Derinlik/doku kaybı
Derece 1: Dermisten daha derin dokulara penetre olmamış, yüzeysel tam kat yara Derece 2: Dermisin altında, deri altı yapılara penetre olmuş, fasya, kas veya tendon tutulumu olan derin yara Derece 3: Kemik ve eklemi de içerecek şekilde ayağın tümüyle tutulması (direkt muayeneye veya “probing to bone” yöntemiyle).
İnfeksiyon
Derece 1: İnfeksiyon belirti ve bulgusu olmaması.
Derece 2: İnfeksiyonun yalnız deri ve deri altı dokuları tutması (daha derin dokuların tutulumu veya sistemik bulgular olmaksızın) ve aşağıdakilerden en az ikisi: • Yerel şişlik veya endurasyon • Yara çevresinde 0,5-2 cm eritem • Yerel duyarlılık veya ağrı • Yerel sıcaklık artışı • Pürülan akıntı (koyu, rengi opaktan beyaza değişen ya da kanlı sekresyon). Deride inflamatuvar yanıt oluşturabilecek travma, gut, akut Charcot osteoartropatisi, kırık, tromboz ve venoz staz gibi diğer nedenler dışlanmalıdır.
Derece 3: Genişliği 2 cm’nin üzerinde olan eritem ve yukarıda sayılan bulgulardan (şişlik, duyarlılık, sıcaklık, akıntı) en az birisi veya enfeksiyonun, apse, osteomiyelit, septik artrit veya fasiit biçiminde deri ve deri altı dokularından daha derin yapıları tutması. Aşağıda tanımlanan SIRS bulguları yoktur.
Derece 4: SIRS bulgularıyla birlikte herhangi bir ayak enfeksiyonu. SIRS, aşağıdakilerden iki veya daha fazlasının olmasıdır: • Vücut sıcaklığı > 38°C ya da < 36°C • Nabız > 90/dakika • Solunum sayısı > 20/dakika ya da PaCO₂ < 32 mmHg • Lokosit sayısı > 12 000 ya da < 4000/μl ya da ≥ %10 band formasyonu.
Duyu
Derece 1: Etkilenen ayakta duyu kaybı yok.
Derece 2: Etkilenen ayakta duyu kaybı var. • Ayağın plantar yüzeyindeki uç bölgeden en az ikisinde bası duyusunun olmadığıнын 10 g’lık monofilamanla belirlenmesi. • Ayak başparmağı üzerinde vibrasyon duyusunun olmadığıнын (128 Hz’lik diyapozonla) ya da vibrasyon eşiğinin >25 V olduğunun (yarı kantitatif yöntemlerle) belirlenmesi.

Kısaltmalar: PEDIS: "Perfusion", "extent", "depth", "infection", "sensation", PAH: Periferik arter hastalığı, ABI: Ayak bileği-kol indeksi ("ankle-brachial index"), TBI: Ayak başparmağı-kol indeksi ("toe-brachial index"), TcPO2: Transkutanöz O2 basıncı. SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

2.1.6.4. DİYABETİK AYAK MİKROBİYOLOJİSİ

Diyabetik ayakta enfeksiyon bulgularının akut ya da kronik bir süreçte oluşması ayrıca enfeksiyonun şiddeti etken dağılımını değiştirmektedir. Akut gelişen yüzeysel enfeksiyonlarda ve önceden antibiyotik kullanım öyküsü olmayan hastalarda etken olarak karşımıza derideki çatlaklara kolonize olan aerobik gram pozitif koklar baskın olarak çıkar ve sıklıkla monomikrobiyaldir. Bu hastalarda sıklıkla *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* izole edilmektedir. Kronik süreçte oluşan daha derin yerleşimli enfeksiyonlarda ve önceden antibiyotik kullanımı olan hastalarda ise etken dağılımı sıklıkla polimikrobiyal olup; etkenler enterokoklar ve diğer gram pozitif etkenler, enterobakterler, anaeroplara (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* spp., peptostreptokoklar), *Pseudomonas aeruginosa* ve bazen diğer non-fermentatif gram negatif basillerdir (7). Nekrotik yumuşak doku veya kemik etrafındaki bozulmuş konak savunması, koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ve *Corynebacterium* türleri gibi düşük virülanslı kolonizan bakterilerin patojenik rol kazanmasına neden olabilir. Diğer taraftan derin veya penetran ülserler ile belirgin doku nekrozu veya gangrenin eşlik ettiği ülserlerde mikst enfeksiyon varlığı düşünülür. *Clostridium perfringens* klostridyal miyonekroz veya gazlı gangren etkenidir. A grubu β -hemolitik streptokoklarda (*Streptococcus pyogenes*) diyabetik hastada nekrotizan fasiite neden olur (20). Ülkemizde yapılan çalışmalarda bulunmuş olan diyabetik ayak enfeksiyonu etken dağılımı tablo 4'te verilmiştir (11, 13, 21 - 23).

Tablo 4. Türkiye’de diyabetik ayak enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalar				
Çalışmacılar	İzole edilen suş sayısı	Gram pozitif bakteriler (%)	Gram negatif bakteriler (%)	Etken dağılımı (%)
Saltoğlu et al.	208	92 (44,2)	114 (54,8)	1. MSSA (17,8) 2. <i>P. aeruginosa</i> (17,3) 3. <i>E. coli</i> (14,4) 4. MRKNS (8,6) 5. Streptokoklar (6,7)
Ertuğrul et al.	115	55 (47,8)	55 (47,8)	1. <i>P. aeruginosa</i> (18,4) 2. Streptokoklar (14,8) 3. <i>S. aureus</i> (13,9) 4. Enterokoklar (12,2) 5. <i>E. coli</i> (7,8)
Kandemir et al.	104	42 (40,4)	64 (59,6)	1. <i>S. aureus</i> (29,8) 2. <i>E. coli</i> (20,1) 3. <i>P. aeruginosa</i> (19,2) 4. Enterokoklar (7,6) 5. KNS (4,8)
Özaydın et al.	93	49 (52,7)	44 (47,3)	1. <i>S. aureus</i> (28) 2. <i>E. coli</i> (18,3) 3. <i>Klebsiella</i> spp. (12,9) 4. Enterokoklar (12,9) 5. <i>P. Aeruginosa</i> (8,6)
Saltoğlu et al.	89	38 (43)	51 (57)	1. MRKNS (16,9) 2. <i>P. aeruginosa</i> (14,6) 3. Enterokoklar (11,2) 4. Streptokoklar (9,0) 5. <i>E. coli</i> (7,9)

Daha önce MRSA kolonizasyonu ve enfeksiyon öyküsü geçirmiş olmak hastada tekrar MRSA enfeksiyonu için önemli bir risk oluşturur. Türk Diyabetik Ayak Uzlaş Raporunda aşağıdaki faktörlerin varlığında DAE olan hastaların MRSA açısından değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu faktörler; şiddetli enfeksiyon, altı haftanın üzerinde yara varlığı, son bir yıl içerisinde hastaneye yatış, uzun süreli antibiyotik (kinolon gibi) kullanımı öyküsü, osteomyelit, önceki MRSA kolonizasyonu ya da enfeksiyonu, yüksek yerel MRSA oranları (orta derece enfeksiyon için % 30; hafif enfeksiyon için % 50), kronik böbrek yetmezliği nedeniyle diyalize girmek ya da bakım merkezinde kalmak olarak sıralanabilir. *P. aeruginosa*, ülkemiz gibi hastanın ayak parmak aralarının çoğu kez ıslak kaldığı durumlarda ya da nemli iklimlerde yaşayan hastalarda, nemli yara örtüsü ve hidroterapi maruziyetinde sıklıkla karşılaşılan bir etkindir (7, 21). Yapılan çalışmalarda % 10'un altında etken olarak izole edilmekle birlikte ülkemizde yapılan çalışmalarda % 4 - 20 oranlarında etken olarak bildirilmiştir (13, 21). Bununla birlikte daha önce *P. aeruginosa*'ya maruz kalınması, MRSA'da olduğu gibi tekrar enfeksiyon riskini arttırmaz (7). Dirençli enterik gram-negatif çomaklar, özellikle GSBL oluşturan enterik bakterilerin görülme sıklığı; hastanede uzun süreli yatış ve antibiyotik kullanımı özellikle sefalosporin ve kinolon kullanımı öyküsü olan hastalarda oluşan kronik ve derin yaralarda artmaktadır. Enterokoklar da, sıklıkla önceden sefalosporin grubu antibiyotik tedavisi almış hastaların yara kültürlerinden izole edilir (24).

Diyabetik ayak enfeksiyonlarında çoklu ilaca dirençli etkenlerde son yıllarda artış görüldüğü bildirilmektedir. ABD'de izole edilen ilk vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun diyabetik ayak enfeksiyonu nedeniyle tedavi edilen bir hastadan izole edilmiş olması da bu hastaların çoklu ilaca dirençli etkenler açısından önemli bir risk olduğunu göstermektedir (25). Bu hastalarda dirençli etkenler açısından risk faktörleri; antibiyotik kullanmış olmak, daha önce mevcut yara için daha önce hastanede yatmak veya amputasyon yapılmış olması, hastanede yatış sırasında osteomyelit tanısı konulup ikincil enfeksiyon atağı geçirmek olarak sıralanabilir (21, 22, 26, 27). Diyabetik hastalarda bakteriyel enfeksiyon gelişmesi için kolaylaştırıcı rol oluşturan ayak mantarı da önlenmelidir.

2.1.6.5. DİYABETİK AYAKTA OSTEOMİYELİT

Diyabetik ayak enfeksiyonlarının tüm evrelerinde, değişik görünümde yumuşak doku enfeksiyonu bulunur. Klinik açıdan en önemli sorun, enfeksiyona osteomiyelitin eşlik etmesidir. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında, yaklaşık % 50 - 60 oranında bir komplikasyon olarak osteomiyelit karşımıza çıkar (24). Bu komplikasyon amputasyon riski ile artan morbidite ve mortalite oranlarıyla doğru orantılıdır (21, 28). Osteomiyelit tanısında kemik biyopsisi, histopatolojik inceleme ve mikrobiyolojik inceleme sonucu ile tedaviyi yönlendirmesi açısından altın standart olmakla birlikte girişimsel bir işlem olması nedeniyle günlük uygulamada kullanımı zordur (29 - 31). Bu nedenle osteomiyelit tanısında fizik muayene ve laboratuvar bulguları, kemik sondajı yöntemi ve görüntüleme metotları da araştırılmaktadır. Hastanın hikayesinde geçmişte amputasyon yapılması; fizik muayenesinde yara yüzeyinin 2 cm²'den büyük ve derinliğinin 3 mm'den fazla olması, osteomiyeliti düşündürmelidir (32, 33). Ülkemizde yakın zamanda yapılmış çok merkezli bir çalışmada, yara yüzeyinin genişliğinin 4,5 cm²'den büyük olmasının osteomiyelit olasılığını yaklaşık üç kat arttırdığı gösterilmiştir (21). Ucu künt metal prob ile yapılan kemik sondajının (probing to bone) osteomiyelit tanısında duyarlılığı % 38 – 87, özgüllüğü ise % 85 – 92 arasında değişmektedir (33). Ancak bu yöntem ile yara yüzeyindeki bakteriler derin dokuya itilebilmektedir. Fizik muayene bulguları osteomiyelit ile karışabilen Charcot eklemünde tarsometatarsal eklem tutulur ve deri bütünlüğü genellikle bozulmaz; osteomiyelitte ise genellikle metatars başı tutulur ve deri üzerinde ülser lezyon ve/veya fistül ağzı bulunur. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) laboratuvar testlerinden osteomiyelit tanısında en faydalı olanıdır ve 70 mm/saat üzerinde olması osteomiyelit açısından iyi bir göstergedir (27, 34). Düz grafilerde demineralizasyon, periost reaksiyonu ve kemik yıkımı gibi osteomiyelit göstergeleri enfeksiyon başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra görülebildiği için düz grafilerin akut osteomiyelitte duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Akut osteomiyelitte üç ve/veya dört fazlı ve ardından işaretli lökosit ile çekilmiş kemik sintigrafisi ve MR görüntüleme tercih edilmelidir. Kronik osteomiyelitte ilk tercih direkt grafi olmalıdır. MR görüntülemenin sintigrafiye göre en önemli üstünlüğü, yapılacak cerrahi girişim için yumuşak dokuda cerrahi sınırları daha iyi gösterebilmesidir (23, 33). Buna karşın, Charcot eklemi patolojisi ile osteomiyelit ayırıcı tanısında, sintigrafi MR görüntülemeye göre daha iyi sonuç vermektedir. Kemik doku mikrobiyolojik incelemesinde üreme olması % 92 duyarlılık ve % 60 özgüllük ile osteomiyelit tanısında yararlı bir yöntemdir (35).

2.1.6.6. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ

Diyabetik ayak enfeksiyonunun tedavisi birçok açıdan değerlendirme gerektiren kompleks bir sorundur. Bu hasta grubunda uygun antibiyotik tedavisi ile birlikte nekrotik ve ölü dokuların debridmanı yapılarak; hastanın ayağını ve yaşamını kurtarmak hedeflenmelidir. Hastanın ilk değerlendirmesinde genel durumunun ciddiyeti ve yatış endikasyonu belirlenmelidir. Hastada sepsis bulgularının olması, metabolik olarak ciddi hiperglisemi, asidoz, azotemi ve elektrolit anormallikleri eşlik etmesi, yaranın derin dokulara penetre olması, selülit bulgularının genişliği (> 2 cm) inflamasyonun hızla çevre dokulara yayılması, krepitasyon, bül, endürasyon, renk değişikliği, nekroz, gangren eşlik etmesi, ayrıca uygun antibiyotik tedavisine rağmen enfeksiyon bulgularının ilerlemesi bize tablonun ciddiyetini gösterir (36). Hastada metabolik tablonun stabil olmaması, şiddetli enfeksiyon bulunması ve parenteral tedavi gerekmesi, şiddetli enfeksiyonu olanlar, ciddi PAH'ı ve orta derece enfeksiyonu olan hastalar, ayaktan yapılamayacak tanısal test gerekliliği, cerrahi girişim gerekliliği, ayaktan tedaviyle iyileşemeyen ve psikolojik veya sosyal nedenlerden dolayı evdebakımı yapılamayan hastalar hastaneye yatırılarak takip edilmelidir. Daha sonra hastanın enfeksiyon tanısı uluslararası sınıflama önerileri dikkate alınarak yapılmalıdır (24). Sonrasında başlanacak olan antibiyotik tedavisinin kararı verilmelidir. Eğer hastada genel durum bozukluğu ve septik tablo varsa; kültür için örnekler alındıktan sonra, hızla geniş spektrumlu bir antibiyotiğe başlanmalı, hafif veya orta düzeyde bir enfeksiyonun olması durumunda ise aciliyeti yok ise empirik tedaviye başlanmamalı ve antibiyotik tedavisi, uygun tekniklerle alınan örneklerin kültür ve antibiyogram sonucuna göre belirlenmelidir. Empirik tedavide yalnız etken olabilecek bakterilerin kapsanması hedeflenmeli; yeterli doku düzeyi, düşük yan etki ve hasta uyumu gözetilmeli; etkin ilaçlar belirlenmiş dozlarda ve sürede kullanılmalıdır. Empirik antibiyotik seçiminde klinik ve epidemiyolojik veriler dikkate alınmalıdır. Varsa önceki kültür sonuçları, patojenlerin yerel prevalansı, özellikle de antibiyotiklere dirençli bakterilere ilişkin yerel veriler değerlendirilmelidir (7).

Hafif ve orta şiddetli enfeksiyonu olan hastalarda, son bir ayda antibiyotik kullanım öyküsü yoksa yalnız aerob gram pozitif bakterileri hedeflemek yeterlidir. Ekstremitte kaybı riski olan orta derece ve şiddetli enfeksiyonlar için hastaneye yatırılarak geniş spektrumlu parenteral tedavi önerilir. Antibiyotik etki alanı *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. türleri gibi aerob gram-pozitif kokları ve *E.coli*, *Klebsiella*,

Enterobacter ve *Proteus* türleri gibi *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerini; eğer risk faktörü varsa ya da enfeksiyon şiddetliyse *P. aeruginosa* gibi nonfermentatif gram negatif bakterileri ve nekrotik lezyonlar varsa *Bacteroides* türleri gibi anaeroplara kapsamalıdır. Şiddetli enfeksiyonlarda geniş spektrumlu empirik antibiyotik tedavisi başlanmalıdır; varsa önceki kültür sonuçları ve antibiyotik duyarlılık verileri dikkate alınmalıdır. Polimikrobiyal etioloji düşünülmeli ve gram-pozitif + gram-negatif (fermentatif ve nonfermentatif) + anaerob bakteriler bir arada kapsanmalıdır (7).

Antibiyotik tedavisi, yara tamamen iyileşene kadar değil enfeksiyon bulgularının ortadan kalkmasına kadar sürdürülür. Antibiyotik tedavi süreleri sadece yumuşak doku enfeksiyonu varlığında; hafif enfeksiyonda (PEDIS 2) oral 1 - 2 haftalık tedavi, orta düzeyde enfeksiyonda (PEDIS 3) oral veya parenteral 1 - 3 haftalık tedavi, şiddetli enfeksiyonda (PEDIS 4) parenteral 2-4 hafta tedavi önerilmektedir. Kemik ve eklem enfeksiyonu da mevcutsa amputasyon veya debridman sonrası enfekte doku kalmamışsa parenteral veya oral 2-5 gün tedavi, amputasyon veya debridman sonrası sadece yumuşak dokuda enfeksiyon var ve kemik doku temiz ise parenteral veya oral 1 - 3 hafta tedavi, amputasyon veya debridman sonrası enfekte kemik ve yumuşak doku kalmışsa parenteral tedavi sonrası oral ardışık tedavi 4 - 6 hafta, cerrahi uygulanamadı veya cerrahi sonrası ölü kemik doku kaldı ise parenteral tedavi sonrası oral ardışık ≥ 3 ay tedavi verilmesi önerilmiştir (34).

Yara içinde bulunan ölü dokular ve debris iyileşmeyi engeller, yara kapanmasını geciktirir, topikal tedavi preparatlarının emilimini önler, bakteriler için elverişli besin kaynağı oluşturur, aşırı inflamatuvar yanıtla bağlı septik yanıt oluşmasına sebep olur ve enfeksiyon bulgularını maskeleyebilir. Bu sebeplerden dolayı debridman yara tedavisinin temelini oluşturur ve sağlıklı granülasyon dokusu oluşması için gereklidir. Debridman yaradan ölü dokular, eskar, yara kabukları, enfekte dokular, hiperkeratoz, hematoma, apse materyali, yabancı cisimler, kemik parçaları veya her tür doku artığının temizlenmesi işlemidir. Debridman yapıldıktan sonra kültür için uygun örnekler de alınabilir. Debridmanla enfekte dokunun tamamen temizlenmesi mümkün olmadığında ve hastanın kalan enfeksiyon yüküyle başa çıkamayacağı durumlarda, enfeksiyon bulunmayan güvenli bir düzeyden amputasyon yapılması yaşam kurtarıcı olacaktır. En son aşamada ise rekonstrüksiyon yapılarak ayak tabanının yere dengeli olarak basmasını sağlamak amaçlanır.

2.2. BİYOFİLM

2.2.1. TANIM

Biyofilm varlığı ilk olarak 17. yüzyılda Loewenhoek'un kendi dışından aldığı plaklar içinde yaşayan mikroorganizmaları tanımlamasıyla ortaya konmuştur. Yıllar içinde farklı tanımlamaları yapılan biyofilm günümüzde; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş bir matrikstir (37). Mikroskopik incelemelerle bakterilerin doğadaki sıvı ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının tamamına yakını biyofilm aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Derin yer altı suları ile okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (38). Biyofilmin ekosistemdeki yeri yanında tıpta da öncelikle yabancı cisim enfeksiyonları olmak üzere birçok kronik enfeksiyonda da önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır (39). Mikroskopik incelemede biyofilm; organik ve inorganik moleküllerden oluşmuş matriks yapı içinde koni ve mantar şekilli birbirine ve çevreye yapışmış yapılar ve arasında basit su kanallarından oluşan bir sistemdir (40). Bir biyofilmin yapısı % 97 su olmak üzere % 2-5 mikroorganizma, % 1-2 polisakkarid, % 1-2 protein, % 1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır. Örneğin; *P. aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye almaktadır (41).

2.2.2. BİYOFİLM OLUŞUMUNDA BAKTERİLER ARASI HABERLEŞME: “QUORUM SENSING”(QS)

Bakteri biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan “quorum sensing” adı verilen iletişim sinyalleri aracılığıyla kontrol etmektedir. Bir bakteri patogenezi için çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirir ve çevredeki bir koşul değişikliğinde metabolizmasında değişiklikler yaparak adapte olmaya çalışır (42). QS kavramı “minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilebilir. QS sistemi de bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan bir sistemdir (42, 43). Bu sinyaller sayesinde bir odakta toplanan mikroorganizmalar biyofilmin temelini oluşturur. Doğal ortamda mikroorganizmalar çevresel uyarılara bağlı olarak planktonik (serbest) veya bir yüzeye tutunmuş durağan fazda bulunur. Durağan faza geçiş genellikle besin kaynaklarındaki bir yetersizliğe bağlı olarak gelişir ve hücreler kendilerini biyofilm içinde korumaya alır. QS sisteminin bakteriye getirdiği pekçok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konak immün yanıtından kaçabilir. QS sistemi içinde en önemli rolü sinyal molekülleri üstlenir. Bu moleküllere aynı zamanda “autoinducer”da denilmektedir. Bakterilerdeki sinyal molekülleri gram negatif bakterilerde asilhomoserin lakton, siklik dipeptidler, gram pozitif bakterilerde küçük peptidler, hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde autoinducer-2’ dir (44).

2.2.3. MİKROORGANİZMALARDA BİYOFİLM OLUŞTURMA NEDENLERİ

Biyofilm içerisindeki bakterilerin büyüme hızlarının planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olmasına karşın, bakterinin biyofilm oluşturmasını gerektiren durumlar vardır. Bunlar:

- 1- Savunma
- 2- Tutunma ve Kolonizasyon
- 3- Yaşanabilir çevre geliştirme
- 4- Topluluk oluşturmak

1- Savunma:

Mikroorganizmanın strese verdiği yanıttır. Çevreden alınan tehlike sinyallerine cevap olarak kendini biyofilm oluşturarak koruma altına alır. Biyofilm oluşturan organizmalar planktonik hücrelere göre oksijen radikalleri, dezenfektanlar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, fagositoz ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm, kronik seyirli enfeksiyonlarda strese yanıt olarak gelişebilmektedir. Biyofilm yapısının önemli bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaridler (EPS) bulunduğu bakteriyi elektrik çekim alanlarından uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan, antibiyotik etkisinden korur (37, 45).

2- Tutunma ve kolonizasyon:

Mikroorganizmalar vücudun bir bölgesinde yaşayabilmek için biyofilm oluşturur ve ortama tutunmak için yöntemler geliştirir. Bakterilerin ortama tutunmasında en önemli faktörler; bakteri yüzey proteinleri ile ortamda bulunan fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinleridir (46). Bakteriler adezyonu gerçekleştirdikten sonra çoğalmaya devam ederken diğer taraftan biyofilm yapmaya başlarlar. Biyofilm oluşumu bakteri tutunmasını artırır (47, 48).

3- Yaşanabilir çevre geliştirme:

Bakterilerin ekzopolisakkarit üretimi ve biyofilm oluşturmaları ortamda bulunan glukozun bakteriler tarafından kullanılması ile belirgin olarak artmaktadır. Karbon katabolitlerinin ise yüzeye yapışmış bakterinin gen düzenlenmesini indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakta uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm oluşturduğunu düşündürmektedir (49 - 51).

4- Topluluk oluşturmak:

Kazanımların ortak olarak paylaşımıdır. Bakterilerin ortama uyumundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdıkları gibi ortamdan aldıkları uyarılar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Bu değişim, ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Biyofilmdeki tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu yaşamlarının en önemli göstergesidir (40).

2.2.4. BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI

Bu oluşum basamakları ise şu şekilde açıklanmaktadır;

- 1- Yüzeye geri dönüşümlü bağlanma
- 2- Yüzeye geri dönüşümsüz bağlanma
- 3- Mikrokoloni oluşumu
- 4- Olgun biyofilm oluşumu
- 5- Planktonik hücrelerin biyofilmden kopması

1-Yüzeye geri dönüşümlü bağlanma

Bu gevşek bir bağlanma şekli olup gerçekleşmesi için bakteri ve yüzey arasında yeterli yakınlığın (<1 nm) oluşması gerekir. Bu mesafede her iki yüzey arasında itme ve çekme gücüne göre bağlanma gerçekleşir. Bu güçler; elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals etkileşimleri, ısı ve hidrodinamik güç şeklinde olup zayıf etkili güçlerdir (52, 53). Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür. Bu evrede hücreler durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Mikroorganizmalar dönüşümlü olarak bağlanırken yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesinin olup olmadığını da araştırmaktadırlar (54).

2-Yüzeye geri dönüşümsüz bağlanma

Bakteriler kendisi için uygun yeri bulduğunda yüzeyle olan bağlantısını kuvvetlendirmeye başlamaktadır. Geri dönüşümsüz bağlanmada yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimleri, iyon-dipol etkileşimleri, kovalent bağlar, iyonik bağlar ve hidrojen bağı etkileşimleri oluşur. Flajella, pilus ve fimbria gibi ligandları ile ökaryotik hücrelerdeki ligandlara geri dönüşümsüz ve spesifik olarak bağlanır (55). Yapışan bakteriyi diğer bakteriler izler ve yapışma yüzeyinde tekli bir tabaka oluşur. Tip 4 pili defektif mutant *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm formasyonu mikrokoloni aşamasını geçememektedir (56).

3-Mikrokoloni oluşumu

Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde ilk koloniyi oluşturduktan sonra, aynı yüzeyde diğer bakteriler de ikincil bir koloniyi oluşturur. Mikroorganizma yüzeye adezyonunu tamamlarken bir yandan da EPS üretimine başlar. Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmaların sayısı çoğalır (54). Biyofilm temel olarak mikroorganizmalar ve EPS'den oluşur. EPS biyofilm içerisindeki karbon kaynağının % 50 - 90'ını oluşturarak biyofilm yapısının temel iskeletini oluşturmasının yanında diğer bir önemi ise yapısında birçok molekülü barındırabilmesi (metal iyonlar, katyonik bileşikler, DNA, protein, lipit, fibrin, eritrosit) ve buna bağlı olarak mikroorganizmalar için yaşanabilir bir mikro çevre oluşturmasıdır (57).

4- Olgun biyofilm oluşumu

Dördüncü evrede mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (58).

5- Planktonik hücrelerin biyofilmden kopması

Biyofilmler, genel olarak mantarimsı görünümde olup tabanında ağırlıklı olarak durağan fazdaki bakteriler bulunurken yüzeye doğru bakteri dağılımı seyrelmektedir. Uygun ortamın gelişmesi halinde bakteriler özel bir iletişim sistemi ile haberleşerek rahatlıkla bu evreden çıkarak planktonik forma geçebilmekte ve oluşmuş biyofilm içerisinde koparak vücudun başka bölgelerine ulaşabilmektedir. Üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Kopma süreci bir dengeye oturunca sürekli hale gelmektedir. Yapışkan biyofilm toplulukları içindeki bakteriler yeni yüzeylere yapışır (59, 60)

2.2.5. BİYOFİLM ENFEKSİYONLARI VE DİRENÇ

Biyofilm enfeksiyonları, kistik fibröz akciğer enfeksiyonları, periodontit, doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kronik yara enfeksiyonları yanında protez kapak, santral venöz kateter, üriner sonda, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonlarında da karşımıza çıkmaktadır. Hastaneden kazanılmış enfeksiyonların % 60'ından fazlası biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (61). Tıbbi gelişmelerle orantılı olarak artan yabancı cisim uygulamaları da biyofilmin önemini artırmaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerde

serbest formlara oranla antibiyotiklere 100 - 1000 kat oranında direnç geliştirebilmektedir. Dirençten sorumlu mekanizmalar sıklıkla enzimatik inaktivasyon, atım pompaları, ilaç hedefinde mutasyondur. Serbest formu antimikrobiyallere duyarlı olup biyofilm oluşturarak direnç geliştiren bir bakteri, tekrar serbest hale geçtiğinde antibiyotiklere duyarlı hale gelebilir (60, 62).

Biyofilm antimikrobiyaller dışında dezenfektanlara da dirençte önemlidir. Biyofilm oluşturan bakteriler serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10 - 100 kat daha dirençlidir. Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedir (63).

Biyofilmden antibiyotik direnci ile ilişkili olduğu düşünülen faktörler; antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonları, bakterilerin çoğalma oranlarında değişiklikler ve mikro çevre değişiklikleri olarak sıralanabilir (64).

Antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonu

Biyofilm yapısının büyük kısmını oluşturan EPS fiziksel bir bariyer olarak antibiyotik ve dezenfektanların mikroorganizma hücrelerine penetrasyonunu engelleyebilir. Bu mekanizmanın özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisinin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir. Biyofilm içindeki ozmotik çevre değişiklikleri ozmotik bir strese yol açıp bakterideki porin yapısında veya miktarında değişikliklere neden olabilir. Bu durum da özellikle beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine girişini kısıtlayabilir (65). Azalmış penetrasyon olayı antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu ile birlikte olduğunda direnç daha da belirginleşmektedir. *P. aeruginosa*'nın serbest formuna siprofloksasinin penetrasyonu normalde 40 saniye iken, aynı genetik yapıya sahip biyofilm oluşturmuş formunda penetrasyonun 21 dakika olduğunun gösterildiği bu çalışma da biyofilmin bariyer görevini desteklemektedir (66).

Mikro çevre değişiklikleri

Biyofilm içerisindeki besin maddeleri ve oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak bakterilerin biyofilm içindeki yoğunluğu değişkenlik göstermektedir. Dış kısımdaki bakteriler oksijen ve besinlere daha kolay erişebilmekte ve bu da biyofilm içinde bakterilerin dağılımını değiştirmektedir. Biyofilm içerisindeki bu heterojen yapı

antimikrobiyal ajanların öncelikli olarak metabolik olarak aktif hücreleri hedef almaları nedeniyle antibiyotik duyarlılığında farklılıklara yol açmaktadır. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda anaerobik ortamın oluşması nedeniyle özellikle aminoglikozidlerin etkinliği azalmakta ve direnç gelişebilmektedir (63). Asit özellikteki atık maddeler nedeniyle de ortam pH' nın değişmesi bazı antibiyotik etkilerini olumsuz etkilemektedir. Bahsettiğimiz tüm mikro çevre değişiklikleri biyofilm oluşumunu kolaylaştırır ve özellikle aminoglikozid, tetrasiklin ve makrolidlerin antibakteriyel etkisini olumsuz etkileyerek antibiyotik direnci oluşturur (67).

Bakterilerin çoğalma oranlarında değişiklikler

Biyofilm üreten bakterilerde çoğalma hızı serbest yaşayan formlara göre çok daha yavaştır. Antimikrobiyallerin hızlı üreyen bakterilere daha etkili olması biyofilm direncinin diğer sebebidir (68).

2.2.6. DİYABETİK AYAK ENFEKSİYONLARINDA BİYOFİLM

Diyabetik hastalarda kronik yara enfeksiyonları bozulmuş ve yetersiz immün yanıtla birlikte uzamış inflamasyon, yetersiz re-epitelizasyon ve düzensiz matriks şekillenmesiyle nedeniyle iyileşmesi zorlaşan yaralar olarak karşımıza çıkar. Kronik yaralarda biyofilm oluşumuna zemin hazırlayan pek çok faktör vardır. Kronik yara; bileşeni olan proteinleri (kollajen, fibronektin) ve hasarlı doku gibi bağlanmayı sağlayan özellikleri ile biyofilm oluşumu için ideal koşullar sağlar. Yara yüzeyindeki hasarlı doku biyofilm oluşumunun ilk basamağını adezyonu kolaylaştırır. Kronik yaralarda dokuya yerleşen bakteriler; granülasyon dokusu oluşumunu, angiogenezi, PNL ve monosit aktivasyonunu, kollajen formasyonu oluşumunu uyarır. Kontrolsüz diyabette ise hiperglisemi; nötrofillerin fagositer ve bakterisid işlevlerinde bozulmaya, oksidatif strese ve inflamatuvar sitokinlerde artışa, kemotaktik faktörlerde azalma ve opsonizasyon bozulmasına sebep olarak immün yanıtı baskılar. Bakteriler tarafından QS sinyal molekülleri aracılığıyla üretilen virülans faktörleri PNL fagositik aktivitesine karşı koruyucu rol oynar. Biyofilm yapısında fiziksel bir bariyer görevi olan EPS fagositik hücrelerin biyofilme penetrasyonunu azaltır. Nötrofiller biyofilm içindeki bakteriyi öldüremez, ancak salgıladıkları proinflamatuvar sitokinler kronik inflamasyona neden olur. Ayrıca glukozun bakteriler tarafından kullanılması EPS ekspresyonunu artırarak biyofilm oluşumunu artırır (69).

Diyabetik ayak yaralarında mikroorganizmalar % 60 - 80 oranında biyofilm üretmektedir (70). Biyofilm varlığı kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir. Olgunlaşmış biyofilm içindeki bakterilerin MİK değerleri in-vitro sonuçlarından 100 – 1000 kat daha yüksektir. Diyabetik ayak ülserleri sıklıkla polimikrobiyal etkenlerle kolonize olur. Polimikrobiyal biyofilmde virölans faktörleri QS molekülleri aracılığıyla birbirleriyle sinerjistik etki gösterir. *P.aeruginosa* ve *S.aureus* kronik yaralardaki biyofilmden en sık sorumlu bulunan patojenlerdir (71). Enfekte yaralarda biyofilmi göstermek için en güvenilir yöntem doku biyopsisidir, biyofilm yapan bakterilerin yara epiteline sıkıca yapışması ve anaeroplara derine yerleşmesi nedeniyle sürüntü çubuğu ile yüzeysel örnek alınması yetersiz bir yöntemdir. Biyofilm formasyonu canlı ve küçük, dokularda 4 - 200 µm, yabancı yüzeylerde 5 - 1200 µm boyutlarındadır. Bu nedenle klinik örneklerde biyofilm aramak zor ve zaman alıcı bir işlemdir. Biyofilm enfeksiyonunun olduğu odağı kapsamayan örnekler yanlış negatif sonuçlara sebep olur. Alınan doku örneğinin ezilmesi ve doku homojenizasyonu sağlanması biyofilm saptanma olasılığını artırır. Klinik örneklerde ışık mikroskopisi ile incelemede Gram boyamada inflamatuvar hücrelerin varlığı ve kendi ürettikleri matriksle çevrelenmiş mikrobiyal agregatlar görülmesi biyofilm varlığını düşündürür. Ancak mikroorganizma sayısı düşük olduğunda direk mikroskopik inceleme ile göstermek zorlaşmaktadır. Konfokal lazer tarama mikroskopu, elektron mikroskopisi ve PNA FISH (peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) doku örneklerinde biyofilmi göstermek için en uygun yöntemlerdir, ancak laboratuvarlarda rutin kullanıma uygun değildir (61). Bakterilerde biyofilm oluşumu tespitinde in-vivo ve in-vitro (Mikroplak yöntemleri, Calgary Biofilm Device Modified Robbins Device, Plug Flow Reactor Systems, CDC Biofilm Reactor gibi) birçok yöntem mevcuttur. Yöntemlerin herbirinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Çalışmalardan elde edilen genel kanı kullanım kolaylığı, ucuz olması, kısa sürede sonuç alabilme, birçok farklı bakteri ve tedavi rejiminin değerlendirilebilmesi nedeniyle mikroplak yönteminin tarama yöntemi olarak seçilmesinin uygun olacağını göstermiştir (61, 72, 73). Geleneksel olarak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları planktonik yani serbest büyüyen mikroorganizmaları kültürde üretmeye odaklanmıştır. Ancak biyofilm yapısı içinde bulunan bazı mikroorganizmalar canlı olmalarına rağmen kültürde üretilmeyebilir. Bu gibi durumlarda moleküler tekniklerden faydalanılmalıdır (74, 75). Rutin antibiyotik duyarlılık metotlarıyla serbest büyüyen mikroorganizmaların duyarlılık sonuçları belirlenebilir. Biyofilm üreten mikroorganizmalar antibiyotiklere daha

dirençlidir, ancak duyarlılık ve direnç sınır değerleri belirlenmemiştir. Bu nedenle biyofilm enfeksiyonlarında elde edilen serbest mikroorganizmalara ait duyarlılık sonuçları tedavi başarısını öngörmeye yeterli olmaz. Biyofilm odağı ortadan kaldırılmadığı sürece rekürrens ve tedavi başarısızlığı olabilir. Kronik yaralarda biyofilme yönelik tedaviler öncelikli olarak biyofilmi uzaklaştırmaya yönelik debridman, negatif basınçlı vakum tedavisi, kompresyon gibi yöntemler olmalıdır. Sıklıkla kullanılmasına rağmen kronik yara tedavisinde tek başına sistemik antimikrobiyal tedaviyi destekleyen bir kanıt yok (34, 76, 77). Eğer antimikrobiyal tedavi gerekliliği öngörüldüyse; iki farklı gruptan sistemik antibiyotik kullanımı, sistemik ve lokal antibiyotik birlikte kullanımı ile antibiyotik ve lokal dezenfektan kombinasyonları önerilmektedir (61). Farklı mekanizmalarla biyofilme etkinliği gösterilen antimikrobiyal ve antiseptikler rifampisin, daptomisin, azitromisin, tobramisin, oritavansin, taurolidin, N-klorotaurin gibi moleküllerdir (78). Bal, dispersin-B, laktoferrin, galyum, bizmut, iyodin gibi biyofilme yönelik tedavide kullanılabilecek biyolojik ve kimyasal ajanlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Uygun hastalar seçilerek larva tedavisi ve lökosit yamalarının antibiyofilm etkilerinden faydalanılmalıdır (61). Hiperbarik oksijen tedavisi; biyofilmlerin anaerobik ve mikroaerofilik ortamı nedeniyle azalan antibiyotik etkinliğini artırarak anti-biyofilm etkinliğe katkıda bulunur. Kronik yaralarda biyofilm enfeksiyonlarını önleme ve tedavi stratejilerini geliştirmek için biyofilm oluşumunu önlemeye yönelik aşı, biyofilm etkili ilaçlar ile antibiyotik kombinasyonları, topikal antimikrobiyal tedavi rejimleri, lökosit yamaları ve otolog plateletten zengin fibrinlerin lokal uygulamaları, bakteriyofaj tedavileri, selektif debridman özelliği olan larvaların antimikrobiyaller ve QS inhibitörleri ile kombine kullanımı üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca antimikrobiyaller ile QS inhibisyonu özelliği olan ultrason dalgaları, elektrik ve ultraviyole ışık kombinasyonlarının da kullanımı üzerine de çalışmalar ve deneyimler gerekmektedir (61).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ocak 2008 - Aralık 2015 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesine başvuran ve CTF Diyabetik Ayak Konseyi tarafından değerlendirilen hastalar arasından belirlenen kriterlere uygun görülenler çalışma grubunu oluşturmuştur.

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubu için uygun hastalar Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America- IDSA) tarafından 2012 yılında güncellenen diyabetik ayak enfeksiyonları tanı ve tedavi rehberi tanımlamalarına göre belirlendi. DAE olarak tanımlanan hastaların sınıflaması için Uluslararası Diyabetik Ayak Çalışma Grubu (International Working Group on the Diabetic Foot- IWGDF) tarafından yayınlanan uzlaşlı raporunda belirtilen PEDIS evrelemesi kullanıldı.

Yara bölgesinden alınan debridman sonrası küretaj materyali, apseden iğne aspirasyonu ile alınan örnek, enfekte deri ve derin dokunun aspirasyon biyopsisi uygun materyal olarak kabul edilmiş, yüzeysel sürüntü yöntemi ile alınan örnek sonuçları çalışmaya dahil edilmemiştir. Alınan klinik örnekler “Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı” nda çalışılmış; tiplendirme ve duyarlılık sonuçları elde edilen kökenler uygun koşullarda saklanmıştır.

Hasta bilgileri tarafımızca hasta takipleri sırasında doldurulan ‘diyabetik ayak hasta kayıt formu’ ile tamamlanmıştır. Hastalara ait demografik veriler (yaş, cinsiyet, diyabet süresi, diyabetik ayak enfeksiyon süresi), özgeçmişe yönelik bilgiler (ampütasyon ve revaskülarizasyon öyküsü, tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü, hastaneye yatış ve antibiyotik kullanma öyküsü), diyabet komplikasyonları varlığı (koroner arter hastalığı, retinopati, nefropati, nöropati), güncel enfeksiyonda evreleme (PEDIS) ve osteomyelit durumu, laboratuvar bulguları (ESH, CRP, HbA1c, lökosit değeri), üreyen mikroorganizmalar, duyarlılık ve biyofilm oluşturma sonuçları, tedavi yanıt bilgileri ve ampütasyon oranları Microsoft Excel veri sistemine kaydedilmiştir.

3.2. MİKROBİYOLOJİK DEĞERLENDİRME

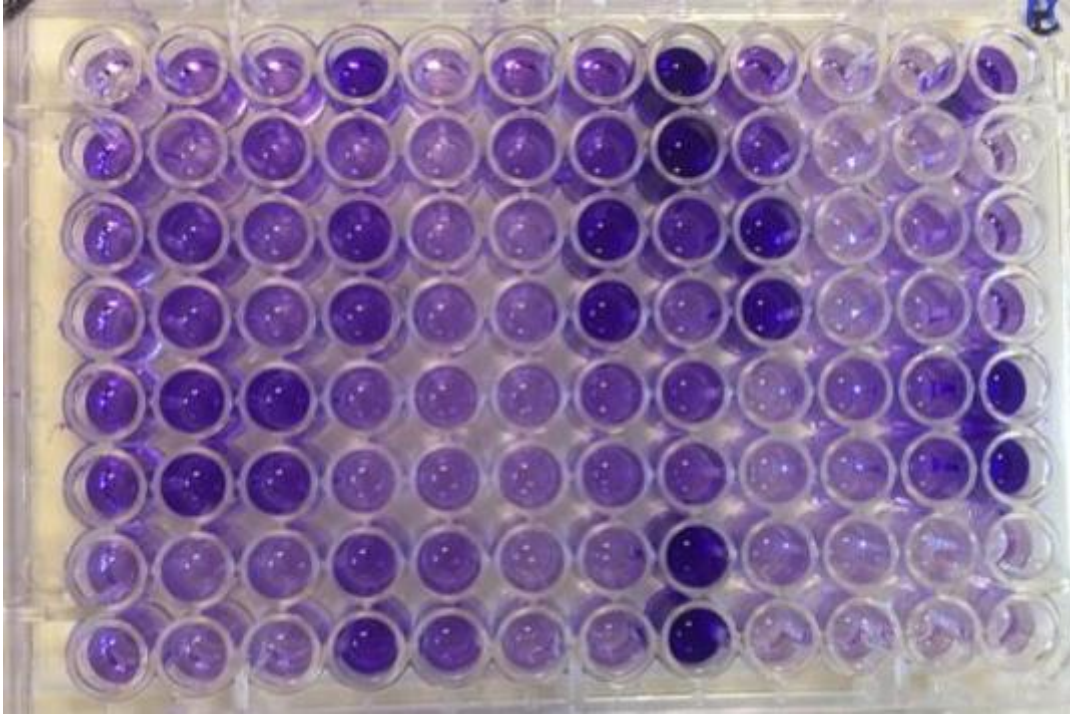
Çalışmamıza dahil edilen hastalardan Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş olan doku örneklerinden izole edilip

konvansiyonel biyokimyasal testlerle tanımlanmış olan bakterilerde antimikrobiyal duyarlılık sonuçları CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) standartlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Duyarlılık sonuçlarına göre etkenlerde MDR (multi drug resistant-çoklu ilaç direnci), XDR (extensively drug resistant-yaygın ilaç direnci), GSBL (genişlemiş spektrumlu beta laktamaz), MRSA (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*), MRKNS (metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok), VRE (vankomisine dirençli enterokok) direnç paternleri tanımlandı. MDR olan mikroorganizmalar “üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana dirençli olan bakteriler”olarak tanımlandı. XDR ise “tüm antibiyotik kategorilerinden en fazla 2 antimikrobiyal kategorideki antibiyotiklere direnç geliştirmemiş olup, ancak diğer kategorilerde en az bir ajana dirençli olan bakteriler”olarak tanımlandı (79).

3.3. BİYOFİLM TESPİTİ İÇİN MODİFİYE MİKROPLAK YÖNTEMİ

Bakteriler çalışma yapılacağı süreye kadar -80 derecede % 10 gliserinli triptik soy broth içerisinde saklandı. Tüm izolatların % 5 kanlı agarda taze pasajları elde edildi ve bir öze dolusu bakteri kolonisi alınarak % 0,25 glukoz içeren Triptik Soy Buyyon (bioMérieux, France)içeren tüplere inoküle edildi ve 37°C’de bir gece inkübe edildi. Bakteri süspansiyonu, TSB ile 1/20 dilüe edilerek 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalakların her kuyucuğuna 200 mikrolitre dağıtıldı. Plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı besiyerleri dökülüp, her kuyucuk distile su ile 3 kez yıkandı ve plakaya yapışmayan bakterileri ayırmak için çalkalanıp ters çevrilerek kurutma kâğıdında kurutuldu. Daha sonra her kuyucuğa 200 mikrolitre % 99 konsantrasyonda metanol konularak 15 dakika beklenip fikse edildi. Sonra plak boşaltılıp tekrar kurutuldu. Daha sonra Gram boyama için her kuyucuğa 200 mikrolitre %2’lik kristal viyole solüsyonundan eklenip 5 dakika bekledikten sonra yıkanıp kurutuldu. Plaklar kuruduktan sonra yüzeye yapışan hücrelere bağlanan boya % 33’lük 160 mikrolitre glasiyal asetik asit ile çözündürüldü ve 570 nm dalga boyunda plakların optik dansiteleri (OD) ölçüldü. Negatif kontrol olarak ilk iki kuyucuğa yalnızca buyyon koyuldu. Pozitif kontrol suşu *E. coli* ATCC 27022 kullanıldı. Tüm izolatlar iki farklı kuyucukta çalışılarak okutuldu. Negatif kontrol kuyucuklarının OD ortalamalarına göre zayıf orta ve güçlü biyofilm oluşumu değerlendirildi. Negatif kontrol OD değerinden

düşük olanlar bağlanma olmayan grup, kontrol suşun 2 katı OD değerine kadar zayıf bağlanma, 2-4 katı arası orta düzey bağlanma, 4 katının üzeri ise güçlü bağlanma olarak sınıflandırıldı. Tüm testler 2 kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı. Ortanca OD değerine göre etkenler biyofilm pozitif ve negatif olarak değerlendirildi (73, 80). Biyofilm üretiminin mikropalak yöntemi ile gösterilmesi şekil 1’de görülmektedir.



Şekil 1. Biyofilm üretiminin Modifiye Mikropalak Yöntemi ile gösterilmesi

3.4. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler bilgisayar ortamında SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 21,0 paket programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenlere ilişkin veriler ortalama±standart sapma; kategorik veriler ise oran ya da yüzde olarak ifade edildi. Sayısal değişkenlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis, Mann-Whitney U testi ve "independent samples t test" kullanıldı. Kategorik değişkenlerin analizinde ise Ki-kare (χ^2) testleri kullanıldı. Bağımsız parametreleri saptamak amacıyla çoklu doğrusal regresyon analizi yapıldı. Risk, göreceli olasılıklar oranı (odds ratio) olarak gösterildi. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p \leq 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 2008 - 2015 tarihleri arasında diyabetik ayak enfeksiyonu nedeniyle takip edilen 41 (% 24)'i kadın 165 hasta alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması $61,13 \pm 8.84$ olarak bulunmuştur. Bu hastalardan izole edilen toplam 339 etken biyofilm oluşturmaları açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamızda hastaların demografik verileri, klinik ve laboratuvar bulguları, doku kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların direnç oranları ile biyofilm oluşumu arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Hastalara ait demografik veriler tablo 5'te, klinik ve laboratuvar bulguları tablo 6'da gösterilmiştir.



Tablo 5. Hastalara ait demografik veriler	
Demografik özellikler	n (%)
Yaş	61 ± 9 (37-84)
Kadın	41 (24,8)
Erkek	124 (75,2)
Son 3 ayda hastane yatış öyküsü	86 (52,1)
Son 3 ayda antibiyotik kullanım öyküsü	94 (57)
Son 6 ayda aynı ayakta tekrarlayan enfeksiyon öyküsü	91 (55,2)
Geçmişte amputasyon öyküsü	58 (35,2)
Geçmişte revaskülarizasyon	36 (21,8)
İnsülin kullanımı	122 (73,9)
Böbrek yetmezliği	83 (50,6)
Diyaliz	17 (10,3)
Hipertansiyon	85 (51,5)
Koroner arter hastalığı	66 (40)
Retinopati	112 (67,9)
Nöropati	150 (90,9)
Periferik arter hastalığı	113 (68,9)

Tablo 6. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri		
Klinik veriler	Aralık	Ortalama ± SS
Diyabet süresi (yıl)	1-40	15,1±8,31
Diyabetik ayak enfeksiyon süresi (gün)	7-180	45,41±39,87
İnsülin kullanım süresi (yıl)	1-30	7,66±5,008
Yara genişliği (cm)	1-20	5,02±3,50
Yara derinliği (PEDIS derece)	1-3	2,09±0,704
Kategorik klinik veriler	n (%)	
Hastanede yatış	133 (80,6)	
Osteomyelit	102 (61,8)	
Ampütasyon	92 (55,8)	
Majör amputasyon	33 (35,5)	
Tekrarlayan ayak enfeksiyonu	36 (21,8)	
Üç ay içinde tekrar hastaneye yatış öyküsü	27 (16,8)	
Ölüm	21 (12,7)	
Laboratuvar verileri	Aralık	Ortalama ± SS
Lökosit düzeyi (/mm ³)	4000-35000	11.391,2±4548,4
CRP düzeyi (mg/l)	1-370	106,4±88,7
ESH (mm/sa)	9-159	84,07±28,82
HbA1c (%)	5,3-14,9	8,59±2,04

4.1. BİYOFİLM OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ FAKTÖRLER

Hastalara ilişkin bulgular ve sonuç ölçütleri göz önüne alındığında ekstremitte amputasyon öyküsü, son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü ve son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü, üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Hastalara ait klinik ve laboratuvar bulguları ile biyofilm ilişkisi ayrı ayrı değerlendirilmiş, anlamlı ilişki bulunmamıştır. Çalışmamıza alınan hastaların; demografik, klinik, laboratuvar verileri ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki tablo 7 ve tablo 8’de yer almıştır.



Tablo 7. Hastalara ilişkin demografik veriler, risk faktörleri, komorbiditeler ve sonuç ölçütleri ile biyofilm ilişkisi			
	Biyofilm		
Demografik veriler	Pozitif (n, %)	Negatif (n, %)	p
Yaş (ortalama)	62,7	60,0	0,81
Diyabet süresi (ortalama yıl)	16,0	14,4	0,79
Risk faktörleri			
İnsülin kullanım süresi (ortalama yıl)	8,3	7,26	0,56
Diyabetik ayak enfeksiyon süresi (gün)	48,2±42,3	43,1±39,5	0,270
Son 3 ayda hastanede yatış	66 (34)	123 (66)	0,729
Son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü	77 (39)	119 (61)	0,01
Son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu varlığı	70 (38)	110 (62)	0,05
Ekstremitte amputasyon öyküsü	50 (42)	67 (58)	0,01
Geçmişte revaskülarizasyon	30 (33)	59 (67)	1,00
Komorbiditeler			
Hipertansiyon	58 (34)	111 (66)	0,90
Böbrek yetmezliği	65 (37)	109 (63)	0,208
Koroner arter hastalığı	50 (37)	84 (63)	0,294
Retinopati	80 (33)	158 (67)	0,803
Nöropati	106 (34)	202 (66)	0,542
Sonuç ölçütleri			
Üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış	16 (57)	12 (43)	0,03
Ölüm	8 (38)	13 (62)	1,00

Tablo 8. Klinik ve laboratuvar bulguları ile biyofilm ilişkisi			
	Biyofilm pozitif	Biyofilm negatif	p
Yara genişliği (cm)	5±3,6	5,1±3,5	0,701
Osteomyelit	71 (32)	148 (68)	0,472
Ampütasyon	77 (35)	139 (65)	0,405
Major ampütasyon	27 (34)	52 (66)	0,770
Polimikrobiyal enfeksiyon	78 (33)	152 (67)	1,00
Antibiyotik kullanım süresi (gün)	40,3±24,1	40,7±28,1	0,879
Lökosit düzeyi (/mm ³)	11010±3918	11682±4445	0,173
CRP düzeyi (mg/l)	97,9±75,7	108,9±85,1	0,244
ESH (mm/sa)	88,3±28,5	88,6±29	0,929
HbA1c (%)	8,5±2,2	8,7±2,2	0,349

Hastalarda PEDIS sınıflaması içinde yer alan evrelemelerde PEDIS enfeksiyon dereceleri, PAH evreleri, yara derinliği dereceleri ve nöropati dereceleri ile biyofilm oluşumu ilişkisi kendi içlerinde ayrı ayrı değerlendirildiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. PEDIS enfeksiyon derecesine göre biyofilm oluşturma oranları ise tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. PEDIS enfeksiyonevrelmesi ve biyofilm ilişkisi		
PEDIS enfeksiyon evresi	n, %	Biyofilm pozitif
Evre 2 (hafif enfeksiyon)	71 (43,3)	50 (35)
Evre 3 (orta dereceli enfeksiyon)	52 (31,7)	35 (33)
Evre 4 (şiddetli enfeksiyon= SIRS)	41 (24,4)	29 (33)

4.2. ELDE EDİLEN ETKENLER VE BİYOFİLM POZİTİFLİĞİ ORANLARI

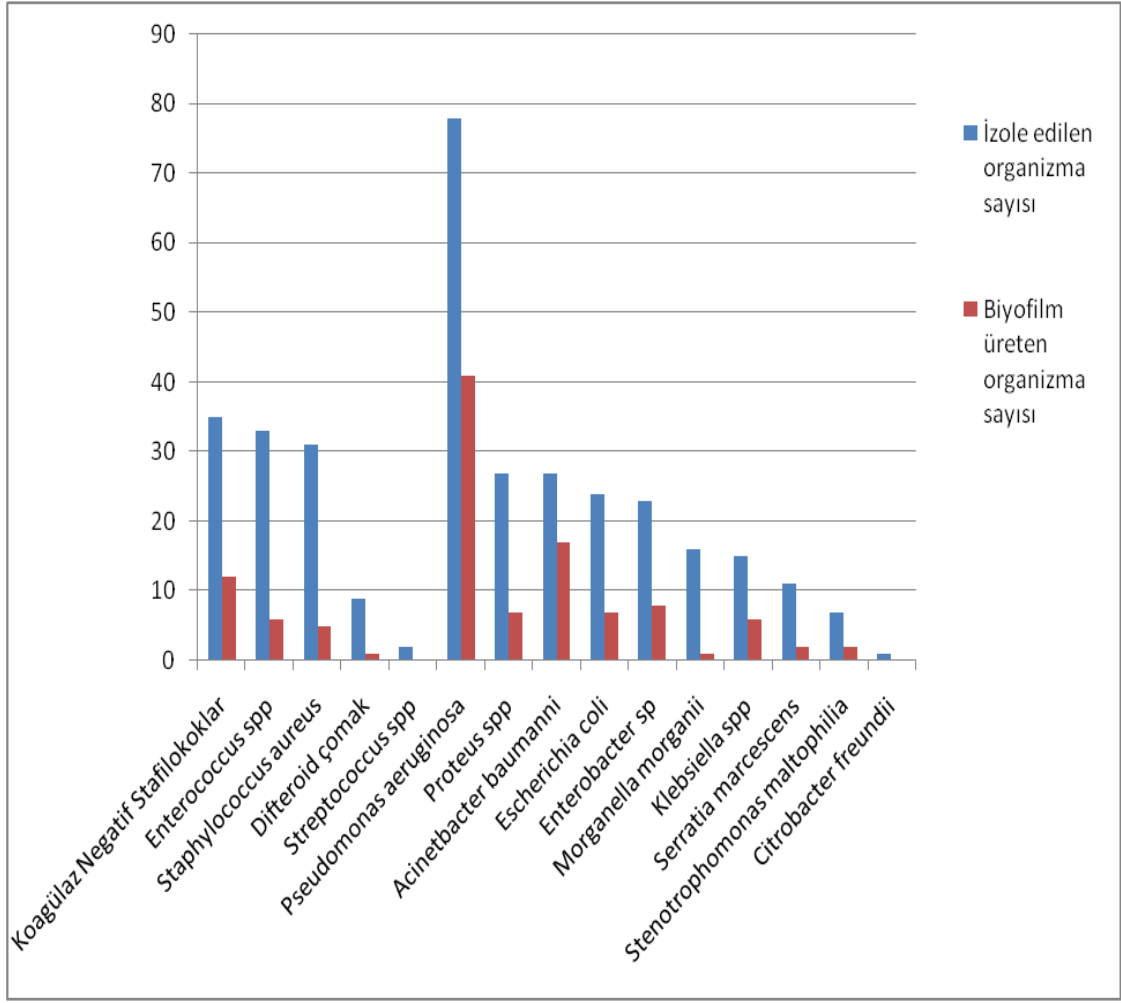
Çalışmamızda elde edilen etkenlerin 110’u (% 32,5) gram pozitif, 229’u (% 67,5) gram negatif bakteridir. En sık izole edilen mikroorganizmalar sırasıyla *P. aeruginosa* (% 23), KNS (% 10,3) ve enterokoklar (% 9,7) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda izole edilen etkenlerin 109’unun (% 32) monomikrobiyal, 230’unun (% 68) ise polimikrobiyal

enfeksiyona neden olduğu görüldü. Polimikrobiyal ve monomikrobiyal enfeksiyonlar arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p = 0,44$).

Toplam 339 mikroorganizmadan 115' inde (% 34) biyofilm oluşumu pozitif, 224' ünde (% 66) negatif saptanmıştır. 110 gram pozitif bakterinin 24 (% 21)' ü, 229 gram negatif bakterinin 91 (% 39)'i biyofilm oluşturmuştur. Gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumu gram pozitiflere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p = 0,01$). Biyofilm oluşturma oranı en fazla olan bakteriler sırasıyla *A. baumannii* (% 62), *P. aeruginosa* (% 52), *Klebsiella* spp. (% 40) ve KNS (% 43) olarak görülmüştür. Tüm etkenlerde biyofilm oluşturma oranları tablo 10 ve şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo 10. Mikroorganizmaların dağılımı ve biyofilm oranları

	Sayı (Oran)	Biyofilm	
		Pozitif [n (%)]	Negatif [n (%)]
TOPLAM MİKROORGANİZMA	339	115 (33,9)	224 (66,1)
Gram pozitif	110 (32,5)	24 (21)	86 (79)
Koagülaz negatif stafilokoklar	35 (10,3)	12 (34)	23 (66)
<i>Enterococcus</i> spp.	33 (9,7)	6 (18)	27 (82)
<i>Staphylococcus aureus</i>	31 (9,1)	5 (16)	26 (84)
Difteroid çomak	9 (2,6)	1 (11)	8 (89)
<i>Streptococcus</i> spp.	2 (0,5)	0	2 (100)
Gram negatif	229 (67,5)	91 (39)	138 (61)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78 (23)	41 (52)	37 (48)
<i>Proteus</i> spp.	27 (7,9)	7 (25)	20 (75)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	27 (7,9)	17 (62)	10 (38)
<i>Escherichia coli</i>	24 (7)	7 (29)	17 (71)
<i>Enterobacter</i> spp.	23 (6,7)	8 (34)	15 (66)
<i>Morganella morganii</i>	16 (4,7)	1 (6)	15 (94)
<i>Klebsiella</i> spp.	15 (4,4)	6 (40)	9 (60)
<i>Serratia marcescens</i>	11 (3,2)	2 (18)	9 (82)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	7 (2)	2 (28)	5 (72)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (0,2)	0	1 (100)



Şekil 2. Elde edilen etkenler ve biyofilm oluşturma oranları

4.3. BİYOFİLM OLUŞUMU İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çalışmada analiz edilen tüm mikroorganizmalardaki toplam biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki değerlendirildiğinde biyofilm oluşumu ile yaygın antibiyotik direnci (XDR) ($p < 0,001$) ve çoklu antibiyotik direnci (MDR) ($p < 0,001$) gelişimi arasında pozitif yönde korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. Biyofilm oluşumu ile MDR ve XDR gelişimi arasındaki ilişki			
	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=115)	84 (73)	31 (27)	< 0,001
Biyofilm negatif (n=224)	58 (26)	166 (74)	
	XDR var (n,%)	XDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=115)	37 (32)	78 (68)	< 0,001
Biyofilm negatif (n=224)	9 (4)	215(96)	

Alt grup analizinde etkene göre biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki değerlendirildiğinde *A. baumannii*’de MDR kökenler ile biyofilm oluşumu arasında ilişki saptanmamış, *P. aeruginosa*’da ise anlamlı ilişki saptanmıştır ($p < 0,001$) (Tablo 12).

Tablo 12. Non-fermentatif bakterilerde biyofilm oluşumu ile MDR ilişkisi			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=78)	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=41)	31 (76)	10 (24)	<0,001
Biyofilm negatif (n=37)	14 (38)	23 (62)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=27)	MDR var (n,%)	MDR yok (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=17)	16 (94)	1 (6)	0,69
Biyofilm negatif (n=10)	9 (90)	1(10)	

Mikroorganizmaların direnç durumu ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki Tablo 13’ de sunulmuştur. *Enterobacteriaceae* spp. grup olarak irdelendiğinde GSBL oluşturan etkenlerde oluşturmayanlara göre anlamlı olarak yüksek biyofilm pozitifliği tespit edilmiştir. Enterokoklarda vankomisin direnci ile biyofilm oluşumu arasında da pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($p = 0,02$). Stafilokoklar değerlendirildiğinde; biyofilm oluşumu ile metisilin direnci arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (MRSA için $p = 0,93$, MRKNS için $p = 0,43$).

Tablo 13. Biyofilm oluşumu ile dirençli diğer etkenler arasındaki ilişki			
<i>S. aureus</i>	MRSA (n,%)	MSSA (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=5)	3 (60)	2 (40)	0,93
Biyofilm negatif (n=26)	5 (19)	21 (81)	
Enterokoklar	VRE pozitif (n,%)	VRE negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=6)	4 (67)	2 (33)	0,02
Biyofilm negatif (n=27)	4 (15)	23 (85)	
KNS	MRKNS (n,%)	MSKNS (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=12)	10 (83)	2 (17)	0,43
Biyofilm negatif (n=23)	15 (65)	8 (35)	
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=31)	17 (55)	14 (45)	<0.001
Biyofilm negatif (n=85)	15 (18)	70 (82)	

GSBL yapan suşların her biri ayrı ayrı değerlendirildiğinde *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında biyofilm pozitiflik oranları yapmayanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (*E. coli* için p = 0,02, *Klebsiella* spp. için p = 0,01) (Tablo 14).

Tablo 14. GSBL yapan <i>Enterobacteriaceae</i> spp. ve biyofilm ilişkisi			
<i>Klebsiella</i> spp.	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=6)	5 (83)	1 (17)	0,01
Biyofilm negatif (n=9)	1 (11)	8 (89)	
<i>Escherichia coli</i>	GSBL pozitif (n,%)	GSBL negatif (n,%)	p
Biyofilm pozitif (n=7)	6 (86)	1 (14)	0,01
Biyofilm negatif (n=17)	5 (29)	12 (71)	

4.4. Çoklu doğrusal regresyon analizi (Multivariate analiz)

Çok değişkenli aşamalı doğrusal regresyon analizi ile biyofilm oluşumunu bağımsız olarak öngördüren faktörler analiz edilmiştir. Değerlendirmeye son üç ayda antibiyotik kullanımı, son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu ve geçmişte ekstremitte amputasyon öyküsü, taburculuk sonrası 3 ay içinde aynı ayakta tekrarlayan enfeksiyon nedeniyle hastaneye yatış, MDR ve XDR oluşumu dahil edilmiştir. Sonuç olarak bu faktörlerden MDR ve XDR' nin biyofilm gelişimini bağımsız olarak öngördürdüğü görülmüştür (Tablo 15).

Tablo 15. Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler						
	Univariate analiz			Multivariate analiz		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Ekstremitte amputasyon öyküsü	2,20	1,14-4,24	0,01	1,00	0,43-2,3	0,98
Son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü	2,94	1,5-5,75	0,002	0,37	0,09-1,3	0,14
Son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu varlığı	2,35	1,23-4,53	0,01	0,94	0,25-3,5	0,93
Üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış	2,44	1,06-5,58	0,03	0,47	0,18-1,2	0,12
MDR	0,16	0,08-0,32	0,001	3,63	1,58-8,33	0,002
XDR	0,11	0,03-0,31	0,001	4,06	1,25-13,1	0,01

5. TARTIŞMA

Diyabetik hastalarda bozulmuş ve yetersiz immün yanıtla birlikte uzamış inflamasyon, yetersiz reepitelizasyon ve düzensiz matriks şekillenmesi nedeniyle iyileşmesi zor ola kronik yaralar gözlenir. Biyofilm varlığı kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir. Kronik yaralarda biyofilm oluşumuna zemin hazırlayan pek çok faktör vardır. Biyofilm mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve gen transkripsiyonuna bağlı farklı fenotip gösterebilen mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş bir matrikstir (37). Biyofilm yapısı içinde bulunan bazı mikroorganizmalar canlı olmalarına rağmen kültürde üretilmeyebilir. Rutin antibiyotik duyarlılık yöntemleriyle serbest büyüyen mikroorganizmaların duyarlılık sonuçları belirlenebilir. Oysaki biyofilm üreten mikroorganizmalar antibiyotiklere daha dirençlidir. Biyofilm oluşturan bakterilerde serbest formlara oranla antibiyotiklere 100 - 1000 kat oranında direnç gelişebilmektedir.

Bu çalışmada, diyabetik ayak enfeksiyonu nedeniyle takip edilen hastalardan izole edilen etkenlerin biyofilm oluşturma oranları, biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci ilişkisi ve biyofilm oluşumu ile hastaya ait faktörlerin prognostik ilişkisi araştırılmıştır.

Hastanemizin üçüncü basamakta yer alması nedeniyle diyabetik ayak enfeksiyonu ile gelen hastaların büyük bir kısmı persiste eden ve iyileşmeyen kronik yaralar ile tarafımıza başvurmaktadır. Hastalarda hayat ve uzuv kurtarmaya yönelik tedavi düzenlerken yaraların kronik vasıfta olması nedeniyle biyofilm oluşumu her zaman aklıda tutulmalıdır. Biyofilm yapısı içinde bulunan bakteriler; virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçılabilmeleri, antibiyotiklere, dezenfektanlara, oksijen radikallerine, besin yoksunluğuna, pH değişikliklerine ve fagositoza karşı daha dirençli olmaları nedeniyle enfeksiyon tedavisini oldukça zorlaştırmakta ve hasta yönetimini güçleştirmektedir (37, 45).

Hastalara ait demografik faktörler, risk faktörleri, komorbiditeler ile biyofilm ilişkisini araştırdığımızda; son 3 ayda antibiyotik kullanım öyküsü, son 6 ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü, geçmişte amputasyon varlığı ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı düzeyde ilişki bulunmuştur. Bu sonuçlara göre başlangıçta hasta özelliklerinin sorgulanması biyofilm oluşumu açısından bir öngörü sağlayacaktır. Sonuç ölçütleri

değerlendirildiğinde biyofilm oluşumu ile taburculuk sonrası 3 ay içinde aynı ayakta tekrarlayan enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış arasında da korelasyon bulunmuştur.

Mikroorganizmalarda direnç ile biyofilm ilişkisi değerlendirildiğinde çoklu ilaç direnci ve yaygın ilaç direnci gösteren mikroorganizmalar ile biyofilm arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.

Antibiyotiklerin akılcı olmayan yaygın kullanımı dünya genelinde çok önemli bir problemdir. Bazı antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarda, MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerinin altında kalan dozlarının biyofilm oluşumunu arttırdığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir (81). Çalışmamızda son üç ayda antibiyotik kullanım öyküsü ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki anlamlıdır. Antibiyotik tedavilerinin başlangıç ve bitiş dozlarında, dozlar arasında uzayan dönemlerde bazen de devam eden düşük doz tedavilerde bakteriler MİK değerinin altında düzeylerde antibiyotiklere maruz kalabilmektedir (82). Ayrıca büyümeyi desteklemek için antibiyotiklerin tarımda yaygın olarak kullanımı da düşük doz maruziyete sebep olmaktadır (83).

Biyofilme ilişkin çalışmalar sıklıkla *P. aeruginosa*, stafilokoklar ve *E. coli* gibi biyofilm oluşumunun en fazla görüldüğü mikroorganizmalarda yapılmıştır. Antibiyotik ilişkili biyofilm oluşumu tek bir mekanizma ile ilişkili olmayıp farklı gen ekspresyonları sonucu oluşmaktadır ve birçok bakteride hücresel strese global yanıtın önemli bir rol oynadığı görülmektedir (82). Tüm antibiyotiklerin bu etkiyi göstermediği; aynı grupta yer alan antibiyotiklerin dahi bir kısmının biyofilm oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (84).

Çalışmamızda son altı ay içinde tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü olan hastalarda biyofilm oluşumu ile sınırda anlamlı ($p = 0,05$), taburculuk sonrası üç ay içinde aynı ayakta tekrar enfeksiyon gelişimi nedeniyle hastaneye yatış arasında ise anlamlı ($p = 0,03$) ilişki bulunmuştur. Bu konuda öncelikle kronik yara enfeksiyonlarında biyofilm tespiti ve biyofilme yönelik tedavilerde eksiklik irdelenmelidir. Akut enfeksiyonlarda biyofilm oluşumu % 6 oranında görülmekte ve büyük oranda bakterilerin serbest formlarıyla meydana gelmektedir. Bu nedenle hızlı ve doğru tanımlarla genellikle başarılı tedavilerle sonuçlanmaktadır. Ancak bakteriler biyofilm oluşturduğunda tedavi başarısızlığı artmakta ve süreç kronikleşmektedir. Kronik enfeksiyonlarda biyofilm oluşum oranı % 60'a kadar yükselmekte ve bu da karşımıza yetersiz tedavi edilen veya uygun antibiyotik tedavisine rağmen tekrarlayan ve persiste eden kronik yaralar olarak

çıkmaktadır. Biyofilme bağlı tedavi başarısızlığına sebep olan pek çok mekanizma olmakla beraber en önemlileri antibiyotiklere azalmış duyarlılık ve konak immün yanıtından ustalıkla kaçıştır (85). Tedavi başarısızlığı ve tekrarlayan enfeksiyonların önemli bir nedeni laboratuvarlarda rutin kültürlerde biyofilm oluşumu içindeki bakterilerin saptanamamasıdır (86, 87). Standart kültürlerde serbest bakteriler üretilmekte ve elde edilen duyarlılık sonuçları da serbest bakteri formlarına ait olup biyofilm oluşturan bakterilerin duyarlılığını yansıtmamaktadır. Bakterilerin biyofilm yapısı içinden serbestleşmesini sağlayarak kültürde üretilabilir hale getirmek bu sorunu büyük oranda çözmektedir. Yara yatağından alınan doku örneklerinde bakterilerin heterojen dağılımı nedeniyle yeterli homojenizasyon yapılamazsa etkeni üretmek de mümkün olmayacaktır (85). Ezme, karıştırma, kazıma, vorteksleme gibi mekanik olarak homojenizasyonu sağlamak için farklı yöntemler uygulanabilir. Yapılan çalışmalarda farklı enfeksiyonlarda biyofilm tespiti için örnekleri sonikasyona maruz bırakmanın vorteksleme ve mekanik kazıma işlemlerine göre çok daha etkili olduğuna işaret edilmiştir (88, 89). Bu yöntemlerle biyofilm oluşturan bakterilerin elde edilmesi ve duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi ile uygun antimikrobiyal tedavi uygulanması başarıyı arttırarak, tekrarlayan ve kronikleşen yara enfeksiyonlarının önlenmesine katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda da tekrarlayan ayak enfeksiyon gelişimi ile biyofilm oluşumu arasındaki anlamlı ilişki biyofilm içindeki bakterilerin tespitinin yeterli yapılamaması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Kronik enfeksiyonu olan hastalara uygulanan antimikrobiyal tedavide hedefe yönelik olsa dahi biyofilm oluşumu nedeniyle akut enfeksiyon tedavisinde olduğu gibi tekli ilaç rejimleriyle kısa süreli ve düşük doz tedavilerden kaçınılması önerilmektedir (71, 90). Bu şekilde tekli kısa süreli ve düşük doz rejimlerin uygulanması da hastalarda tedavi başarısızlığı, direnç ve tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olabilmektedir.

Hasta yönetiminde antimikrobiyal tedavi dışında biyofilme yönelik en etkin tedavi mekanik olarak uzaklaştırmadır. Debridman, negatif basınçlı vakum tedavisi, kompresyon tedavisi gibi yöntemler biyofilm oluşumu düşünülen diyabetik ayak enfeksiyonu tedavisinde kullanılmalıdır. Ancak klinik pratikte yaygın kullanım alanına ulaşabilmesi için çalışmalara ihtiyaç olan doğrudan biyofilme etkili tedaviler de mevcuttur. Bunlar; doğrudan biyofilme etki eden ilaçlar, matriks çözücü enzimler, QS inhibitörleri, virülans faktör antikorumları, lökosit yamaları ve otolog trombosit zengin fibrinlerin lokal uygulamaları ile yine QS inhibisyonu özelliği olan ultrason dalgaları,

elektrik ve ultraviyole ışık kombinasyonları olarak sunulmuştur. Bu yöntemlerinin-vivo kullanımı ile ilgili çalışmalar yaparak, deneyimleri arttırmak yolu ile tedavi başarısızlığı ve tekrarlayan enfeksiyon oranları en aza indirilebilir. Seçilmiş hastalarda hiperbarik oksijen tedavisinin; biyofilmlerin anaerobik ve mikroaerofilik ortamı nedeniyle azalan antibiyotik etkinliğini arttırarak tedaviye katkı sağladığı gösterilmiştir. (61, 91 - 95).

Orta ve şiddetli DAE etkenleri sıklıkla polimikrobiyaldir. Bizim sonuçlarımızda da literatürdeki birçok çalışma ile uyumlu olacak şekilde polimikrobiyal etyoloji oranı yüksek (% 68) bulunmuştur. Malik ve ark.'nın çalışmasında DAE' da polimikrobiyal etiyoloji % 68,5 bulunmuştur (96). Gadepalli ve ark.'nın çalışmasında çoğu hastadan (% 57,5) polimikrobiyal etken izole edilmiştir (97). Birçok çalışmada ise polimikrobiyal toplulukların sinerji oluşturarak daha fazla biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir (98). Ancak çalışmamızda literatürden farklı olarak polimikrobiyal ve monomikrobiyal enfeksiyonlara neden olan kökenler arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 1,00$). Yine polimikrobiyal biyofilmlerle ilgili yapılan bir çalışmada biyofilm oluşumunun bazı etkenler ve bazı polimikrobiyal topluluklarda zamana bağımlı olarak arttığı; 24 saat ve 72 saatte bakılan biyofilm oluşumları arasında anlamlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir (98). Çalışmamızda sadece 24 saat sonucunda oluşan biyofilm sonuçları değerlendirildiği için polimikrobiyal ile monomikrobiyal topluluklar arasında fark anlamlı bulunamamış olabilir.

Çalışmamızda 165 hastadan 339 etken izole edilmiş olup üreyen mikroorganizmaların % 67,5'i gram negatif basil, % 32,5'i gram pozitif koktur. Gram pozitif etkenlerden en sık izole edilenler koagülaz negatif stafilokoklar (% 10,3), enterokoklar (% 9,7) ve *S. aureus* (% 9,1); gram negatif etkenlerden ise en sık *P. aeruginosa* (% 23), *Proteus* spp. (% 7,9), *A. baumannii* (% 7,9), *E. coli* (% 7) ve *Enterobacter* spp. (% 6,7) tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımızda gram negatif bakterilerin ön planda olması, hastaların büyük bölümünde daha önceden hastane yatışı ve antibiyotik kullanma öyküsünün olması ile ülserlerin kronik olmasına bağlanmıştır. Çalışma sonuçlarımız ülkemizde bu konuda daha önce yapılan diğer çalışmalara uyumlu olup *P. aeruginosa* en sık etken olarak izole edilmiştir. Bu çalışmalardan Saltoğlu ve ark.'nın yapmış olduğu 62 hastayı içeren araştırmada *P. aeruginosa* % 29 oranla en sık izole edilen etken olmuştur (11). Yine Ertuğrul ve ark.'nın yapmış olduğu 96 hastayı içeren diğer bir çalışmada da *P. aeruginosa* % 18'lik oranla en sık izole edilen etken

olarak saptanmıştır (21). *P. aeruginosa* 'nın sıklıkla izole edilme nedeni ülkemizde olduğu gibi hastaların ayak parmak aralarının genellikle ıslak kalması ve nemli iklim şartlarıdır. Yakın zamanda Saltoğlu ve ark.'nın 455 DAE'li hastayı içeren çok merkezli çalışmalarında da izole edilen bakterilerin % 56'sı gram negatif, % 44'ü gram pozitif olarak saptanmıştır. Bu çalışmada en sık izole edilen etkenler *S. aureus* (% 23) ve *P. aeruginosa* (% 17) olarak saptanmıştır (13).

Çalışmamızda izole ettiğimiz etkenlerin ortalama % 34'ünde biyofilm geliştiği görülmüştür. Biyofilm oluşturma oranları gram pozitif suşlarımızda % 21, gram negatif suşlarımızda ise % 39 olup, biyofilm oranı gram negatif bakterilerde anlamlı oranda yüksektir ($p = 0,01$). Tüm mikroorganizmalar içinde biyofilm oluşumu en fazla non-fermentatif bakteriler olan *A. baumannii* 'de (% 62) ve *P. aeruginosa* (% 52)' da belirlenmiştir. İlgili yayınlar irdelendiğinde, DAE'de biyofilm oluşumu ile ilgili farklı oranların saptandığı çalışmaların olduğu dikkati çekmektedir. Malik ve ark.'nın yaptığı ve 255 mikroorganizmanın değerlendirildiği çalışmada DAE' da toplam biyofilm oluşumu oranı % 68 olarak bulunurken Banu ve ark.'nın çalışmasında ise DAE izolatlarında toplam biyofilm oluşumu oranı % 46 olarak bulunmuştur (96, 99). Swarna ve ark. (80) DAE'de total biyofilm oranını % 73 bulurken, Percival ve ark.'nın (102) yaptığı çalışmada bu oran % 77 olarak saptanmıştır. James ve ark. ise biyofilm oluşturma oranlarını kronik yaralarda % 60 akut yaralarda % 6 olarak bildirmiştir (69). Diğer çalışmalarla kıyaslandığında toplam biyofilm oluşturma oranlarının nispeten daha düşük olarak bulunması çalışmamızda izole edilen etkenlerdeki farklı dağılımdan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sunulan biyofilm çalışmalarının çoğunluğunda doğal biyofilm oluşumuna yatkın olan *S. aureus*'un temel etken olması total biyofilm oluşturma oranlarının yüksek olmasına neden olmuş olabilir. Bizim çalışmamızda ise *S. aureus* (% 9,1) oranı bu çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça azdır, bunun daha düşük biyofilm oranlarımızı açıklayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda en yüksek oranda biyofilm oluşumu *A. baumannii* 'de saptanmış olup, % 62 olarak bulunmuştur. Sanchez ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise biyofilm pozitifliği *A. baumannii* 'de bizim çalışmamızla uyumlu olacak şekilde % 55 olarak saptanmıştır (101). Diğer çalışmalarda *A. baumannii* 'de bulunan blaPER-1 ve cup gen varlığının pili formasyonu oluşturarak hücrelere tutunmayı belirgin olarak arttırdığını ve bu sayede biyofilm oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (102, 103).

Çalışmamızda yüksek oranda biyofilm oluşturan diğer etken ise *P. aeruginosa* olup % 52 oranında biyofilm oluşturmıştır. Zubair ve ark.'nın DAE hastalarında yaptığı bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma oranı (% 52) bizim sonuçlarımızla benzerdir (104). Literatürde *P. aeruginosa*'daki yüksek biyofilm oluşturma oranının en önemli nedeninin sahip olduğu PAO-1, Psl ve Pel genlerinin biyofilm yapısının ana bileşeni olan egzopolisakkarid yapısını oluşturmak için belirgin yatkınlık sağlaması olduğu düşünülmektedir (105). *P. aeruginosa* yapısında yüzeylere yapışmasında görevli tek bir flagella (tip 4 pili) bulunmaktadır. Bu yapının da biyofilm üretimi ve topluluk oluşturmaları için önemli bir rol oynadığı saptanmıştır. *P. aeruginosa* aerobik solunum metabolizması kullanmakla birlikte fakültatif anaerob bir bakteridir. Oksijen yokluğunda nitratı kullanarak anaerob solunum yapabilir. Bu da biyofilm yapısının derin kısımlarında durağan fazda uzun süre yaşayıp antimikrobiyallerin etkisinden korunmasını sağlamaktadır (106). Bununla beraber farklı bir çalışmada *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşturma oranı % 26,5 olarak çalışmamıza kıyasla daha düşük oranda bulunmuştur (99). Bunun nedeninin bu çalışmada elde edilen etkenler arasında *P. aeruginosa* oranının ve *P. aeruginosa*'da MDR oranının düşük olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda enterokoklarda biyofilm oluşturma oranı diğer etkenlere göre düşük bulunmuştur (% 18). Mottola ve ark. çalışmasında enterokokların diğer etkenlere göre çok daha zayıf biyofilm oluşumu gösterdiği belirtilmiştir (98). Bunun sebebinin enterokoklarda biyofilm oluşumunun çoklu genetik değişim oluşumu, birçok çevresel faktör ve sinyal gerekliliği gibi birçok etmenin birarada bulunmasına gereksinim duymasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (107).

Antibiyotik direnci DAE tedavisinde karşımızdaki en ön önemli sorunlardan bir tanesidir. Bizim çalışmamızda tüm etkenler MDR ve XDR gelişimi açısından değerlendirilmiştir. İzole ettiğimiz suşların % 42'si MDR, % 13,5'i XDR olduğu görülmüştür. MDR oranı en yüksek olan etkenler *P. aeruginosa* (% 57) ve *A. Baumannii* (% 92) olarak saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda DAE' da MDR saptanan mikroorganizmaların prevalansı % 18 ile % 72 arasında geniş bir dağılım göstermektedir (108). Trivedi ve ark. yaptığı bir çalışmada DAE'da etken mikroorganizmalarda MDR oranı % 63, *P. aeruginosa*'da ise % 67 olarak bulunmuştur (108). Zubair ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (109) ise DAE etkenlerinde MDR oranı % 45, *A. baumannii*'de % 75. ve *P. aeruginosa*'da % 56 olarak bulunmuştur. Gadipelli ve ark.'nın çalışmasında ise

diğer çalışmalardan farklı olarak tüm kökenlerde MDR oranı % 72 olarak bulunmuş olup oldukça yüksektir (97). Çalışmalar arasındaki MDR oran farklılığının, antibiyotik direnci gelişiminde rol oynadığı düşünülen uygunsuz antibiyotik kullanımı, yaranın kronik seyri, sık hastaneye yatış gibi faktörlerdeki değişkenliklerden kaynaklanabileceği düşünülebilir (12). Hastalarımızda çoklu antimikrobiyal direnç oranının yüksek bulunmasından; hastanemizin üçüncü basamak hastane kategorisinde olması, hasta popülasyonumuzun sıklıkla daha önceden DAE nedeniyle dış merkezlerde uzun süreli antibiyotik kullanım öyküsü olan hastalardan oluşması ve önceki akılcı olmayan antibiyotik kullanımının yüksek olması sorumlu olabilir.

MDR bakterilerin neden olduğu DAE'ler hastanede kalış süresini ve tedavi maliyetini arttırmanın yanında mortalite ve morbiditede ek artışı da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle MDR gelişiminde rol oynayan faktörlerin tespiti ve önlenmesi son derece önemlidir. MDR mekanizmasının gelişiminde bakterilerin biyofilm oluşturmalarının temel rol oynadığı düşünülmekte ve son dönemde yapılan çalışmalar ile bu ilişki ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Çalışmamızda biyofilm oluşumu ile MDR ve XDR gelişimi arasındaki ilişkiye baktığımızda MDR ve XDR gelişimi ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı ilişki görülmüştür ($p < 0,001$). MDR gösteren etkenlerde % 59, XDR gösterenlerde ise % 80 oranında biyofilm pozitifliği saptanmıştır. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (99) MDR geliştiren mikroorganizmaların % 46'sında biyofilm oluşumu görülürken, Swarna ve ark.'nın çalışmasında (80) bu oran % 80 olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda yüksek antimikrobiyal direncin nedenlerinden birisi; hücrelerinin birbiri ile çok yakın teması nedeniyle farklı antimikrobiyal direnç genlerini içeren plazmidlerin aktarımının planktonik formlarına göre daha etkin bir şekilde yapılabilmesidir (110). Biyofilm sinyal mekanizması olan QS sisteminin antimikrobiyal dirence katkısı ise özellikle biyofilm içinde olumsuz yaşam koşullarında bakterilerin büyüme hızının yavaşlatarak durağan fazda yaşamaları nedeniyle antimikrobiyallerin etkinliğinin azalmasıdır (111). Biyofilm yapısının büyük kısmını oluşturan EPS fiziksel bir bariyer olarak antibiyotik ve dezenfektanların mikroorganizma hücresine penetrasyonunu engelleyerek duyarlılığın azalmasına sebep olur (67). Bu bariyer etki nedeniyle MİK değerlerinin altında kalan antibiyotik konsantrasyonları dirençli suşların seçilmesine ve MDR gelişimine katkıda bulunmaktadır (112, 113). Ayrıca biyofilm mikroçevresinde oluşan pH ve ozmotik değişiklikler de antimikrobiyal

ilaç etkinliğini değiştirmektedir (114). Dirence sebep olan diğer bir neden de biyofilm içindeki polisakkarid bileşenlerin konak antikör ve komplemanlarını inaktive ederek, konak immün faktörlerinde birikime yol açıp immün kompleks hasarına sebep olması ve kronik inflamasyon sağlamasıdır (100).

Etken bazında yaptığımız analizde biyofilm pozitif saptanan *P. aeruginosa* suşlarında MDR gelişim oranı % 76 olup biyofilm negatiflere oranla anlamlı düzeyde yüksektir. Biyofilm pozitif olan *A. baumannii*'de MDR oranı %94 olarak bulunmuştur. Sanchez ve ark.'nın yaptığı çalışmada biyofilm pozitif olarak belirlenen *P. aeruginosa*'da ve *A. baumannii*'de MDR gelişimi sırasıyla % 77 ve % 87 olup bizim sonuçlarla benzerdir (101).

Çalışmamızda izole edilen gram negatif bakterilerde GSBL pozitifliği % 32,5 bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda DAE etkeni olan gram negatif bakterilerde GSBL pozitiflik oranları değişkenlik göstermekle birlikte bir çalışmada bu oran % 45, başka bir çalışmada ise % 6 olarak bulunmuştur (97, 115). Çalışmamızda GSBL pozitif etkenlerin oranının yüksek olması hastaların önceki tekrarlayan ayak enfeksiyonları ve uzun süreli hastane yatış hikayeleri ile uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda GSBL yapan *E. coli* (p = 0,02) ve *Klebsiella* spp. (p = 0,01) izolatlarında yapmayanlara göre anlamlı oranda biyofilm oluşumu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda üropatojen GSBL yapan *E. coli* kökenlerinde çalışmamıza benzer şekilde biyofilm oluşumu ile anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (116). GSBL yapan mikroorganizmalarda yüksek biyofilm oluşumu çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir. GSBL direnç genleri içeren plazmidlerin kazanımıyla kromozomal yeniden yapılanma olmakta; bu süreçte eş zamanlı olarak biyofilm gibi virülans faktörlerini kodlayan virülans genlerin kazanımı ve ekspresyonu da artmaktadır. Bu nedenle de biyofilm oluşumuna zemin hazırlanmaktadır (117).

Çalışmamız sonucunda *S. aureus* suşlarının % 25'i metisiline dirençli bulunmuştur. Daha önce yapılan 20 çalışmayı içeren bir derlemede; DAE'de izole edilen *S. aureus* izolatlarında metisilin direnç oranları %5-30 arası saptanmıştır (118). Lecornet ve ark.'nın 527 hasta içeren çalışmasında ise *S. aureus* suşlarının % 31'i metisiline dirençli iken (119), Saltoğlu ve arkadaşlarının 455 hastalık çalışmasında da çalışmamıza benzer olarak % 25 olarak bulunmuştur (13). Yine Dang ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu oran

% 30,2 olarak bulunmuştur (120). Hastanın daha önce MRSA ile kolonize olması, uzun süreli antibiyotik kullanımı, daha önce hastane yatış öyküsü bulunması, ülserin kronikleşmesi MRSA gelişimi için predispozan faktörlerdir (121).

Çalışmamızda daha önceki bazı çalışmalara benzer olarak, MRSA ve MSSA suşları arasında biyofilm oluşumu açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızda MRSA sayısının az olması da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamasına sebep olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca Reiter ve ark. çalışmasında, mecA genini üzerinde bulunduran SCCmec (stafilokokal kaset kromozomu mec)'yi taşıyan izolatların, biyofilm oluşturma gücü ile arasında bir ilişki saptamamışlardır (122). Yine 972 *S. aureus* izolatında yapılan bir çalışmada biyofilm oluşumu ile metisilin direnci arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı görülmüştür (123).

Biyofilm enfeksiyonları ile mücadelede biyofilm gelişimini önlemek tanı ve tedavi kadar önemlidir. Doğal bir bariyer görevi gören cilt bütünlüğünün bozulmaması için özellikle diyabetik hastalarda ayak bakımı öncelikli olmalıdır. Kistik fibröz hastalarında akciğerlerde aralıklı kolonizasyonun erken agresif tedavisinin kronik akciğer enfeksiyonları gelişimini geciktirdiği gösterilmiştir (124). Bu şekilde kronik yaralarda erken agresif tedavi ile ilgili veri yoktur ve bu konuda yapılacak çalışmalara gereksinim vardır. Yine QS ve virülans faktörleri inhibitörlerinin tedavi dışında biyofilm oluşunu önlemek için de kullanılabileceği farklı çalışmalarda öngörülmektedir (125 - 129). Tüm biyofilm enfeksiyonları değerlendirildiğinde nozokomiyal enfeksiyonlarda biyofilm oranının yaklaşık % 50 olması biyofilm oluşumunu önlemede HEKK önerileri doğrultusunda talimatların yerine getirilmesinin önemini ortaya koymaktadır (130).

Biyofilmin tespit edilmesi de tedavisi kadar önemlidir. Bu nedenle özellikle biyofilm enfeksiyonu gelişebileceği öngörülen kronik yara enfeksiyonu gibi durumlarda doku örneklerinin uygun işlenmesi ve üretilen bakterilerde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi etkin tedaviye yönlendirmesi açısından oldukça önemlidir. Biyofilm oluşumunu gösteren invaziv olmayan görüntüleme yöntemlerinin geliştirilmesi de tanıda büyük katkı sağlayacaktır.

Antimikrobiyaller dışında daha önce de bahsettiğimiz biyofilme yönelik tedavilerin geliştirilmesi, klinik pratikte daha sık kullanılması ve bu konuda çalışmalar yapılması gereklidir. Kronik yara enfeksiyonlarında gerçeği yansıtan hayvan modelleri üzerinde in-vivo biyofilm çalışmaları ve biyofilm oluşturan bakterilere yönelik aşı çalışmaları ve

bakteriyofaj tedavisi çalışmaları da arttırılmalıdır. İnsanlarda kullanımı mümkün QS inhibitörlerinin geliştirilmesi; antibiyotiklerden farklı bir mekanizmayla doğrudan üremeyi etkilemeyecekleri ve bu nedenle dirençli bakterilerin seçilmelerine neden olmayacakları beklentisini oluşturmaktadır. Yakın gelecekte, patojene özel antibiyotiklerle biyofilme etkili maddelerin bir arada yer aldığı yeni ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi ile antibiyotiklerde direnç gelişiminin azaltılması, antibiyotiklerin daha uzun ömürlü olmalarının sağlanması umut edilmektedir.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada diyabetik ayak enfeksiyonu nedeniyle takip ve tedavisi yapılan hastaların doku kültürlerinde üretilen etken mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun direnç gelişimi ile ilişkisi ve prognostik öneminin değerlendirmesi hedeflenmiştir. Amacımız biyofilm oluşumunun diyabetik ayak enfeksiyonlarının prognozuna olan etkisini belirlemek, biyofilm ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi belirleyen tanı yöntemlerinin kullanımının ve sonuçta biyofilme yönelik etkin tedavinin uygulanmasının önemine dikkat çekmektir.

Çalışmamız sonucunda, hastalara ait demografik faktörler, risk faktörleri, komorbiditeler ile biyofilm ilişkisini araştırdığımızda; son 6 ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu öyküsü, son 3 ayda antibiyotik kullanım öyküsü ve geçmişte amputasyon varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu sonuçlar başlangıçta hastalara ilişkin hikayenin dikkatlice sorgulanmasının biyofilm oluşumu açısından bir öngörü sağlayacağını göstermiştir.

Sonuç ölçütleri değerlendirildiğinde biyofilm oluşumu ile taburculuk sonrası 3 ay içinde aynı ayakta tekrarlayan enfeksiyon nedeniyle hastaneye yatış arasında da anlamlı ilişki belirlenmiş olup bu sonuç direk biyofilme yönelik etkin tedavilerin gerekliliğini öngördürmüştür.

Mikroorganizmalarda direnç ve biyofilm ilişkisi değerlendirildiğinde; çoklu ilaç direnci ve yaygın ilaç direncigösteren mikroorganizmalar ile biyofilm arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.

Çalışmamızda 165 hastadan 339 etken izole edilmiş olup üreyen mikroorganizmaların % 67,5'i gram negatif basil, % 32,5'i gram pozitif koktur. Gram pozitif bakterilerin % 21'i, gram negatif bakterilerin % 39'u biyofilm oluşturmuş, bu oran gram negatif bakterilerde anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p = 0,01$).

En yüksek oranda biyofilm oluşumu *A. baumannii*'de (% 62) saptanmıştır, bunu *P. aeruginosa* (% 52) izlemiştir. Enterokoklarda biyofilm oluşturma oranı diğer etkenlere göre düşük bulunmuştur (% 18).

Direnç ile biyofilm ilişkisinde biyofilm pozitif olan *P. aeruginosa* suşlarında MDR gelişim oranı % 76 olup biyofilm negatiflere oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda GSBL yapan *E. coli* ($p = 0,02$) ve *Klebsiella* spp. ($p = 0,01$) izolatlarında yapmayanlara göre önemli oranda biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Enterokoklarda vankomisin direnci (VRE) ile biyofilm oluşumu arasında da pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($p = 0,02$). Stafilokoklarda ise, biyofilm oluşumu ile metisilin direnci arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (MRSA için $p = 0,93$, MRKNS için $p = 0,43$).

İzole ettiğimiz suşların % 42'sinde MDR, % 13,5'inde XDR bulunmuştur. MDR oranı en yüksek olan etkenler *P. aeruginosa* (% 57) ve *A. baumannii* (% 92) olarak saptanmıştır.

Univariate analizde; ekstremitte amputasyon öyküsü, son üç ayda antibiyotik kullanımı, son altı ayda tekrarlayan ayak enfeksiyonu varlığı, üç ay içinde aynı ayakta enfeksiyon nedeniyle tekrar hastaneye yatış, MDR ve XDR bakteri ile enfekte olmanın biyofilm oluşumu için belirleyici risk faktörü olarak belirlenmiştir. Multivariate analizde; MDR ve XDR olan mikroorganizmaların biyofilm oluşumunu bağımsız olarak belirlediği gösterilmiştir.

Çalışmamız sonucunda hastalarda tekrarlayan ayak enfeksiyonları ve antibiyotik direnci (MDR, XDR) ile biyofilm arasında ilişki gösterilmiştir.

Diyabetik ayak enfeksiyonu gibi biyofilm oluşumunun öngörüldüğü kronik yaralarda biyofilm oluşumunun tespiti, tedavisi ve biyofilm oluşumunun önlenmesi hedeflenmelidir. Doğrudan biyofilme yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C, Akalın S, Salman S, Dinççağ N, et al. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu 2015; 15-228.
2. Baktın D, Çetinkaya F. The Knowledge, Attitude and Behaviours of the Diabetic Foot and Foot Care. Journal of Health Sciences 2005;14(1): 6-12.
3. Chan JCN, Yeung VTF, Chow CC, et al. Diabetes mellitus - epidemiology and pathogenesis. Hong Kong Practitioner 1996; 18(6): 270-279.
4. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2014; 1-273.
5. TURDEP-II Study Group. Diabetes epidemic in Turkey: results of the second population-based survey of diabetes and risk characteristics in Turkey (TURDEP-II). Diabetologia 2011; 54 (1): 140.
6. Hatemi H. Diyabetes Mellitus ve Endokrin Pankreas Hastalıkları, Öbek A (ed). İç Hastalıkları, İstanbul: Güneş kitabevi, 1990; 60-67.
7. Saltoğlu N, Kılıçoğlu Ö, Baktıroğlu S, Oşar-Siva Z, Aktaş Ş, Altındaş M, et al. Diyabetik Ayak Yarası ve İnfeksiyonunun Tanısı, Tedavisi ve Önlenmesi: Ulusal Uzlaş Raporu. Klimik Dergisi 2015; 28: 2-34.
8. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. Plastic and Reconstructive Surgery. 2006;17(7): 212-238.
9. Çorakçı A. Diyabetes Mellitus Komplikasyonlarının Tedavisi. Medikal Nobel 2005; 451-486.
10. Kabalak T, Yılmaz C, Tüzün M. Diyabetes Mellitus. Endokrinoloji 2004; 609-614.
11. Saltoglu N, Dalkiran A, Tetiker T, Bayram H, Tasova Y, Dalay C, et al. Piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin for severe diabetic foot infections: a prospective, randomized clinical trial in a university hospital. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1252-1257.

12. Hartemann–Heurtier A, Robert J, Jacqueminet S. Diabetic foot ulcer and multidrug resistant microorganisms: risk factors and impact. *Diabet. Med* 2004; 21: 710-5.
13. Saltoglu N, Yemisen M, Ergonul O, Kadanalı A, Karagöz G, Batirel A, et al. Predictors for limb loss among patient with diabetic foot infections: an observational retrospective multicentric study in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 659-664.
14. Lipsky BA. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004; 20(1): 68-77.
15. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 2013; 28(2): 169-80.
16. Bülbül M, Ayanoglu S, Esenyel CZ, Büyükkurt CD, İmren Y, Gürbüz H. Diyabetik ayak yaralarında damar oklüzyonunun amputasyon sınırına etkisi. *Trakya Üniv. Tıp Fak. Derg.* 2008; 25(3): 186-188.
17. Van Baal JG. Surgical Treatment of the Infected Diabetic Foot. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(2): 123-128.
18. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. Guidelines for diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 885-910.
19. Schaper NC. Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: a progress report on criteria for including patients in research studies. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004; 20(1): 90-5.
20. Ansari MA, Shukla VK. Foot Infections. *Lower Extremity Wounds*, 2005; 4(2): 74-87.
21. Ertugrul BM, Oncul O, Tulek N, Willke A, Sacar S, Tunccan OG, et al. A prospective, multi-center study: factors related to the management of diabetic foot infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(9): 2345-52.

22. Kandemir O, Akbay E, Sahin E, Milcan A, Gen R. Risk factors for infection of the diabetic foot with multi-antibiotic resistant microorganisms. *J Infect* 2007; 54(5): 439-45.
23. Özaydın Ç, Özaydın İ, Acar S, et al. Diyabetik ayak enfeksiyonlarının klinik ve aerobik bakteriyolojik analizi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2010; 40(2): 109-16.
24. Lipsky BA. Medical treatment of Diabetic foot Infections. *CID* 2004; 39: 104-14.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Staphylococcus aureus resistant to vancomycin United State. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51(26): 565-7.
26. Richard JL, Lavigne JP, Got I, Hartemann A, Malgrange D, Tsirtsikolou D, et al. Management of patients hospitalized for diabetic foot infection: results of the French OPIDIA study. *Diabetes Metab* 2011; 37(3): 208-15.
27. Hartemann-Heurtier A, Senneville E. Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab* 2008; 34(2): 87-95.
28. Armstrong DG, Wrobel J, Robbins JM. Guest Editorial: are diabetes-related wounds and amputations worse than cancer? *Int Wound J* 2007; 4(4): 286-7.
29. Ertugrul MB, Baktiroglu S, Salman S, Unal S, Aksoy M, Berberoglu K, et al. Pathogens isolated from deep soft tissue and bone in patients with diabetic foot infections. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2008; 98(4): 290-5.
30. Lindbloom BJ, James ER, McGarvey WC. Osteomyelitis of the foot and ankle: diagnosis, epidemiology, and treatment. *Foot Ankle Clin.* 2014; 19(3): 569-88.
31. Peters EJ, Lipsky BA, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, Senneville E, et al. A systematic review of the effectiveness of interventions in the management of infection in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; 28(1): 142-62.
32. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis.* <1997; 25(6): 1318-26.

33. Lipsky BA, Peters EJ, Senneville E, Berendt AR, Embil JM, Lavery LA, et al. Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(1): 163-78.
34. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(12): 132-73.
35. Ertugrul MB, Baktiroglu S, Salman S, Unal S, Aksoy M, Berberoglu K, et al. The diagnosis of osteomyelitis of the foot in diabetes: microbiological examination vs. magnetic resonance imaging and labelled leucocyte scanning. *Diabet Med*. 2006; 23(6): 649-53.
36. Lipsky BA. Diagnosing and Treating Diabetic Foot Infections. *Klimik Derg* 2009; 22(1): 2-13.
37. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (2): 167-93.
38. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-45
39. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999; 283:1837-9.
40. Barçın Öztürk Ş, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve Yabancı Cisim infeksiyonları. *Klimik Dergisi* 2008; 21(3): 79-86.
41. Jones HC, Roth IL, Saunders WM III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 1969; 99: 316-25.
42. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infection* 2003; 46: 207-14.
43. Fuqua WC. Quorum-sensing in bacteria: LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176: 269-75.
44. Lynch SA, Robertson TG. Bacterial and fungal biofilm infections. *Ann Rev Med* 2008; 59: 415-28.

45. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4): 999-1007.
46. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 585-617.
47. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413(6858): 860-4.
48. Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* 2002; 70(6): 2758-62.
49. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
50. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3235-8.
51. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186(8): 2449-56.
52. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010 Jul 2 [E-pub], doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
53. An YH, Dickson RB, Doyle RJ. Mechanism of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infection. In: An YH, Friedman RJ, ed. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. Totowa, N. J: Human Press 2000: 1-27.
54. Gün İ, Ekinçi F.Y. Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *GIDA* 2009; 34 (3):165-173.
55. Pratt L, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation *Curr. Opin. Microbiol* 1999; 2: 598-603.

56. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 50: 61-68.
57. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003; 185(5): 1485-1491.
58. Romanova IuM, Gintsburg AL. Bacterial Biofilms as a Natural form of existence of bacteria in environment and host organism. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2011; 3: 99-109.
59. 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: 236-241.
60. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 34-40.
61. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015 [E-pub Suppl 1:S1-25], doi: 10.1016/j.cmi.2014.10.024.
62. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003; 5: 1213-9.
63. Uludağ Altun H, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008; 39: 82-88.
64. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-9.
65. 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.
66. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(9): 2125-33.
67. Dunne WM, Jr. Buckmire FL. Effects of divalent cations on the synthesis of alginic acid-like exopolysaccharide from mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* 1985; 43(174-175): 193-216.

68. 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.
69. James G, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in Chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(1): 37-44.
70. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab Syndr* 2013; 7: 101-7.
71. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35(4): 322-32.
72. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 83(2): 89-105.
73. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2000; 40(2): 175-179.
74. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, Staudinger BJ, Greenberg EP, Lam J, et al. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep.* 2014 30; 6(2): 293-300.
75. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(8): 1812-7.
76. O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technology Assessment* 2000; 4(21): 1-237.
77. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(2): 143-9.
78. Lynch A, Abbanat D. New antibiotic agents and approaches to treat biofilm-associated infections *Expert Opin. Ther. Patents* 2010; 20(10): 1373-1387.

79. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG. 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: 268-281.
80. Swarna SR, Madhavan R, Gomathi S, Thamaraiselvi S. A study of Biofilm on Diabetic Foot Ulcer. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012; 3(4): 1809-14.
81. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 2011; 9: 737-751.
82. Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17(1):1-8.
83. Smith DL, Harris AD, Johnson JA, et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(9): 6434-6439.
84. Sailer FC, Meberg BM, Young KD. β -Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 226: 245-249.
85. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* 2013; 121(136): 1-51.
86. Parsa K, Schaudinn C, Gorur A, Sedghizadeh PP, Johnson T, Tse DT, et al. Demonstration of bacterial biofilms in culture-negative silicone stent and jones tube. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2010; 26: 426-30.
87. Veeh RH, Shirtliff ME, Petik JR, Flood JA, Davis CC, Seymour JL, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* biofilm on tampons and menses components. *J Infect Dis* 2003; 188: 519-30.
88. Rohacek M, Weisser M, Kobza R, Schoenenberger AW, Pfyffer GE, Frei R, et al. Bacterial colonization and infection of electrophysiological cardiac devices detected with sonication and swab culture. *Circulation* 2010; 121: 1691-7.
89. Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Bauer TW. Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467: 1360-4.

90. Jolivet-Gougeon A, Kovacs B, Le Gall-David S, Le BH, Bousarghin L, Bonnaure-Mallet M, et al. Bacterial hypermutation: clinical implications. *J Med Microbiol* 2011; 60(5): 563- 73.
91. Pedersen SS, Espersen F, Høiby N, Jensen T. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 747-55.
92. Jones AP, Wallis C. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; [E-pub], doi: 10.1002/14651858.
93. Kronborg G, Pressler T, Fomsgaard A, Koch C, Høiby N. Specific IgG2 antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipid A and lipopolysaccharide are early markers of chronic infection in patients with cystic fibrosis. *Infection* 1993; 21: 297-302.
94. Kronborg G, Fomsgaard A, Galanos C, Freudenberg MA, Hoiby N. Antibody responses to lipid A, core, and O sugars of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in chronically infected cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1848-55.
95. Doring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiotz PO, Høiby N, et al. Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 597-605.
96. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J. The diabetic foot infections: Biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical researchs and reviews* 2013; 7: 101-7.
97. Gadepalli R, Dhawan B, Sreenivas V, Kapil A, Ammini AC, Chaudhry R. A clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care* 2006; 29(8): 1727-32.
98. Mottola C, Mendes JJ, Cristino JM, Cavaco-Silva P4, Tavares L, Oliveira M. Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiol.* 2016; 61(1): 35-43.

99. Banu A, Hassan M, Rajkumar J, Srinivasa S. Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. *Australas Med J.* 2015; 8(9): 280-285.
100. Percival L, Bowler P. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds.* 2004; 16: 234-40.
101. Sanchez C, Mende K, Beckius M, Akers K, Romano D, Wenke J, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13: 2-12.
102. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 333-37.
103. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Nactis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol* 2003; 149: 3473-84
104. Zubair M, Malik A, Ahmad J, Rizvi M, Farooqui KJ, Rizvi MW, et al. A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *Biol Med.* 2011; 3(2): 147-57.
105. Vital-Lopez FG, Reifman J, Wallqvist A. Biofilm Formation Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Predicted via Genome-Scale Kinetic Models of Bacterial Metabolism. *PLoS Comput Biol.* 2015 [E-pub], doi: 10.1371/journal.pcbi.1004452
106. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* 2012; 14: 1913-1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x
107. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1581-1588.

108. Trivedi U, Parameswaran S, Armstrong A, Burgueno-Vega D, Griswold J, Dissanaik S. Prevalence of Multiple Antibiotic Resistant Infections in Diabetic versus Nondiabetic Wounds. *Journal of Pathogens* 2014 [E-pub], doi 10.1155/2014/173053
109. Zubair M, Malik A, Ahmad J. Clinico-bacteriology and risk factors for the diabetic foot infection with multidrug resistant microorganisms in north India. *Biology and Medicine* 2010; 2(4): 22-34.
110. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9(1): 34-9.
111. Patricia M. Mertz. Cutaneous Biofilms: Friend or Foe? *Wounds* 2003; 15(5): 1-5.
112. Wang Q, Sun FJ, Liu Y, Xiong LR, Xie LL, Xia PY. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaA⁺BC⁺ and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2707-2711.
113. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3357-3363.
114. Leid J. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 2002; 70(11): 6339-45.
115. Motta RN, Oliveira MM, Megahaes PS, Dias AM, Araqao LP, Forti AC, et al. Plasmid mediated extended spectrum beta lactamase producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetic foot infections in a Brazilian diabetic center. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(2): 129-34.
116. Murugan S, Uma Devi P, John P. Antimicrobial susceptibility pattern of biofilm producing *Escherichia coli* of Urinary tract infections. *Curr Rese Bacter* 2011; 4: 73-80.
117. Poovendran P, Vidhya N, Murugan S. Antimicrobial Susceptibility Pattern of ESBL and Non-ESBL Producing Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and

- Their Correlation with Biofilm Formation. *International Journal of Microbiological Research* 2013; 4(1): 56-63.
118. Eleftheriadou I, Tentolouris N, Argiana V, Jude E, Boulton AJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections. *Drugs* 2010; 70: 1785-97.
 119. Lecornet E, Robert J, Jacqueminet S, Van Georges H, Jeanne S, Bouilloud F. Preemptive Isolation to Prevent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Cross-Transmission in Diabetic Foot Diabetes Care 2007; 30: 2341-2342.
 120. Dang CN, Prasad YD, Boulton AJ, Jude EB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabet Med.* 2003; 20(2): 159-61.
 121. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 18-55.
 122. Reiter KC, Paim TGdS, de Oliveira CF, d'Azevedo PA. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS* 2011; 119: 776-81.
 123. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmel CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2008; 57(8): 1018-23.
 124. Smyth A, Bell S, Bojcin S, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines *Journal of Cystic Fibrosis* 2014; 13(1): 23-42.
 125. Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 362: 1213- 22.
 126. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3648-63.

127. Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, Hentzer M, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2432-43
128. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* 2005; 187: 1799-814.
129. Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? *Curr Infect Dis Rep* 2008;10: 22-8.
130. Paredes J, Onso-Arce M, Schmidt C et al. Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections. *Biomed Microdevices* 2014; 16(3): 365-374.