

MERVE BILGIN

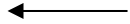
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BİYOFİLM OLUŞTURAN STAFİLOKOKLARA KARŞI ANTİBİYOTİKLERİN
TEK BAŞINA VE DİFÜZE OLAN SİNYAL FAKTÖRÜ İLE
KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

MERVE BİLGİN

DANIŞMAN
DOÇ.DR. SİBEL DÖŞLER

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

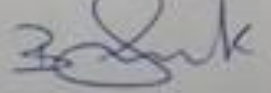
İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Mikrobiyoloji Programında Doktora öğrencisi Merve Bilgin tarafından Doç.Dr. Sibel DÖŞLER'in danışmanlığında hazırlanan "Biyofilm oluşturan Stafilokoklara karşı antibiyotiklerin tek başına ve difüze olan sinyal faktörü ile kombinasyonlarının in vitro araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28 /06/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Berna ÖZBEK ÇELİK
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı



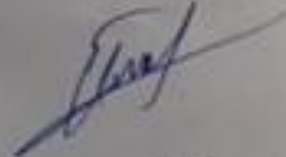
Jüri-Danışman

Doç.Dr. Sibel DÖŞLER
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı



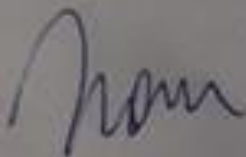
Jüri

Prof.Dr. Ümrân S. GÜRER
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr.Emir TAN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı



Jüri

Doç.Dr. A.Seher BİRTEKSÖZ TAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Bilgin

Merve

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan bana her konuda yardımcı ve destek olan değerli hocam Prof. Dr. Gülten ÖTÜK'e ve değerli danışman hocam Doç.Dr. Sibel DÖŞLER'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitim hayatım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve her zaman destek olan, İstanbul Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.'da görev yapan değerli hocalarım Prof.Dr. Berna Özbek Çelik'e, Doç.Dr. Ayşe Seher Birteksöz Tan'a, Doç.Dr. Çağla Bozkurt Güzel'e, Kimyager Emine Tuncer'e, Arş.Gör.Dr. Mayram Hacıoğlu'na, Arş.Gör.Dr. Emel Mataracı Kara'ya, Arş.Gör. Özlem Oyardı'ya ve değerli yüksek lisans ve doktora arkadaşlarıma,

Çalışma hayatım boyunca bana her zaman destek olan, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi'nde görev yapan değerli hocalarım Rektör Yardımcısı Prof.Dr. Emir Tan'a, Dekanım Prof.Dr. İmer Okar'a, Eczacılık Fakültesi'de görev yapan değerli öğretim üyesi hocalarım ve asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, bana yol gösteren canım babam, annem ve ablama teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 54406

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	2
BEYAN	3
İTHAF	4
TEŞEKKÜR	5
İÇİNDEKİLER.....	6
TABLolar LİSTESİ	9
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	12
ÖZET	13
ABSTRACT	14
1. GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2.1. Stafilokoklarla ilgili genel bilgiler	17
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.1.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
2.2. Biyofilmle ilgili genel bilgiler	28
2.2.1. Biyofilmin yapısı	28
2.2.2. Biyofilm oluşum süreci	29
2.2.3. Quorum Sensing	31
2.2.3.1. QS'in bazı bakteri türlerinin biyofilm gelişimindeki rolü	32
2.2.3.2. Stafilokoklardaki Quorum Sensing kontrolü: agr sistemi ve fonksiyonu....	34
2.2.4. Biyofilm enfeksiyonları.....	37
2.2.5. Biyofilmlerde antibiyotik direnci	37
2.2.6. Biyofilm kontrolü	38
2.3. Difüze olan Sinyal Faktörü (DSF) ailesi QS sinyal molekülleri	40
2.3.1. DSF sinyal iletiminin iki temel yolu	41
2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'daki cis-2-dekanoik asit sinyali.....	44
2.3.3. RpfF ve sinyal biyosentezi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.3.4. RpfF ve RpfC arasındaki etkileşim	44
2.3.5. Sinyal bozulması ve RpfB'nin rolü.....	45

2.3.6. Sinyalleşmeyi engelleyen DSF'nin yapısal analogları.....	46
2.3.7. Potansiyel terapötikler olarak DSF ailesi molekülleri.....	47
2.4. Antibiyotiklerle ilgili genel bilgiler.....	50
2.4.1. Daptomisin	50
2.4.2. Vankomisin.....	51
2.4.3. Gentamisin.....	52
2.4.4. Linezolid.....	53
2.4.5. Meropenem.....	55
2.4.6. Siprofloksasin.....	56
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	57
3.2. Çalışmada kullanılan Antimikrobiyal maddeler.....	57
3.2.1. Çalışmada kullanılan Antibiyotikler ve hazırlanışları.....	57
3.2.2. Çalışmada kullanılan Quorum Sensing sinyal molekülleri ve hazırlanışları....	58
3.2.2.1. DSF molekülünün hazırlanışı	58
3.2.2.2. BDSF molekülünün hazırlanışı	58
3.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri	58
3.3.1. %1'lik Glikozlu Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri (BD Bacto Difco).....	58
3.3.2. Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri (Oxoid).....	58
3.3.3. Katyon ilaveli Mueller Hinton Broth (CAMHB) besiyeri (Oxoid).....	59
3.4. Çalışmada kullanılan Çözeltiler	59
3.4.1. %0,1'lik Kristal viyole (Merck)	59
3.4.2. %10'luk Glikoz çözeltisi	59
3.4.3. pH 7.2 Fosfat tamponu çözeltisi	60
3.4.4. Fizyolojik Tuzlu su.....	60
3.5. Tanı testleri.....	60
3.5.1. Koagülaz testi (Stafilaz testi, Oxoid) Staphytect Plus (Oxoid, Cambridge, United Kingdom).....	60
3.5.2. Katalaz testi	60
3.6. Biyofilm oluşumunun incelenmesi.....	61
3.7. Çalışmada kullanılan antibiyotiklere ait Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisit Konsantrasyonunun (MBK) saptanması	61

3.7.1. Çalışmanın standardizasyonu	62
3.8. Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu (MBİK) ve Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyonun (MBEK) tayini	62
3.9. QS sinyal moleküllerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sonuçlarına etkilerinin belirlenmesi	63
3.9.1. QS sinyal moleküllerinin MİK sonuçlarına etkilerinin belirlenmesi	63
3.9.2. QS sinyal moleküllerinin MBİK ve MBEK üzerine etkisinin belirlenmesi.....	63
3.10. Time-kill curve yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkilerin saptanması.....	63
4. BULGULAR	65
4.1. Biyofilm oluşturan Stafilok suşlarının belirlenmesine ait bulgular.....	65
4.2. MİK ve MBK konsantrasyonlarının belirlenmesine ait bulgular.....	66
4.4. QS sinyal moleküllerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular	67
4.4.1. QS Sinyal moleküllerinin MİK sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular	67
4.4.2. QS sinyal moleküllerinin MBİK/MBEK sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular.....	69
4.5. Time Kill Curve yöntemiyle zamana karşı öldürme kinetiklerinin belirlenmesine ait bulgular.....	70
4.5.1. <i>S.epidermidis</i> suşlarına ait bulgular.....	70
4.5.2. <i>S.aureus</i> suşlarına ait bulgular.....	75
4.5.1. <i>S.aureus</i> suşlarına ait bulgular.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
5. TARTIŞMA	80
KAYNAKLAR.....	93
HAM VERİLER.....	107
FORMLAR.....	108
ETİK KURUL KARARI.....	109
PATENT HAKKI İZNİ.....	110
TELİF HAKKI İZNİ	111
ÖZGEÇMİŞ	112

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: QS sinyal moleküllerinin yapıları ve düzenledikleri fonksiyonlar.....	32
Tablo 2-2: Bakterilerde bulunan DSF ailesi sinyalleri tarafından düzenlenen faktörler.....	49
Tablo 4-1: Klinik Stafilokok suşlarının biyofilm oluşturma dereceleri	65
Tablo 4-2: Biyofilm oluşturan Stafilokok suşlarına karşı çeşitli antibiyotiklerin MİK, MBK, MBİK ve MBEK konsantrasyonu aralıkları.....	67
Tablo 4-3: QS sinyal moleküllerinin antibiyotiklerin MİK konsantrasyonları üzerine etkileri	68
Tablo 4-4: QS sinyal moleküllerinin MBİK ve MBEK konsantrasyonları üzerine etkileri...	69



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>S. aureus</i> 'un mikroskop görüntüsü.....	18
Şekil 2-1: <i>S. aureus</i> 'un besiyerindeki görüntüsü.....	18
Şekil 2-2: <i>S.aureus</i> 'un virülans faktörleri	20
Şekil 2-3: <i>S. epidermidis</i> 'in elektron mikroskobu görüntüsü.....	26
Şekil 2-4: <i>S. epidermidis</i> 'in besiyerindeki görüntüsü.....	26
Şekil 2-5: Biyofilm oluşum süreci.....	30
Şekil 2-6: Stafilokoklardaki Agr QS sistemi.....	37
Şekil 2-7: <i>Xanthomonas</i> ve <i>Burkholderia</i> türlerindeki DSF ailesi sinyallerini içeren iki temel sinyalleşme yolağı.....	44
Şekil: 2-8: Daptomisinin kimyasal formülü.....	52
Şekil 2-9: Vankomisinin kimyasal formülü.....	54
Şekil 2-10: Gentamisinin kimyasal formülü.....	55
Şekil 2-11: Linezolidin kimyasal formülü.....	56
Şekil 2-12: Meropenemin kimyasal formülü.....	57
Şekil 2-13: Siprofloksasinin kimyasal formülü.....	58
Şekil 4-1: MSSE suşlarının biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisinin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....	74
Şekil 4-2: MSSE suşlarının biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....	75
Şekil 4-3: MRSE suşunun biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisinin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....	76
Şekil 4-4: MRSE suşunun biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....	77
Şekil 4-5: MRSA suşlarının biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisinin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....	79

- Şekil 4-6: MRSA suşlarının biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....80
- Şekil 4-7: MSSA suşunun biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisinin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....81
- Şekil 4-8: MSSA suşunun biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler.....82



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

QS: Quorum Sensing

DSF: Diffusible signal factor; difüze olan sinyal faktörü

BDSF: *Burkholderia cenocepacia*'nın ürettiği difüze olan sinyal faktörü

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

MRSE: Metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis*

MSSE: Metisiline duyarlı *Staphylococcus epidermidis*

KNS: Koagülaz negatif Stafilokok

PIA: Polisakkarit interselüler adezin

AAP: Accumulation Associated Protein

EPS: Ekzopolisakkarit

MIK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MBK: Minimal Bakterisit Konsantrasyonu

MBIK: Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu

MBEK: Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon

MSCRAMMs: aderan matriks moleküllerini tanıyan ve konakçı dokulara yapışmaya aracılık eden mikrobiyal yüzey bileşenleri

Pbp: Penisilin bağlayan protein

HK-MRSA: Hastane kökenli Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

TK-MRSA: Toplum kökenli Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

KKV: Küçük koloni varyantları

AIP: Autoinducer peptid; otoindükleyici peptid

MGE: Mobil genetik elemanlar

HAP: Hospital-acquired pneumonia; Hastane kökenli pnömoni

VAP: Ventilator associated pneumonia; Ventilatör ilişkili pnömoni

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Buyyon

CAMHB: Cation adjusted Mueller Hinton Buyyon; katyon ilaveli Mueller Hinton Buyyon

ÖZET

Bilgin, M. (2018). Biyofilm oluşturan Stafilokoklara karşı antibiyotiklerin tek başına ve difüze olan sinyal faktörü ile kombinasyonlarının in vitro araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Geçmişten günümüze en önemli patojen bakteriler arasında yer alan Stafilokokların, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların en yaygın etkenleri arasında bulundukları bilinmektedir. Bu çalışmada, yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan metisiline dirençli ve duyarlı Stafilokok suşlarının planktonik formları ve olgun biyofilmlerine karşı yeni antimikrobiyal ve antibiyofilm mekanizmalarından kabul edilen DSF ve BDSF gibi QS sinyal moleküllerinin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halindeki in vitro etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla farklı hastalardan izole edilen 5'i *S. epidermidis* 10'u *S. aureus* olmak üzere 15 klinik suşun kristal viyole ile boyama yöntemiyle biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiş, 7'sinin güçlü, 2'sinin orta, 6'sının zayıf biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir. Planktonik formdaki bakterilere karşı antibiyotiklerin tek başlarına ya da QS sinyal molekülleri ile birlikte minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), biyofilm formlarına karşı ise minimum biyofilm eradike edici konsantrasyonları (MBEK) ve zamana bağlı ölüm oranları belirlenmiştir. Sonuç olarak en düşük MİK değerleri siprofloksasin ve gentamisinle, MBEK değeri ise siprofloksasinle elde edilmiştir. QS sinyal moleküllerinden DSF, vankomisin ve gentamisinin MİK'lerini 2-8 kat, BDSF ise siprofloksasin ve gentamisinin MİK'lerini 2-32 kata kadar azaltmıştır. BDSF gentamisinin MBEK'ini 64, DSF ise meropenemin MBEK'ini 8 kata kadar azaltarak en kuvvetli etkileri göstermişlerdir. Zamana bağlı öldürme deneylerinde QS sinyal moleküllerinin antibiyotiklerin etkisini arttırıcı özelliklerinin genellikle ilk 6 saatte görüldüğü, 24. saatte ise DSF'nin vankomisin, linezolid ve gentamisinle, BDSF'nin ise daptomisin, gentamisin ve meropenemle birlikte canlı bakteri sayısını tek başına kullanılan antibiyotiğe kıyasla 2 log'a kadar azalttıkları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: QS sinyal molekülleri, antibiyotikler, antibiyofilm aktivite, *S. aureus*, *S.epidermidis*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 54406

ABSTRACT

Bilgin, Merve. (2018). *In vitro* investigation of various antibiotics alone and in combination with diffusible signal factor against biofilm forming Staphylococci. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Microbiology. Doktora Tezi. İstanbul.

Staphylococci are one of the most important pathogenic bacteria and known to be the most common causes of hospital and community-acquired infections. This study aimed to investigate the *in vitro* effects of QS signaling molecules, such as DSF and BDSF in combination with various antibiotics, against planktonic and mature biofilm cells of methicillin resistant and susceptible Staphylococci.

For this purpose, the biofilm formation of 15 clinical strains were tested with crystal violet staining method. 7 of them were strong, 2 of them were medium and 6 of them were weak biofilm formers. Then, minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics alone and in combination with QS signaling molecules against planktonic cells, a minimum biofilm eradication concentration (MBEC) and time kill rates against biofilms were determined. As a result, the lowest MIC's were obtained with ciprofloxacin and gentamicin, and the MBEC's with ciprofloxacin. DSF decreased the MIC's of vancomycin and gentamicin about 2-8 fold while BDSF decreased ciprofloxacin and gentamicins' MICs, 2-32 fold. BDSF showed the strongest effect by decreasing MBECs' of gentamicin to 64 fold and DSF decreasing meropenem's 8 fold. In time kill studies, QS signaling molecules enhanced the activities of antibiotics in first 6 hours, generally. At 24 th hour, it was determined that DSF in combination with vancomycin, linezolid and gentamycin; and BDSF with daptomycin, gentamicin and meropenem decreased the number of viable cells in biofilms up to 2 log, compared to the antibiotic used alone.

Key Words: QS signal molecules, antibiotics, antibiofilm activity, *S. aureus*, *S.epidermidis*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 54406

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Stafilokok türleri doğada çok yaygın olarak bulunan, Gram pozitif kok şeklinde, insan ve sıcak kanlı hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açan önemli patojen bakterilerdir. Bu bakteriler sağlıklı erişkinlerin ön burun deliklerinde, deri katlarında, üst solunum sisteminde, farinkste, sindirim sisteminde, vajina ve perianal bölgelerinde kolonize olabilmektedirler (Archer, 1998; Berkiten, 2005). En önemli türleri, insanda hastalık yapabilen *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'dir. Stafilocoklar lokal olarak çıban, selülit, impetigo bullosa gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, orta kulak iltihabı, sinüzit ve pnömoniye yol açabilmekte veya kana karışırsa iç organların periferik bölgelerine yerleşip çoğalarak endokardit, osteomyelit, menenjit, renal karbonkül, septik artrit veya epidural abseler gibi spesifik stafilocok enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler. *S.aureus* ayrıca spesifik toksinlerinin lokal veya sistemik etkilerinin neden olduğu toksik şok sendromu, haşlanmış deri sendromu veya gıda zehirlenmeleri ve gastroenterite de neden olabilmektedir (Usluer, 2012).

Stafilokok türleri hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlarda önemli rol oynarlar. 1960'lı yıllarda metisilin tedavide kullanılmaya başlanmasından hemen sonra metisiline dirençli Stafilocok suşlarının ortaya çıkması ve toplumlar arasında hızlıca yayılması, bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini oldukça güç hale getirmiştir (Boucher ve ark., 2010). Ayrıca vücutta intravenöz kateterler, protezler gibi yabancı materyallerin varlığı da stafilocok enfeksiyonu riskini arttırmaktadır.

Stafilokok türlerinin insanda yaptığı farklı hastalıklarda çeşitli virulans faktörleri rol oynamaktadır. Bu virulans faktörlerinden biri stafilocokların çeşitli yüzeylerde kolonize olmaları ve üremeleri sonucunda oluşturabildikleri biyofilmlerdir. Biyofilm, bakteri topluluğunun etrafında oluşan ekzopolisakkarit yapıda bir matriks olup, antimikrobiyal maddelerin bakteriye ulaşmasını engelleyebilen bir yapıdır. Bundan dolayı biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençleri 10-1000 kat daha fazla olabilmekte ve biyofilm oluşumu çoğunlukla kronik veya nükseden stafilocok enfeksiyonlarının antibiyotiklerle tedavisini oldukça güç hale getirmektedir. Bunun için de antibiyotiklere yardımcı olabilecek yeni ve etkili moleküllerin keşfi ile ilgili çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır (Corsterton ve ark. 1995).

Bir çeşit yeterli çoğunluğu algılama (Quorum Sensing, QS) molekülü olan ve difüze olan sinyal faktörü (DSF) grubunda yer alan maddeler gerek biyofilm oluşumu, hareket ve antibiyotik direnci gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların, gerekse tür içi ve türler arası iletişimin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. DSF'ler bir çok Gram negatif bakteri tarafından oluşturulan doymamış yağ asitleridir (Deng ve ark., 2014). DSF grubunda yer alan sinyallerin çeşitli mikroorganizmaların biyofilm dispersiyonunu indüklediği bildirilmiş, yapılan bazı çalışmalarda da çok düşük konsantrasyonlardaki DSF ve türevlerinin bazı antibiyotiklerin bakteriyel patojenlere karşı gösterdikleri minimum inhibitör konsantrasyonlarında (MIK) azalmaya yol açtıkları yani mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını arttırdıkları bildirilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda DSF ve ona yapısal olarak benzeyen BDSF gibi moleküllerin, bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde antibiyotik adjuvanı olarak kullanılma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2004; Deng ve ark., 2014).

Bu çalışmada, farklı hastalardan izole edilmiş metisiline dirençli ve duyarlı *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının planktonik formlarına ve oluşturdukları olgun biyofilmlere karşı çeşitli antibiyotiklerin tek başlarına ve QS sinyal molekülleri olan DSF ve BDSF ile birlikte in vitro etkinlikleri araştırılarak bu moleküllerin, Stafilokokların serbest yada biyofilm formlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarında meydana getireceği değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilokoklarla ilgili genel bilgiler

2.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus hem kommensal hem patojen ayrıca diğer Stafilokoklar gibi Gram pozitif kok şeklinde (Şekil 2-1), hareketsiz, sporsuz, katalaz enzimine sahip bir bakteri olup, koagülaz enziminin varlığı ile diğer Stafilokok türlerinden ayrılmaktadır. Kanlı Agarda eritrositlerin tamamını hemoliz ettiği için beta hemolitik olarak adlandırılan *S. aureus*, besiyerinde oluşturduğu altın sarısı pigmentli kolonileriyle (Şekil 2-2) diğer beta hemolitik koklardan ayırt edilmektedir (Gladwin 2011). İnsan vücudunda ön burun delikleri *S. aureus* için başlıca ekolojik niştir. Erişkin bireylerin yaklaşık %20'sinin burunları kalıcı olarak, %30'ununki ise aralıklı olarak *S. aureus* ile kolonize olmaktadır. *S. aureus* ayrıca koltuk altı, kasık ve gastrointestinal sistemi de içeren sayısız bölgede kolonize olabilmektedir. Tıraş olma, aspirasyon, kateter yerleştirme veya cerrahi işlemler gibi konak savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda kolonize bakterilerle enfeksiyon gelişme riski artmaktadır. Kolonizasyon ayrıca sağlık çalışanları, hasta bireyler ve toplum arasında *S. aureus*'un yayılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin; bakteriyemi ile ilgili yapılan bir çalışmada, hastaların %82'sinde tespit edilen kan izolatlarının burundan izole edilen suşlarla aynı oldukları bildirilmiştir. *S. aureus* kolonizasyonunun temeli kompleks bir süreç olup tam olarak anlaşılamamışsa da, bu sürecin konağın bakteri ile temasını ve *S. aureus*'un konak hücrelerine tutunma ve immun yanıtından kaçabilme yeteneğini içerdiği tahmin edilmektedir (Gordon ve Lowy 2008).



Şekil 2-1: *S. aureus*'un mikroskop görüntüsü



Şekil 2-2: *S. aureus*'un besiyerindeki görüntüsü

S. aureus, enfeksiyon sürecinde rol oynayan, yapısal ve salgısal bir çok virülans faktörüne ve aderan matriks moleküllerini tanıyan ve konakçı dokulara yapışmaya aracılık eden mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMMs) adı verilen sayısız yüzey proteinine sahiptir (Şekil 2-3). Bu yüzey proteinleri kollajen, fibronektin ve fibrinojen gibi moleküllere bağlanarak konakçı dokuya yapışabilmektedir. MSCRAMM'ler endovasküler enfeksiyonlar, kemik ve eklem enfeksiyonları ve prostetik cihaz (protezle ilgili) enfeksiyonlarında anahtar rolü oynarlar. Farklı *S. aureus* suşları farklı MSCRAMM grupları içerebilmekte ve bu şekilde farklı türde enfeksiyonların oluşmasına neden olabilmektedirler (Patti ve ark.1994, Foster ve Hook 1998; Menzies 2003).

S. aureus ilk olarak konakçı dokusuna veya prostetik materyale yapışmakta ve orada üreyip çeşitli yollarla yaşamını sürdürebilmektedir. Yüzeyle yapışarak oluşturduğu biyofilm veya slaym sayesinde konak savunma sisteminden veya antimikrobiyallerden kaçıp kurtularak o bölgede kalıcı olabilmektedir (Donlan ve Costerton 2002). *S. aureus* ayrıca persistan veya reküren enfeksiyonlara yol açabilen küçük koloni varyantları (KKV) oluşturabilmektedir (Ogawa ve ark., 1985). İn vitro olarak küçük koloni varyantları, konak hücrelerinde önemli bir hasara yol açmadan saklanabilmekte ve hem antibiyotiklerden hem de konak savunmasından korunabilmektedir. KKV'ler sonradan, daha virulan olan wild tip fenotipine dönüşebilmekte, bu da tekrarlayan (reküren) enfeksiyonlarla sonuçlanabilmektedir (Proctor ve ark. 1995).

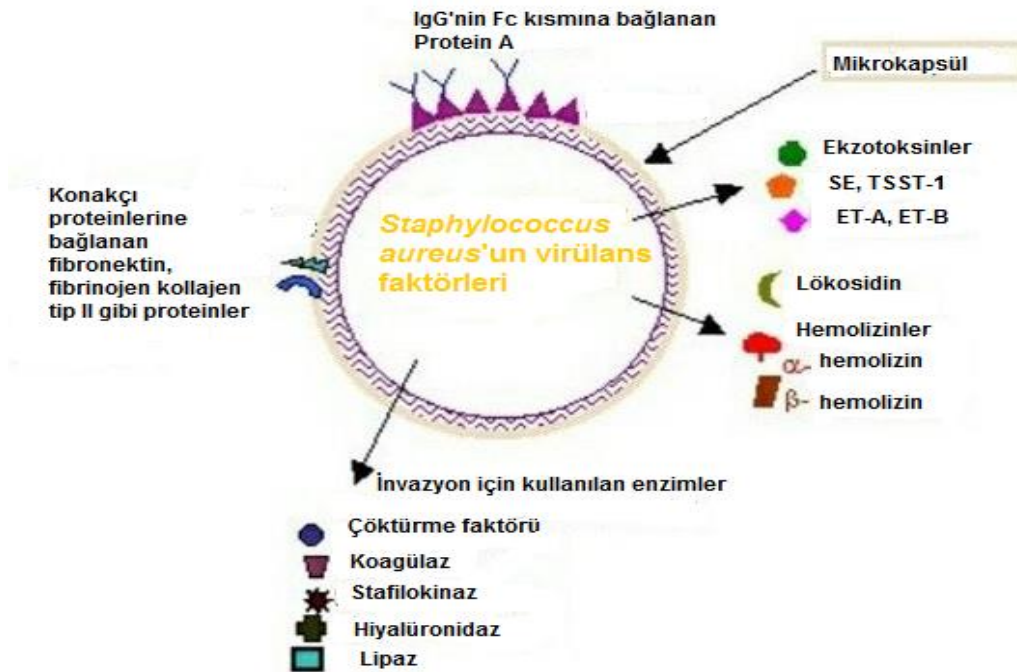
S. aureus'un bir enfeksiyon sırasında konak savunma sisteminden kaçışına yardım eden bir çok özelliği bulunmaktadır. Stafilocokların çoğunda olduğu gibi en dışta bir polisakkarit kapsül yer almaktadır. *S. aureus*'da 11 adet kapsül serotipi belirlenmiş olup, serotip 1 ve 2 mukoid koloniler oluşturan kalın bir kapsül olmakla beraber nadiren insanda hastalık yapan tipler ile ilişkilidir. Enfeksiyona en çok neden olan tipler ise serotip 5 ve 7'dir. Bakteri, ürettiği mikrokapsül sayesinde polimorf hücreli lökositlerin fagositozundan korunmaktadır. Ayrıca bu zwitteriyonik (hem pozitif hem de negatif yüklü) kapsül, abse oluşumuna neden olmaktadır. (O'Riordan ve Lee 2004; Tzianabos ve Wang 2001; Sultan 2014)

MSCRAMM protein A, immunoglobulinin "Fc" kısmına bağlanmakta ve opsonizasyonu engellemektedir (Deisenhofer, 1981). *S. aureus*'un ürettiği kemotaksi inhibitör proteini veya ekstraselüler aderans proteini, nötrofillerin ekstrasvazasyonunu ve enfeksiyon bölgesine göçünü engellemektedir (Foster, 2005). Ayrıca *S. aureus*'un ürettiği lökositidinler de hücre membranında porlar oluşturarak lökositlerin öldürülmesine neden olmaktadır (Gladstone ve VanHeyningen, 1957).

Enfeksiyon sırasında *S. aureus*, konakçı dokuları tahrip ederek kendisinin diğer bölgelere ulaşmasını sağlayan proteazlar, lipazlar ve elastazlar gibi çok sayıda enzim üretebilmektedir. *S. aureus* konak immün sistemini ve koagülasyon yollarını aktive edip etkileşime girerek septik şoka da yol açabilmektedir. Peptidoglikan, lipoteikoik asit ve α -toksin bu süreçte rol oynayabilmektedir (Timmerman ve ark. 1993; Bhaksi ve Trantum-Jensen 1991). Buna ek olarak septik şoka neden olan bazı *S. aureus* suşlarının ürettikleri

süperantijenler, çeşitli zehirlenmelere (gıda zehirlenmesi, toksik şok sendromu gibi) yol açabilmektedirler (Dinges ve ark. 2000; McCormick ve ark. 2001). Diğer komponentlerden farklı olarak süper antijenler, sitokin saldırısını başlatarak sepsise benzer bir sendroma da neden olabilmektedir. Bazı suşlar ayrıca, haşlanmış deri sendromu ve bülož (kabarcıklı) impetigoya yol açan epidermolizinler ile ekzfoliyatif enzimler de üretebilmektedir (Prevost ve ark. 2003).

Stafilokokkal virülans faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi patogeneizde baş rolü oynamaktadır. Ekspresyon, bakteri için gerekli olduğunda ve koordineli bir biçimde meydana gelmektedir. Örneğin, MSCRAMM'ların ekspresyonu logaritmik üreme sırasında meydana gelirken, toksinler gibi salgısal proteinler durağan fazda üretilirler. Böylece enfeksiyon sırasında MSCRAMM proteinlerinin erken ekspresyonu, bakterinin dokulara ilk kolonizasyonunu sağlamakta, toksinlerin sonradan devreye girmesi de dokularda yayılmasını kolaylaştırmaktadır.



Şekil 2-3: *S.aureus*'un virülans faktörleri

<https://www.slideshare.net/doctorrao/staphylococcus-aureus-basic-exercise>

S. aureus'un patojenitesi ve biyofilm oluşturma özelliği, bakteriler arasında yaygın olarak bulunan ve Quorum Sensing (QS) adı verilen bir düzenleyici mekanizma olan hücre-hücre iletişim sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Yarwood ve Schlievert 2003). Üremesi sırasında *S. aureus* tarafından, hücre dışında toplanarak çoğalan bir otoindükleyici peptid (AIP) salgılanmakta ve bu AIP kritik bir konsantrasyona ulaştıktan sonra taşıdığı sinyali bir yüzey reseptörüne bağlayarak agr sistemi adı verilen düzenleyici bir kaskadı aktive etmektedir (Novick, 2003). Bu süreç toksinler, hemolizinler, proteazlar ve diğer doku parçalayıcı enzimleri içeren invaziv faktörlerin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanmaktadır.

S. aureus'un bir patojen olarak çok yönlü olmasının sebebi, suşların birçoğunun plazmidler veya profajlar gibi mobil (hareketli) genetik elemanlar (MGE'ler) üzerinde kodlanan değişik virülans faktörlerine sahip olmalarındandır. Bu özellikler horizontal gen transferi olarak da adlandırılan ve faj transdüksiyonu, konjugasyon veya son zamanlarda keşfedilen çıplak DNA'nın genetik kompetansla (yetiyle) doğrudan alınması yollarından biri ile suşlar arasında aktarılabilir (Morikawa ve ark. 2012).

S. aureus'un virülans faktörlerinden bir çoğu, genellikle zehirli maddeler olarak da tanımlanan toksinler olup bunlar, patojen mikroorganizmanın daha çok çeşit hastalığa neden olma potansiyelini artıran moleküller olarak diğer virülans faktörlerinden ayrılmaktadır. Üretilen mikroorganizma tarafından salgılanan toksinler konağa doğrudan saldırıya geçmektedir (Peacock ve ark. 2002)

Membran yıkıcı (Sitolitik toksinler): Sitoplazmik membran, *S. aureus* tarafından üretilen toksinler de dahil olmak üzere bir dizi bakteriyel toksinin hedefidir. Sitoplazmik membranda por oluşumuna neden olan toksinler, hücre için hayati önem taşıyan moleküllerin ve metabolitlerin dışarı atılmasına yol açtıkları için, sitolitik olarak da tanımlanmakta ve iki alt gruba ayrılmaktadır. İlk grupta lizisin, başlangıçtaki reseptör etkileşimine bağlı olduğu, yüksek hedef hücre özgüllüğü gösteren toksinler, ikinci grupta ise membran reseptörü ile etkileşimi olmaksızın daha az spesifik bir tarzda müdahale eden toksinler yer almaktadır. *S. aureus*, çoğunun kırmızı ve/ veya beyaz kan hücrelerini parçaladığı bilinen, çeşitli reseptör aracılı sitolitik toksinler üretmektedir. Bunlardan kırmızı kan hücrelerini parçalayanlar hemolizinler, beyaz kan hücrelerini hedefleyenler ise lökositinler olarak bilinmektedir (Sultan 2014).

Alfa toksini: *S. aureus*'un en iyi bilinen toksinidir ve beta-varil oluşturunca toksinlerin tanımlanmış ilk örneğidir. Ağırlıklı olarak beta tabakalarından oluşmakta, kırmızı kan hücrelerini ve bir dizi lökosit parçalayabilmekte ancak nötrofilleri parçalayamamaktadır. 293 amino asit uzunluğunda olmakla birlikte tek değerlikli iyonların (K^+ , Na^+), daha yüksek konsantrasyonda ise iki değerlikli iyonların (Ca^{2+}) dışa atımına yol açan heptamerik bir por oluşturmaktadır (Berube ve Bubeck 2013). Bu mekanizmalardan, yüksek konsantrasyonlardaki por oluşumunun reseptöre bağlı olduğu ancak daha düşük konsantrasyonlardaki por oluşumunun ise ADAM 10 (a disintegin and metalloproteinase domain containing protein 10; disintegin ve metalloproteineaz domaini içeren protein 10) reseptörü ile etkileşimine bağlı olduğu gösterilmiştir (Wilke ve Bubeck 2010; İnoshima ve ark. 2011). Alfa-toksininin, ADAM 10'a bağlanması, fokal (merkezi) adezyonların parçalanmasına, özellikle de epitel hücrelerinde bulunan E-kaderin'in ayrılması ile epitelyal bariyer fonksiyonunun kaybına yol açmaktadır. Alfa toksin ayrıca reseptöre bağımsız olarak insan monositlerinde, T ve B hücrelerinde apoptoza neden olabilmektedir (Nygaard ve ark. 2012).

Panton-Valentine lökosidini: *S. aureus*, alfa-toksinine yapısal olarak benzer şekilde beta-varil por oluşturan toksin familyasına ait, iki bileşenli Panton-Valentine lökosidini de üretmektedir. Bu toksin, LukS (yavaş ayrılan) ve LukF (hızlı ayrılan) parçaları olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşmakta olup, iki adet F ve üç adet S proteini tanımlanmıştır (Otto 2014). Bakteriler tüm bu proteinleri kodlayarak farklı altı kombinasyonla her iki toksini de üretebilmektedir. Bu toksinlerin hepsi makrofajları ve lökositleri parçalayabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PVL'nin toplum kökenli MRSA'ların hepsinde mevcut olduğu, hastane kökenli MRSA'ların ise en az %5'inde saptandığı bildirilmiştir. Bu nedenle PVL toksini, primer virülans faktörü olarak bu suşların tanısında kullanılabilmektedir (Sultan 2014 p. 213).

Ekzfoliyatif toksinler: Haşlanmış deri sendromuna yol açan Stafilokok toksinleri olup suşların yaklaşık %5-%10'u bu toksinlere sahiptir. Toksinin, her ikisi de hastalık yapıcı olan ve ETA ve ETB olarak tanımlanan iki formu bulunmaktadır. ETA, kromozom üzerinde kodlanmakla olup ısıya dayanıklıyken, plazmid tarafından kodlanan ETB formu ise ısıya karşı duyarlıdır. Bu toksinler, epidermis tabakasında hücreler arası bağlantıları oluşturan ve tutunma yapısı desmosomlarının bir üyesi olan desmoglein 1'i parçalayarak etki eden serin proteazlardır. Sitoliz veya enflamasyonla ilgili olmadıkları için konak epidermisinde lökosit

veya stafilokok tespit edilemez. Hastalığın ilerleyen evrelerinde koruyucu antikorlar gelişerek epidermisdeki toksik etkiyi ortadan kaldırmaktadır (Dinges ve ark. 2000).

Enterotoksinler: Enterotoksinler yaklaşık 20-30 kD büyüklüğünde, genel olarak bağırsak fonksiyonlarını bozan, salgısal toksinlerdir. *S. aureus* çok sayıda (20'ye yakın) enterotoksin ve benzeri toksinler üretebilmektedir (Lin ve ark., 2010). Enterotoksinler birkaç farklı grupta toplanmaktadır. Bunlardan enterotoksin A daha çok gıda zehirlenmelerine, enterotoksin B pseudomembranöz enterokolite neden olmaktadır. Enterotoksin C ve D ise sıklıkla kontamine süt ürünlerinde bulunmaktadır. Enterotoksinler uzun süre ısıya maruz kaldıklarında bile dayanıklı olmakla birlikte mide ve bağırsak enzimlerine karşı dirençlidirler. Stafilokok suşlarının yaklaşık %30 - 50'sinde bulunabilmekte, konakta kusmaya neden olmaktadır (Sultan 2014 p.214).

Toksik Şok Sendromu toksini-1: Kromozom tarafından kodlanan, proteolize dirençli bir ekzotoksindir. *S. aureus*'un ürettiği bu toksinin, menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromu vakalarının %90'ından, diğer vakaların ise %50'sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Genellikle vajina, yara vb. yerlere yerleşen bu toksinler mukozal bariyerlerden geçerek sistemik toksik şok sendromu tablosuna yol açabilmekte ve eğer etkeni ortadan kaldıracak antibiyotik tedavisi uygulanmazsa bu tablo, çoklu organ yetmezliğine bağlı olarak hastanın ölümüyle sonuçlanabilmektedir (Sultan 2014 p.214).

***S.aureus*'un başlıca enzimleri**

Koagülaz hücre duvarında bulunan, fibrinojeni fibrine dönüştürerek stafilokokların kümeleşmesine neden olan ve bu sayede bakterileri fagositozdan koruyan bir enzimdir. Hyaluronidaz, bağ doku matriksinde bulunan hyaluronik asidi parçalayabilen; fibrinolizin, fibrin pıhtısını çözebilen; lipazlar, lipidleri parçalayarak Stafilokokların vücudun epidermoid kist dokularında yerleşmesini sağlayan enzimlerdir. Nükleazlar ise ısıya dayanıklı olmakla birlikte viskoz DNA'yı hidrolize edebilmektedir (Sultan 2014 p.214).

S. aureus'un oksasiline dirençli olarak da bilinen metisiline dirençli (MRSA) ve metisiline duyarlı (MSSA) suşları bulunmaktadır. Bu özelliğin kaynağı olan *S. aureus*'daki metisilin direnci, oksasilinin MİK değerinin 4 µg/mL'ye eşit veya daha fazla olması olarak tanımlanmaktadır. MRSA enfeksiyonları, hastane kaynaklı enfeksiyonların en önde gelen nedenlerinden biri olup yaygın olarak morbidite, mortalite, kalış süresi ve maliyet yüküyle ilişkilidir. MRSA enfeksiyonları ayrıca hastane kökenli (HK-MRSA) ve toplum kökenli (TK-

MRSA) enfeksiyonlar şeklinde ikiye ayrılabilir. HK-MRSA ve TK-MRSA sadece klinik özellikleri ve moleküler açıdan değil, aynı zamanda antibiyotiklere duyarlılık ve tedavileri açısından da fark göstermektedir. *S. aureus*'daki metisilin direnci, kromozomda kodlanmış bir protein olan penisilin bağlayan proteinin (PBP) mutasyonu ile meydana gelmekte ve suşlar arasında bakteriyofajlar ile aktarılmaktadır.

MRSA enfeksiyonunun tarihi, bu suşların ilk tanımlandığı 1961'e kadar uzanmaktadır. O zamandan beri MRSA enfeksiyonunun görülme sıklığı dramatik bir şekilde artmakta olup MRSA ile ilişkili yatışların bildirilen insidansı % 11.5 ile % 60 arasında değişmektedir. Son yıllarda yapılan bazı popülasyon çalışmalarında HK-MRSA insidansının azaldığı, ancak TK-MRSA prevalansının arttığı gösterilmektedir.

MRSA enfeksiyonu ile ilişkili risk faktörleri arasında hastanede yatış süresinin uzaması, yoğun bakım yatışları, yakın zamanda hastaneye yatış, son antibiyotik kullanımı, MRSA kolonizasyonu, invaziv prosedürler, HIV enfeksiyonu, bakımevlerine giriş, açık yaralar, hemodiyaliz, uzun süreli üriner ve santral venöz kateterleri sayılabilmektedir. Bu bakteri ile enfekte olmuş hastalar ile doğrudan temas eden sağlık çalışanları arasında da MRSA enfeksiyonunun görülme sıklığı fazladır. Her ne kadar ilerleyen yaş, MRSA enfeksiyonu için bir risk faktörü olarak görülmesi de, 65 yaşın üzerindeki hastaneye yatışlar da önemli bir risk faktörü haline gelmektedir. Bu nedenle, ilerleyen yaş MRSA edinimi ile dolaylı olarak bağlantılıdır. Yüksek TK-MRSA prevalansı olan bir bölgede yaşamak veya yüksek bir HK-MRSA prevalansı olan bir hastaneye başvurmak da MRSA kolonizasyonu için önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

MRSA, deri ve deri altı dokular arasında sıklıkla görülen, organa spesifik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca osteomyelit, menenjit, pnömoni, akciğer apsesi ve ampiyem gibi invaziv enfeksiyonların başlıca etkenidir. MRSA'nın neden olduğu enfeksiyöz endokardit diğer herhangi bir organizmaya göre artan morbidite ve mortalite ile ilişkili olup intravenöz ilaç kullanımı ile bağlantılıdır (Watkins ve ark., 2012). MRSA'nın neden olduğu enfeksiyonlar şunlardır:

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (SSTI): TK-MRSA, SSTI benzeri selülit, nekrotizan fasiit ve diyabetik ayak ülserleri ile ilişkili baskın bir mikroorganizmadır. Ayrıca, diğer bakterilere göre invaziv hastalıklarla daha çok ilişkilidir (Siddiqui ve Whitten 2018).

Pnömoni: İnfluenza sonrası pnömoni olarak da bilinen bir hastalık olan stafilokokal pnömoni, antibiyotik tedavisi öncesinde %80 - %90 arasında değişen solunum semptomları ve mortalite ile belirgin bir klinik tabloya yol açmaktadır. Antibiyotik sonrası dönemde ise *S. aureus* enfeksiyonları yaklaşık %30 - %40 arasında bir ölüm oranı taşımaktadır. Bununla birlikte yakın zaman önce, sağlıklı bireylerde hayatı tehdit eden nekrotizan pnömoniye neden olan TK-MRSA'lar bildirilmiştir. Hastalık, ağır solunum semptomları, yüksek ateş, hemoptizi ve hipotansiyon ile karakterize olup lökopeni ve yüksek C-reaktif proteinle (350 mg / dL'den daha büyük) sepsis ve septik şok yönünde hızla ilerler.

MRSA ayrıca hastane kaynaklı ve ventilatör ilişkili pnömoninin önde gelen nedenidir. Hastane kökenli pnömoni (HAP) veya nozokomiyal pnömoni, hastaneye yatıştan 48 saat ya da daha fazla süre sonra gelişen pnömoni olup, başvuru sırasında inkübasyon olmadığını göstermektedir. Ventilatör ilişkili pnömoni (VAP), ise endotrakeal entübasyon ve mekanik ventilasyonun uygulanmasından 48 saat veya daha sonra gelişen ve entübasyondan önce mevcut olmayan pnömoni olarak tanımlanmaktadır (Siddiqui ve Whitten 2018).

Bakteriyemi: *S. aureus*'a bağlı bakteriyemiler %15 - %60 oranında mortalite ile ilişkili olup, MRSA bakteriyemisi yaygın olarak santral girişli yoğun bakım hastalarında görülmektedir. Enfektif endokardit, MRSA bakteriyemisi ile ilişkilidir ve kan dolaşımında MRSA olan herhangi bir hastada görülebilmektedir. MRSA bakteriyemisi ile ilgili bulgular, bu hastalarda vankomisin yanıtının azalması nedeniyle diğer MRSA enfeksiyonlarından daha kötüdür.

MRSA enfeksiyonuna bağlı risk faktörleri olan hastalarda klinik şüphe ve tanı tedaviye başlama açısından çok önemlidir ve MRSA enfeksiyonunun doğrulanması için tedavi geciktirilmemelidir. Klinisyenler kan, balgam, idrar veya yara gibi şüpheli enfeksiyon kaynaklarından analizlerini yapılması için örnekler göndermeli, eş zamanlı olarak da ampirik tedaviye başlamalıdır. MRSA enfeksiyonunun ampirik antibiyotik tedavisinin seçimi hastalığın tipine, bakterinin direnç özelliklerine, ilacın mevcudiyetine, yan etki profiline ve bireysel hasta profiline bağlıdır (Siddiqui ve Whitten 2018).

2.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis tarih boyunca insan derisinin zararsız kommensal bakterisi olarak bilinmekteydi. Şimdi ise bu bakterinin önemli bir insan patojeni ve kalıcı medikal cihazlarla ilişkili enfeksiyonların çoğunluğunda etken mikroorganizma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *S.*

epidermidis'in nozokomiyal dolaşım sistemi enfeksiyonlarına (prostetik eklemler, kalp kapakçıkları, damar içi kateterlerden kaynaklı sepsis, üriner sistem enfeksiyonları), göz, kulak, burun ve boğaz enfeksiyonlarına ve kardiyovasküler enfeksiyonlara yol açtığı da bildirilmiştir. Kan kültürlerinden en sık izole edilen deri bulaşlarıdır (Vuong ve ark. 2003).

S. epidermidis, diğer Stafilokoklar gibi Gram pozitif kok şeklinde bir bakteri olup, kolonileri 2,5-6 mm çapında ve genellikle pigmentsizdir (Şekil 2-4, 2-5). Novobiyosine duyarlılığıyla başka bir önemli koagülaz negatif stafilokok (KNS) türü olan *S. saprophyticus*'dan ayırt edilmektedir. Ülkemizde biyokimyasal veya nükleik asit test sistemleri olan API STAPH, Microscan POS ID, Vitek GPI, Crystal Gram pozitif tanı sistemleriyle KNS'lerin tür tanımlamaları yapılabilmektedir (Gülay 2012, pp. 148-149).



Şekil 2-4: *S. epidermidis*'in elektron mikroskobu görüntüsü



Şekil 2-5: *S. epidermidis*'in besiyerindeki görüntüsü

S. epidermidis, *S. aureus*'dan farklı olarak koagülaz enzimine sahip değildir ve sınırlı sayıda ekzotoksin ve parçalayıcı ekzoenzimleri vardır. Bu nedenle *S. epidermidis* enfeksiyonları daha az şiddetli ve daha uzun sürelidir. *S. epidermidis*'in, elastaz aktivitesi olan bir metalloproteaz, deri kolonizasyonunda rol oynayan lipaz, serum albumin, fibronektin, fibrinojen, IgM ve salgısal IgA'yı parçalayabilen bir sistin proteaz, epiderminin işlenmesinde görev alan bir serin proteaz ve agr gen lokusundaki hld geni tarafından kodlanan d hemolizin enzimlerini sentezlediği bilinmektedir. *S. epidermidis* ayrıca deri kolonizasyonunda rol oynayan ve *Bacillus subtilis* gibi çeşitli Gram pozitif bakteriler tarafından da üretebilen bakteriyosinler olan lantibiyotiklere sahiptir. Lantibiyotik üretiminden sorumlu genler genellikle plazmidler üzerinde bulunmaktadır. *S. epidermidis* konağa yerleşip çoğalarak enfeksiyon oluşturabilmek için demire ihtiyaç duymaktadır. Demiri transferrinden nasıl aldıkları bilinmemekle birlikte iki mekanizma söz konusu olup bunlardan ilki sideroforların sentezi ve salınımı, ikincisi ise transferrinin bakteri yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak demir alımını gerçekleştirmesidir (Gülay 2012 pp.158-159). *S. epidermidis*'in enfeksiyonlara neden olan ana virülans mekanizması biyofilm oluşumudur ve sahip olduğu polisakkarit yapısındaki kapsülleri prostetik materyallere (protez) aderansı sağlamaktadır.

Stafilokoklardaki biyofilm oluşumu iki aşamada tanımlanmıştır:

1) Yüzeye tutunma, hücre-hücre adezyonu ve birikimi: *S. epidermidis*'in tutunmasını etkileyen en önemli faktör otolizin AtlE'dir. Bu protein bir amidaz ve bir N-asetilglukozamidaz olmak üzere iki enzimatik kısımdan oluşmaktadır. Başka bir çalışmada *S. aureus*'un deterjana benzer peptid delta-toksininin yüzeye tutunmasını azalttığı bildirilmiştir. Çok benzer bir peptid *S. epidermidis* tarafından da üretilmektedir.

2) Biyofilm oluşumunun ikinci evresi için iki polisakkarit molekülünden oluşan interselüler adezin (PIA) gereklidir. PIA, ica gen lokusu tarafından üretilen β -1,6 glukozid bağlarıyla bağlanmış kısmen deasetilasyona uğramış N-asetilglukozamin kalıntılarının dallanmamış homopolimeridir. Ayrıca ica gen lokusundaki bir insersiyon sekans elemanının tersinir insersiyonunun *S. epidermidis*'deki biyofilm oluşumunu durdurduğu bilinmektedir (Ziebuhr ve ark. 1999). Ayrıca PIA'nın hücre yüzeyine tutunmasında rol oynayan çeşitli proteinler de mevcuttur. Bunlardan bir tanesi olan Accumulation Associated Protein (AAP) biyofilm oluşumunda önemli role sahiptir (Gülay 2012 p. 157).

2.2. Biyofilmle ilgili genel bilgiler

Biyofilmler; canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polisakkarit bir matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk veya değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak da tanımlanabilir (Costerton 2015 pp.4-19).

Mikroorganizmaları, nem, ısı ve pH değişiklikleri, ozmotik basınç, su kaybı gibi çevresel koşullardaki değişimlerden, ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalmanın doğuracağı zararlardan ve antimikrobiyal maddelerin toksik etkilerinden koruyan biyofilmler ayrıca besinlerin depolanmasını ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadırlar. Mikroorganizmaların kümeler halinde ekzopolisakkarit (EPS) matriks içinde bulunmaları, konak hücreleri tarafından fagosite edilmelerini güçleştirmekte ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin mikroorganizmalara ulaşmaları da engellenmektedir (Purejdov-Gage ve Stoodley 2015 pp.160-173).

Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez, kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabildikleri gibi endüstriyel ve evsel su sistemlerinde bulunan ısı değıştiricilerde, su borularında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım sistemlerinde de bulunmakta ve biofouling olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve çürümelere yol açmaktadırlar (Donlan 2002)

Biyofilmin kompleks yapısı sayesinde mikroorganizmalar konağın immün yanıtından, fajlardan ve protozoonlardan korunmaktadır. Biyofilmler ayrıca bakterilerin çoğalması ve genetik materyallerinin transferine izin veren ideal bir ekolojik niştir. Bu bağlamda biyofilmler, genetik materyalin kazanılmasına veya plazmid, transpozonlar ve integronlar aracılığıyla bakteri hücreleri arasında yatay gen transferine kolaylık sağlamakta, bu da konağın daha fazla antibiyotik direnciyle karşılaşmasına yol açmaktadır.

2.2.1. Biyofilmin yapısı

Biyofilmin kuru kütesinin yaklaşık %50- 90'ını EPS oluşturmaktadır. Matriks içerisindeki diğer bileşenler; %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid ve fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik

özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine ve genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir.

EPS, viskoelastik özellik gösterirken, protein, Ca^{+2} iyonları ve polisakkaritler ile biyofilmin yapısı daha da sağlamlaştırılabilen; hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilmektedir. Bu enzimler tarafından oluşturulan düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünleri, biyofilimde tutunan mikroorganizmaların metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadırlar (Hussain ve ark., 1993).

Gram pozitif bakterilerin biyofilmleri genellikle DNA, proteinler, polisakkaritler ve teikoik asitleri de içeren polimer maddelerden yapılmış matrikslerin içerisine gömülü topluluklarından oluşmaktadır (Crampton ve Götz 2015 pp. 64-84). Biyofilmin yapısı saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgü olmakla birlikte heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranına, farklı türlerin sayısı ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilmlerde su ve besinlerin dağıtıldığı kılcal damar su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de üstünde bulunmakta, besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla su yardımıyla veya pasif difüzyonla sağlanabilmektedir.

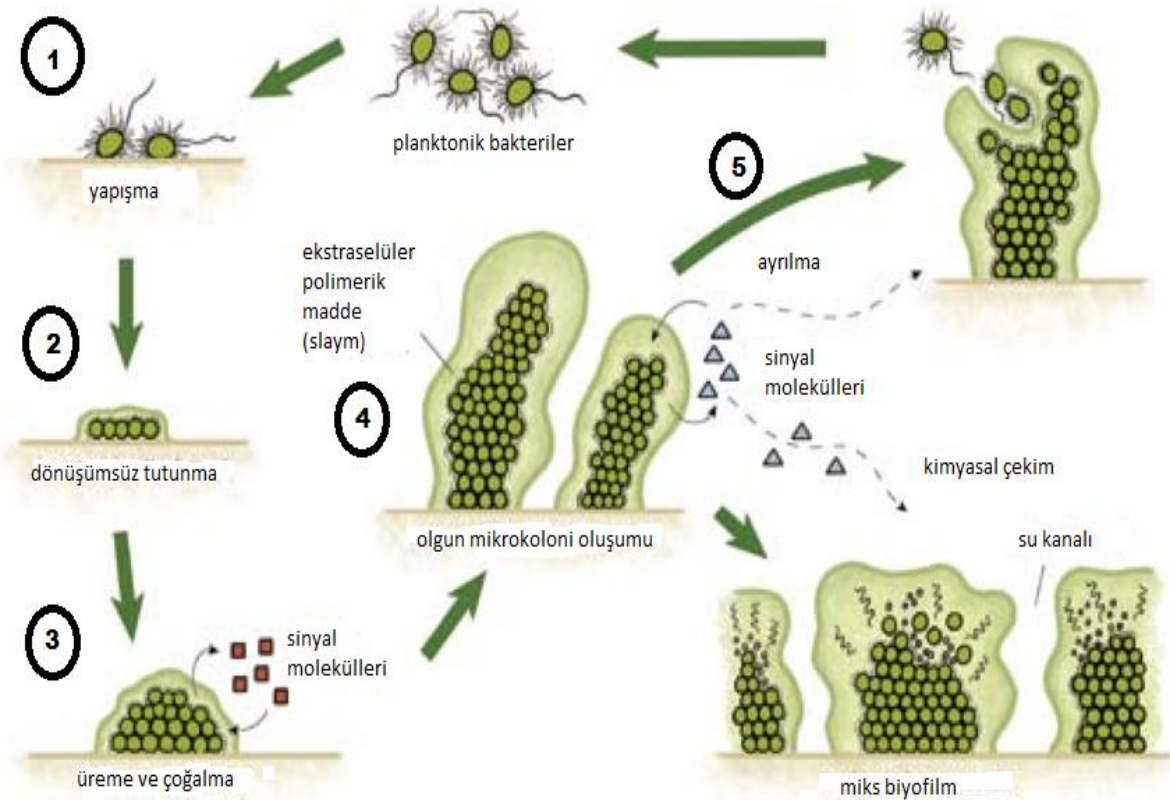
2.2.2. Biyofilm oluşum süreci

Biyofilmler, yaklaşık 3,2 milyar yıl öncesine kadar bilinen ve serbest yaşayan hücrelerden ziyade daha kompleks bir süreç olan planktonik ve biyofilm fenotiplerinin birlikte evrimleştiği bir süreç olarak tanımlanmıştır. Biyofilm oluşum süreci sırasıyla Şekil 2-6'de gösterildiği gibi mikroorganizmaların canlı veya cansız bir yüzeye yapışması, dönüşümsüz tutunması, mikroorganizmaların üremesi ve çoğalması, QS sinyal moleküllerinin sentezi, EPS veya slaym tabakasıyla beraber olgun mikrokolonilerin oluşumu ve QS sinyal moleküllerinin salınmasını takiben planktonik hücrelerin biyofilmden ayrılması şeklindedir (Harrison ve ark., 2005).

Bu sürecin ilk aşaması olan yapışma, çevreden gelen ipuçlarına rağmen geri dönüşlüdür. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan EPS bakteri hücrelerinin yüzeye tutunmasını sağlar. EPS üretimi mikroorganizmanın dönüşümsüz olarak yüzeye tutunması için gereklidir. Adezyonu sağlayan moleküllerin devreye girmesi yapışmayı daha inatçı hale getirmekte ve geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşmektedir. Hücreler bölünmeye başladıktan

sonra komşu bakterilerden gelen sinyaller ile fenotipte değişikliklere ve yüzeylerindeki diğer protein moleküllerinin algılanmasına yol açarak bakteriler arası etkileşimi sağlamaktadır.

Çevrenin daha fazla algılanması EPS'nin salgılanmasını arttırmaktadır. Yapışkan matriksin içerdiği polisakaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipitler gibi bileşenler, biyofilmdeki üç boyutlu yapıyı sağlamakta, bakteri ve yüzey arasındaki adezyonun artması da olgun biyofilmin mimari oluşumuna destek olmaktadır. Bu aşamada hücreler arası iletişim, oksijen ve besinlerin içeriye doğru dağılımı ve dışarı verilen sinyaller ile birlikte, topluluk içinde sinerjiye yol açmaktadır. Biyofilm içindeki hücrelerin heterojen dağılımı, kısmen dispersinler tarafından düzenlenmektedir. Bu reaktifler, bakteriler arası etkileşimleri bozan, su kanalları üreten, yüzey aktif maddeler veya enzimler olarak işlev görmektedir ve hücrelerin biyofilm kütlesinden pasif olarak dispersiyonuna yol açmaktadır. Bu döngü genellikle gelişimsel bir süreç olarak kabul edilmektedir (Harrison ve ark. 2005).



Şekil 2-6: Biyofilm oluşum süreci - Harrison ve ark., 2005'den

2.2.3. Quorum Sensing

Mikroorganizmaların çoğu, kendi popülasyon yoğunluğunu algılamak ve biyolojik aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri (QS moleküllerini) kullanmaktadırlar. Bakteriler çoğalırken salınan QS moleküllerinin konsantrasyonu artmakta ve belli bir seviyeye ulaştığında birçok genin ekspresyonunun başlamasını tetiklemektedir. Bu genler adezinleri, ekzopolisakkaritleri ve virülans faktörlerini kodlayan genlerdir.

Quorum Sensing'in mikroorganizmalardaki gelişim, spor oluşumu, antibiyotik üretimi, virülans faktörü oluşumu, plazmit transferi, biyofilm oluşumu ve patojen bakteri enfeksiyonlarında diğer fiziksel olaylarla birlikte mikroorganizmanın beslenme değişimini düzenlediği tahmin edilmektedir. Tablo 2-2'de çeşitli QS moleküllerinin molekül yapıları, etki ettikleri mikroorganizmalar ve düzenledikleri fonksiyonlar gösterilmiştir.

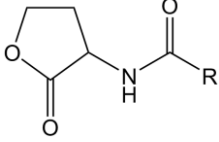
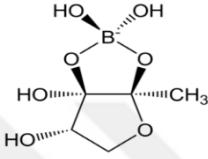
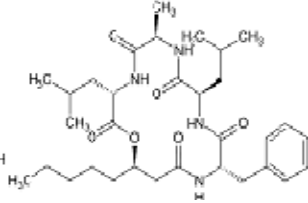
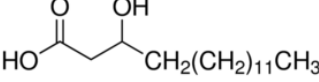
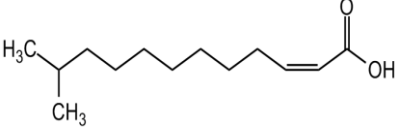
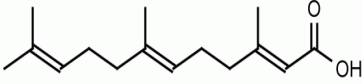
Bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizma kendiliğinden sinyal üretebilen ve Oto-Endükleyici [Autoinducer (AI)] adı verilen moleküllerden oluşur. Üretildikleri hücrenin metabolizmasını düzenledikleri için bu şekilde ifade edilirler. Bazı mikroorganizmalar birden fazla farklı QS sinyal molekülü kullanmaktadır.

QS, tür içi ve türler arası sinyal molekülleriyle iletişim şeklinde gerçekleşebilmektedir. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında oto indükleyici olarak N- açıl homoserin lakton (AHL, AHLs, açıl-HSL veya HSL), Gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptidler, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde ortak olarak oto-indükleyici-2 (AI-2) kullanılmaktadır (Irie ve Parsek 2008).

Örneğin *Esheria coli* ve *Salmonella enterica*'nın hücreden hücreye iletişiminin AI-2 sinyalleriyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sinyal moleküllerinin üstel gelişim süresince üretildiği ve bakteri membranına serbestçe geçebildiği bilinmektedir.

Bir başka deneysel çalışmada *S. aureus*'un QS mekanizmasının bloke edilmesi sonucunda düşük miktarlarda ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırırken, yüksek miktarda bulunduğu ortamda biyofilm oluşumunu bırakarak konak hücreyi işgal ettiği bildirilmiştir.

Tablo 2-1: QS sinyal moleküllerinin yapıları ve düzenledikleri fonksiyonlar-Zhang ve Dong 2004

Sinyal ve yapısı	Örnek mikroorganizma	Düzenlenen fonksiyon
N-açil homoserine lakton 	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Plazmid transferi Virülans ve antibiyotikler Virülans ve biyofilm Virülans
Furanosilborat (AI-2) 	<i>Vibrio harveyi</i>	Virülans
Siklik tiyol lakton (AIP-II) 	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virülans
Hidroksi-palmitik asit Metil esteri 	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Virülans
Metil dodekanoik asit (DSF) 	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virülans
Farnesoik asit 	<i>Candida albicans</i>	Dimorfik dönüşüm ve virülans

Gram negatif bakteriler arasında N-açıl-L-homoserin laktona bağlı QS sistemleri özellikle çok yaygındır. Bu sistemler bakterilerin birbirleriyle, çevreleriyle ve özellikle yüksek organizmalarla olan patojenik ve simbiyotik etkileşimleri kapsayan bir çok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli olan fenotiplerin koordineli ekspresyonunda kullanılmaktadır. Bu fenotipler; mürekkepbalığı ve diğer balıklarda özelleşmiş ışık organlarındaki biyoluminisens ekspresyonu, yüzey kolonizasyonu, biyofilm oluşumu, virülans faktörlerinin ve ökaryot konakların enfeksiyonu sırasında hidrolitik enzimlerin üretimini kapsamaktadır.

2.2.3.1. QS'in bazı bakteri türlerinin biyofilm gelişimindeki rolü

Yeryüzünde yaşayan mikroorganizmaların yaklaşık %99'unun biyofilmlerde yaşadıkları tahmin edilmektedir. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan QS sistemi mikroorganizmaların, ürettikleri sinyal moleküllerinin miktarını ölçebilmesine, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmesine ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkan sağlamaktadır. Mikrobiyal biyofilm oluşumu mikroorganizmaların katı maddelerin yüzeylerine adsorbsiyonuyla (tutunma) başlayan, büyüme ve ekstrasellüler polisakkaritlerin sekresyonuyla devam eden kompleks bir süreçtir. Bu süreçte QS sinyal moleküllerinin rolü büyüktür.

Bir bakterinin bir yüzeye veya tabana tutunması biyofilm oluşumundaki ilk basamaktır. Çeşitli mikrobiyal faktörlere ek olarak tutunulan yüzeyin doğası da tutunmayı etkilemektedir. Örneğin, *S. aureus*'un siklik peptid ilişkili eklenti geni regülatörü olan (agr) QS sistemi, konak matriksi ile bağlantıyı sağlayan çeşitli yüzey adezinlerini uzaklaştırmaktadır (represe eder). Bunlar fibrinojen ve fibronektin bağlayan proteinlerdir. Agr mutantları belli koşullar altında hem biyolojik hem de abiyotik yüzeylere wild tip suşlardan daha iyi yapışmaktadırlar. Bu iletişim sistemlerinin ayrıntılı olarak bilinmesi, istenmeyen mikrobiyal aktivitelerin kontrol edilmesinde tamamen yeni bir perspektif açmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda açıl homoserin lakton (AHL) dolaylı gen ekspresyonunun önlenmesiyle bakterilerin yüzey kolonizasyonunun da engellendiği ve fırsatçı patojen bakterilerin virülansının azaltıldığı gösterilmiştir. Sinyal molekülleri özelleşmiş hücreler tarafından salınmakta olup bu hücreler de yakın çevredeki hücrelerin aktivitelerini değiştirerek toplu aktivitelerin düzenlenmesini sağlarlar. Diğer bir örnek ise bir gastrointestinal sistem patojeni olan *Helicobacter pylori*'dir. *H. pylori* tutunmada rol oynayan "Lux S" homologuna sahiptir. Bir çalışmada bir "Lux S" mutantının yüzeye wild tip suştan

iki kat daha iyi yapıştığı gözlenmiştir. Buna karşın yine bir patojen bakteri olan *Salmonella enterica* serotip *typhimurium*'un Lux S geninin insan safra taşı üzerinde oluşan biyofilm için gerekli olduğu gösterilmiştir (Hentzer ve ark. 2015 pp. 118-140).

Bir biyofilm topluluğunun olgunlaşması yapışmayla aynı doğrultuda ve orantıda gerçekleşir. Olgun bir biyofilmin yapısı düzden, homojen biyofilmlere, yüksek yapılı biyofilmlere ve ekstraselüler matriksde hapsolmuş hücrelerin oluşturduğu kulelere kadar değişmektedir (Hentzer ve ark. 2015, pp. 118-140). Biyofilmin yapısı kimyasal gradientlerin dağılımını ve biyofilmdeki bakterilerin antimikrobiyal tolerans profillerini etkilemekte, yapının kendisi ise hareket, EPS ve ramnolipit üretimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin, açıl-HSL ilişkili QS, Gram negatif bir bakteri olan *Serratia liquefaciens* biyofilminin olgunlaşmasını ve bakterideki yayılma hareketini düzenlemektedir. Wild-tip *S. liquefaciens* biyofilmleri heterojen, bir çok hücre yığınınından ve uzun hücre filamanlarından oluşmaktadır. Açıl-HSL sentetaz (swr I) genindeki bir mutasyon ince, agregat ve filamanlardan yoksun bir biyofilm oluşumuna yol açmıştır.

Diğer bir örnek olarak *Burkholderia cepacia* H111'in cepI/R QS sistemi de biyofilm olgunlaşmasını kontrol etmektedir. Yapılan bir çalışmada, cepI veya cepR mutasyonuna uğramış suşların mikrokoloni oluşumu aşamasında durdurulmuş biyofilmler oluşturduğunu, wild-tip suşların ise daha baskın ve tutunma yüzeyini kaplayan biyofilmler oluşturdukları bildirilmiştir. Benzer şekilde QS ile regüle edilen bsmA ve bsmB genleri biyofilm gelişiminde rol oynamaktadır. *Aeromonas hydrophila*'nın ahyR/I açıl-HSL QS sisteminin de biyofilm olgunlaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ahy I mutasyonuna uğramış bir suşun biyofilmi wild tip suşa göre yapısal olarak daha az farklılaşmıştır. *Streptococcus mutans*'ın LuxS-tip QS sistemi de biyofilm gelişimde rol oynamaktadır. Lux S'deki bir mutasyon daha az biyokütle içeren bir biyofilmle sonuçlanmıştır. Olgun biyofilmin yapısı mutant suş için ise farklıdır. Hidroksiapatit diskinde gelişmiş bir LuxS mutantının biyofilmi wild tip suşun biyofilmine kıyasla dağınık, seyrek ve pürüzlüdür. Wild tip suşun biyofilminin görünümü ise düzgün ve birleşiktir. İki komponent düzenleyici sistem, smu486 ve smu487 de QS-ilişkili biyofilm fenotipiyle ilgili olarak tanımlanmıştır (Hentzer ve ark. 2015, pp. 118-140).

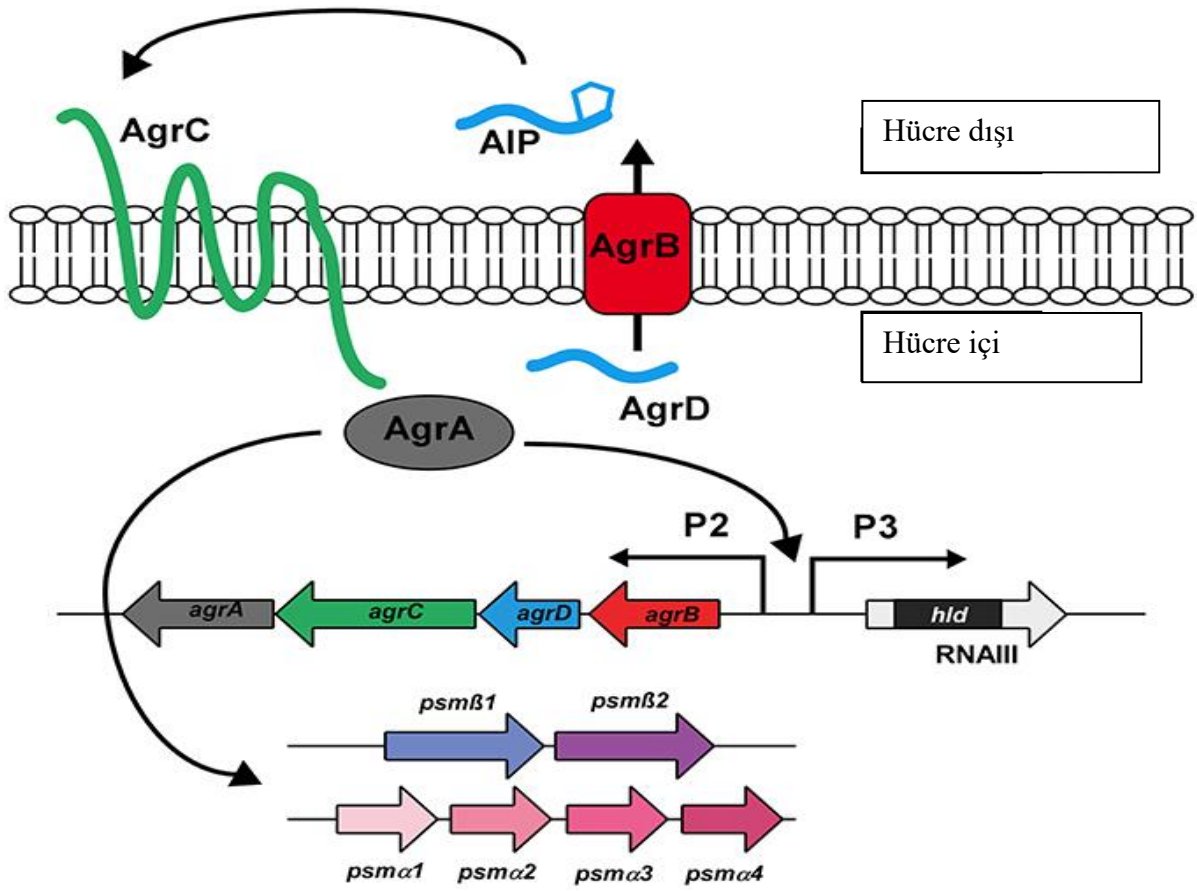
2.2.3.2. Stafilokoklardaki Quorum Sensing kontrolü: agr sistemi ve fonksiyonu

Agr sistemi, artan hücre yoğunluğuna yanıt olarak gen ekspresyonunu kontrol eden otomatik düzenleyici bir sistemdir. Stafilokokların gen regülasyonuna da yardımcı olan ve bu

QS sistemi, sinyal transdüksiyonu için gerekli olan AgrA ve AgrC, öncü protein AgrD ve sonradan dönüştürölüp modifiye olan öncü (feromon) peptidlerin olgunlaşması ve dışarı atılmasından sorumlu olan AgrB adında iki bileşenli bir sistemden oluşmaktadır (Novick 2003). Feromon peptidi 7-9 aminoasit uzunluğunda olmakla beraber, merkezde konumlanmış sistein kısmı ve C-terminal karboksi grubu arasında bağlantı oluşturan tiyolakton zincirine sahiptir. Tiyolakton zincir yapısı, biyolojik aktivite açısından gereklidir (Otto ve ark. 1998; Mayville ve ark. 1999). Feromon, histidin kinaz AgrC'ye henüz tam anlaşılamamış bir biçimde bağlanmıştır. Sadece tiyolakton yapısı korunmuş, spesifik bir feromon aminoasit sekansı tarafından karakterize edilen çeşitli agr alt grupları bulunmaktadır. Bazı spesifik *S. aureus* ve *S. epidermidis* agr alt grupları genellikle çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Jarraud ve ark. 2000; Carmody ve ark. 2004). Önemli biçimde Stafilokokların agr feromonları, Gram negatif bakterilerin AHL'lerinin tersine, çapraz inhibisyon fenomeni (kendiliğinden oluşan feromonlar) gösterirken, kendiliğinden oluşmayan feromonlar QS yanıtını inhibe etmektedir (Ji ve ark. 1997; Otto ve ark. 2001).

Agr sisteminin efektör molekülü olan, RNAIII olarak adlandırılan regülatör RNA'nın sentezi, agr aktivasyonuna bağlı olarak ve agr sisteminin P3 promotörü ile yürütölürken Agr protein bileşinlerini kodlayan RNAII'nin sentezi ise P2 promotörü tarafından yürütölmemektedir. RNA III'ün hedef genlerinin transkripsiyonunu nasıl düzenlediğı henüz bilinmemektedir (Novick ve ark. 1995). Agr sisteminin yapısı ve fonksiyonu Şekil 2-7'de gösterilmiştir (Le ve ark. 2014).

S. aureus'un şu zamana kadar bilinen tüm agresif virölans faktörlerinin agr tarafından up-regüle edilmesi, agr'yi en iyi tanınan virölans regülatörü yapmaktadır (Cheung ve ark., 1994). Enterotoksin A ve K nadiren rastlanan istisnalardır. Dolayısıyla akut virölansın hayvan enfeksiyonu modellerinde örneğın subkutanöz abse oluşumu ve endokarditte Agr'nin *S. aureus* virölansında gerekli olduğı gösterilmiştir. Buna karşılık, MSCRAMM gibi kolonizasyon faktörleri de *S. aureus*'daki agr tarafından ters biçimde düzenlenmektedir. Bir enfeksiyonun başlamasında düşük agr aktivitesi, kolonizasyon faktörlerinin ekspresyonuna izin vermektedir. İlerleyen enfeksiyon evrelerinde yüksek agr aktivitesi sonrasında agresif virölans faktörlerinin ve parçalanabilir ekzoenzimlerin ekspresyonuna yol açmakta bu da bakterinin konakçı dokudan besin sağlamasına ve abseden kurtulup diğeri enfeksiyon bölgelerine sıçramasına olanak sağlamaktadır (Otto 2004).



Şekil 2-7: Stafiloklardaki Agr QS sistemi - Le ve ark. 2014'den

Translasyon sonrası değiştirilmiş ve AgrB yoluyla dışarı atılan hücre dışı sinyali (AgrD) kodlayan yapısal genden oluşmaktadır. Belirli bir eşik konsantrasyonuna ulaşıldığında, AgrD AIP, histidin kinaz AgrC'nin oto-fosforilasyonunu tetikler, bu da DNA bağlama tepkisini düzenleyen AgrA'nın fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açmaktadır. AgrA bağlanması AgrP2, AgrP3, $psm\alpha$ ve $psm\beta$ promoterlerinden transkripsiyonu aktive etmektedir. PSM'ler dışındaki Agr hedefleri, hld (δ -toksin) genini çevreleyen düzenleyici RNA olan RNAIII tarafından düzenlenmektedir.

2.2.4. Biyofilm enfeksiyonları

Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm persistan doku ve yabancı madde enfeksiyonlarına yol açtığı gibi antimikrobiyal ajanlarla yapılan tedavilere karşı da direnç göstermektedirler. İnsanda bakteriyel enfeksiyonların %80'i biyofilmle ilişkilidir, bu tür enfeksiyonlara çoğunlukla *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve Enterobakterilerden *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalar neden olmaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarının doğru teşhisi çoğunlukla zor olduğu için doğru veya uygun tedavi seçimini engellemektedir. Biyofilm enfeksiyonları hastanın ölümüne veya önemli sağlık giderlerine yol açabildiği için bu enfeksiyonların tedavisinde yeni stratejilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Römling ve Balsalobre 2012)

Biyofilm oluşumu, konakta potansiyel patojenlerin kolonizasyonunu kolaylaştırmakta ve bu patojenlerin çevreye yayılmasını ve ortamda kalıcılığını sağlamaktadır. Ayrıca kronik yara enfeksiyonları, reküran idrar yolu enfeksiyonları, endokardit ve kistik fibrözle ilişkili akciğer enfeksiyonları gibi persistan doku enfeksiyonlarında rol oynayabilmektedirler.

Biyofilm oluşturan bakteriler, Crohn hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıklarla da ilişkili olabilmektedir (Claret ve ark. 2007) Mikroorganizmaların dokuya tutunması (aderansı) akut enfeksiyon sürecinin bir parçası olduğu gibi, biyofilm oluşumunun enfeksiyondaki büyüktür. Biyofilm oluşumu kateterler, stentler, ortopedik implantlar, kontakt lensler ve implante edilebilen elektronik aletlerde de yaygın olarak görülmektedir.

Biyofilm enfeksiyonları düşük kaliteli immun yanıtla birlikte kronikleşebilmekte ve hastanın ölümüne yol açabilmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarının sıklığı, antibiyotik tedavisine karşı direnci ve enfeksiyonun tedavisi için enfekte vücut yabancı cisminin çıkarılması gerekliliği önemli sağlık giderlerine neden olmaktadır.

2.2.5. Biyofilmlerde antibiyotik direnci

İn vitro ve hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda antibiyotiklerin planktonik bakteri hücrelerine, biyofilm içinde büyüyen bakteri hücrelerinden daha az etkili oldukları gösterilmiştir. Açıkça görülen bu direnç, bakterilerin metabolik durumu (yavaş üreme, küçük koloni varyantları ve persistan hücrelerin yoğunluğu), çevrenin heterojenitesi (biyofilmin pH'sı, içindeki besin veya oksijen miktarı) veya antibiyotik girişinin engellenmesi (bağlanma, inaktivasyon, veya zayıf difüzyon) ile ilişkili faktörlerin bir araya gelmesiyle gerçekleşmektedir. Ancak bu faktörler arasındaki sebep ve sonuç ilişkisinin doğrudan

deneysel olarak kanıtı ve antibiyotiklerin etkinliğinin eksikliği her zaman iyi bir şekilde raporlanmamaktadır.

Biyofilmlerdeki antibiyotik direnci ile ilgili yapılan bir çalışmada *S. aureus* ve *S. epidermidis*'e ait slaym tabakasının vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin etkisini azalttığı bulunmuştur. Trimetoprim/sulfametoksazole, doksisisiklin, gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin, isepamisin, ofloksasin, siprofloksasin ve daptomisin kloksasilin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, sefpirome, eritromisin, roksitromisin, klindamisin, fusidik asit gibi antibiyotiklerin ise *S. epidermidis* eksopolisakkarit matriksi tarafından orta derecede etkilendikleri bildirilmiştir. Başka çalışmalarda ise *S. epidermidis* glikokaliksinin pefloksasisin duyarlılığını azalttığı, daptomisin, linezolid ve quinupristin/dalfopristin aktivitelerini orta derecede etkilediği, flukloksasilin, sefazolin, klindamisin rifampisin, fleroksasin ve ranbezolid'in aktivitelerini ise değiştirmedeği ileri sürülmüştür (Farber ve ark. 1990; Souli ve Giamarellou 1998; Konig ve ark. 2001)

Bir çok antibiyotiğin subinhibitör konsantrasyonlarının *S. epidermidis* biyofilmlerindeki polisakkarit interselüler adezinin (PIA) ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Ancak çoğu çalışmada bakteri biyofilmlerindeki slaym dışındaki faktörlerin antibiyotiklerin *S. aureus* biyofilmlerine karşı etkisinde rol oynamadığı bildirilmiştir. Belirli miktarda çözünmüş antibiyotiğin, floresanla işaretlenmiş daptomisinde de olduğu gibi *S. epidermidis* biyofilmlerine difüzyonla penetre olduğu gösterilmiştir. PIA'nın vankomisinin, *S. epidermidis* biyofilminden difüzyonunda etkili olmadığı bulunmuştur (Rachid ve ark. 2000; Stewart ve ark. 2009)

Yapılan bir çalışmada oksasilin, sefotaksim ve vankomisinin *S. aureus* ve *S. epidermidis* biyofilmleri tarafından penetrasyonunun önemli ölçüde azaltıldığı ancak olgun biyofilmlerin amikasin ve siprofloksasinin penetrasyonunu etkilemediği gösterilmiştir (Singh ve ark., 2010).

2.2.6. Biyofilm kontrolü

Biyofilm kontrolü; biyofilm oluşumun önlenmesi, biyofilmlerin parçalanması veya ortadan kaldırılması şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Biyofilm oluşumunun önlenmesi amacıyla, adezyonun önlenmesi (Örn: materyallerin uygulanma şekli, antibiyotik veya antikoagülan kullanımı), EPS oluşumunu engelleyen ksilitol, galyum, demir şelasyon ajanı laktoferrin kullanımı, bakteriyel farklılaşmanın ve toplanmalarının engellenmesi (Quorum

sensing antagonistleri ya da laktoferrin kullanımı), QS inhibisyonu (Gram negatif bakterilerde QS'den sorumlu ana molekül N-açıl homoserin lakton (AHL) analogları/ Gram pozitiflerde RIP denilen sentetik peptid *S.aureus*'un QS sinyallerini algılamasının engellenmesi), kataterlerin antibiyotik veya biyositlerle kaplanması (Örn: Rifampin ve minosiklin/ sefazolin, gümüş sülfadiazin ve gümüş emdirme), enzimle kaplanması (Örn: Peroksidaz titanyum kaplamalarla *C.albicans*'ın biyofilm oluşumunun kısıtlanması) gibi yöntemlere başvurulabilmektedir (Shadia ve Aeron 2014)

Biyofilmin parçalanması veya ortadan kaldırılması amacıyla matriksin çeşitli enzimler aracılığıyla ortadan kaldırılması (Örn: DNaz I, dispersin B, α -amilaz, aljinat liyaz), endojen enzim üretimi ile EPS'yi parçalanabilmesi (örneğin Dispersin D, aljinaz, proteaz, depolimeraz, glikosidaz gibi enzimler) söz konusudur (Thallinger ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'ın ürettiği dispersin B enziminin *S. epidermidis* biyofilmini parçaladığı ve yüzeylerin öncelikle bu enzimle kaplanmasının *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumunu önleyebileceği bildirilmiştir (Kaplan ve ark., 2004). Son zamanlarda yeni bir antibiyofilm stratejisi olarak ortaya çıkan bakteriyofajla kodlanmış peptidoglikan hidrolazı- lizinler gelecek vaad etmektedirler. Saflaştırılmış proteinler olan lizinler bir çok Gram pozitif patojen bakterilerin planktonik formlarına karşı etkili bir bakteriyolitik aktivite sergilemektedirler. Yapılan çalışmalarda *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes*'in biyofilmlerine karşı artan bir antibiyofilm aktiviteden söz edilmektedir. Biyofilmlerin hızlı bir şekilde eradike edilmesinde ve bakterilerin tamamının öldürülmesinde lizinlerin kullanılması antibiyofilm ilaç geliştirilmesi alanında yeni bir fırsat ortaya koymaktadır. Önceki çalışmalarda *S.aureus*'un yol açtığı bakteriyemi ve endokardit tedavisi için klinik araştırmada olan etkili antistafilokokal lizin CF-301'in, MRSA BAA-42 suşu tarafından oluşturulan olgun biyofilmi parçalama yeteneği gösterilmiştir. CF-301'in bir çok metisiline duyarlı ve dirençli *S. aureus* izolatına, koagülaz negatif Stafilokoklara (*S. pyogenes*, ve *Streptococcus agalactiae*) ait olgun biyofilmleri parçalayabildiği de bildirilmiştir. CF-301'in kateterler de dahil bir çok yüzeyde oluşan biyofilm kütesini eradike edebilme ve biyofilmdeki bakterileri öldürebilme yeteneği gösterilmiştir. Sonrasında ayrıca polimikrobiyal biyofilmlere, insan kanında veya eklem sıvısında oluşan biyofilmlere ve hem planktonik kültürlerle hem de *S. aureus*'un persistan formları için zenginleştirilmiş biyofilmlere karşı da aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Son

olarak CF-301 ve diğer bir hücre duvarı hidrolazı olan lizostafin arasında iyi bir sinerjist etki tanımlanmıştır (Schuch ve ark. 2017).

2.3. Difüze olan Sinyal Faktörü (DSF) ailesi QS sinyal molekülleri

DSF ailesinin hücre-hücre sinyalleri, farklı zincir uzunluğu ve dallanma özelliğine sahip cis-2-doymamış yağ asitleridir. DSF sinyal molekülleri biyofilm oluşumu, antibiyotik toleransı ve virülans faktörlerinin üretimi gibi fonksiyonları düzenlemek üzere çeşitli bitki ve insan patojen bakterilerinde tanımlanmıştır. Tablo 2-2’de çeşitli bakterilerde bulunan DSF ailesi sinyalleri tarafından düzenlenen virülansla ilişkili olan ve olmayan çeşitli faktörler gösterilmiştir. DSF sinyalleşme sistemine müdahale ile bakteriyel hastalıkların kontrolü için yeni fırsatlar sağlanabilmektedir (Dow 2016).

Bir çok mikroorganizma, popülasyon yoğunluğu veya nişler gibi çevrelerinin durumlarına tepki göstererek biyolojik faaliyetlerini düzenlemek için çoğunlukla hücre-hücre sinyallerini kullanmaktadır. Bu tür bir iletişim, yayılabilir sinyal moleküllerinin sentezine ve serbest kalmasına, farklı reseptörler tarafından algılanmalarına, bakteriyel gen ifadesi ve davranışında değişikliklere yol açan sinyal iletimine bağlıdır. Hücre-hücre sinyalleri, biyofilmlerin oluşumu ve virülans faktörlerinin sentezi gibi çeşitli süreçleri düzenlemektedir. Biyofilm içindeki bakteriler genellikle antibiyotiklere karşı planktonik formlarına göre daha toleranslıdır, dolayısıyla sinyalleşme sistemi ile müdahale edilmesi, virülansı azaltarak ve mevcut antibiyotik tedavilerinin etkinliğini artırarak hastalıkların kontrolünü sağlayabilmektedir. Bu tür stratejilerin geliştirilmesi kısmen sinyal sentezi, algı ve transdüksiyonun moleküler mekanizmalarının ayrıntılı olarak bilinmesine bağlıdır.

Bakteriyel sinyal molekülleri çeşitli kimyasal sınıflara aittir (Deng ve ark. 2011; Ryan ve ark. 2015). Ailenin bilinen ilk üyesi, bitki patojeni *Xanthomonas campestris*’den elde edilen cis-11-metil-2-dodekanoik asittir (DSF olarak adlandırılmıştır) (Barber ve ark. 1997; Wang ve ark. 2004). Ailenin diğer üyeleri, *Burkholderia cenocepacia* (cis-2-dodekanoik asit; BDSF), *Xylella fastidiosa* (cis-2-tetradekanoik asit; XfDSF; cis-2-hekzadodekanoik asit; XfDSF2), *Xanthomonas oryzae* (cis-11 metildodeka-2,5-dienoik asit; CDSF) ve *Pseudomonas aeruginosa* (cis-2-dekanoik asit) (Boon ve ark. 2008; Beaulieu ve ark. 2013; Ionescu ve ark. 2016; He ve arkadaşları, 2010; Davies ve Marques, 2009). 2-pozisyonundaki cis doymamış çift bağ, DSF ailesi sinyallerinin imzası olarak kabul edilmekle birlikte aktivite için önemli bir yapısal özelliktir (Wang ve arkadaşları, 2004).

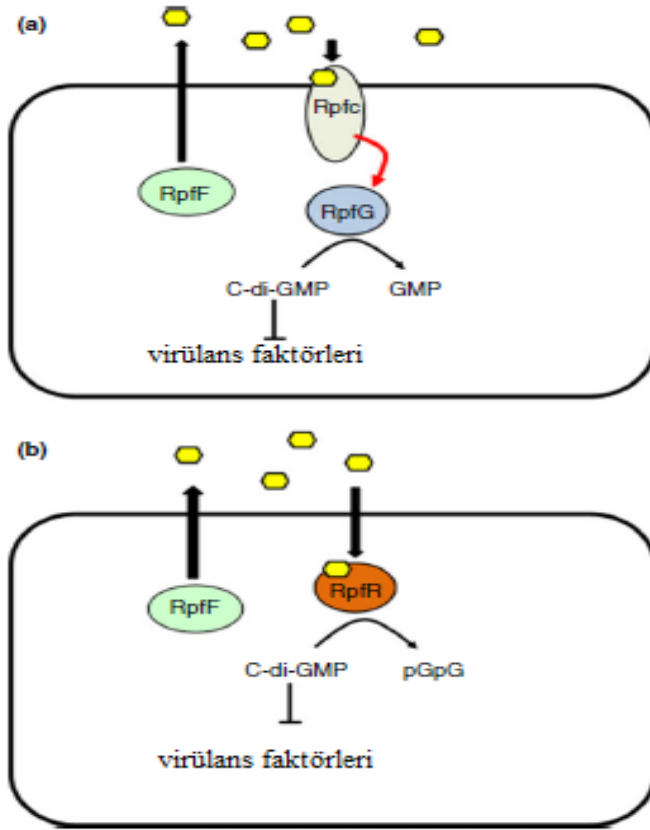
Denenen trans türevleri ise çok az veya hiç sinyal aktivitesine sahip değildir. Bununla birlikte, *P. aeruginosa* DSF veya BDSF sentezlemese de, bu molekülleri, değiştirilmiş biyofilm mimarisi gibi bakteriyel davranışların sonuçlarıyla birlikte algılayabilmektedir. Antibiyotik direncinin artması (Ryan ve ark. 2008), *Burkholderia cenocepacia* ve *P. aeruginosa*'nın N-açıl homoserin laktonlar ve alkil kinolonların aracılık ettiği ek QS sistemlerine sahip olduğunu ve bu farklı sistemler arasında düzenleyici bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Schmid ve ark. 2012; Udine ve ark. 2013).

DSF ailesinin ürettiği sinyaller, *Xanthomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. cenocepacia* ve *P. aeruginosa* (Ryan ve ark. 2015) gibi bir dizi bitki ve insan patojeni bakterinin virülansını olumlu yönde etkilemektedir. Aksine, *Xylella fastidiosa*'nın sinyal yetersizliği olan mutantlarının, bitkilere karşı gelişmiş virülansa sahip oldukları, ancak böcek vektörlerinde kolonizasyon kapasitesinin azalması ile enfekte olmamış bitkilere bulaşmalarının zorlaştığı bildirilmiştir.

DSF aile sinyalleri aynı zamanda türler arası ve alemler arası sinyalleşmede de rol oynamaktadır. Cis-2-dekanoik asit, DSF ailesi sinyalleri üretmeyen bir dizi Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde biyofilm oluşumunu indüklemekte ve ayrıca bir takım organizmalarda da antibiyotiklerin etkisini arttırmaktadır. BDSF, dimorfik mantarda maya-hif geçişini modüle edebilmekte (Boon ve ark. 2008) ve DSF bitkilerdeki savunmaya bağlı yanıtları tetikleyebilmektedir (Kakkar ve ark. 2015).

2.3.1. DSF sinyal iletiminin iki temel yolu

Xanthomonas spp'de bulunan rpf (for regulation of pathogenicity factors; patojenite faktörlerini düzenleyen) gen kümesi, DSF sinyalleşme sisteminin bileşenlerini kodlamaktadır (Ryan ve ark. 2015). DSF'nin sentezi tamamen enoil CoA hidrataz ile amino asit sekansı ile ilgili olan krotonaz süper ailesinin bir enzimi olan RpfF'ye bağımlıdır. RpfF'nin kendi promotörü olmasına rağmen, aynı zamanda uzun zincirli yağ açıl CoA ligazını kodlayan upstream (yukarı yönde) rpfB geni ile bir operonun parçası olarak da kopyalanmaktadır. DSF algılama ve sinyal iletimi, komşu bir operon tarafından kodlanan RspfC ve regülatör RpfG'den oluşan iki bileşenli bir sistemi içermektedir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: *Xanthomonas* ve *Burkholderia* türlerindeki (sırasıyla A ve B) DSF ailesi sinyallerini içeren iki temel sinyalleşme yolağı- Dow (2016)'dan.

Her iki durumda da DSF sinyal molekülleri bir RpfF homoloğu tarafından sentezlenmiştir. Sinyal transdüksiyonu ikincil haberci siklik di-GMP'nin dönüşümü ile bağlantılıdır. *Xanthomonas*'da (a) sinyal algısı ve iletimi, bir sensör kinaz olan RpfC ve bir HDGYP domain siklik di-GMP dosfodiesteraz olan iki bileşenli regülatör RpfG içermektedir. *Burkholderia*'daki (b) sinyal algılama, siklik di-GMP bozulmasında rol oynayan bir sitoplazmik GGDEF-EAL domaini proteini olan RpfR'yi içermektedir.

RpfC, bir transmembran duyusal girdi alanı, histidin kinaz, CheY-benzeri alıcı (REC) ve Hpt alanları ile kompleks bir duyusal kinazdır, oysa RpfG'nin alıcı alanı, bir siklik di-GMP fosfodiesteraz olan HD-GYP alanına bağlanmıştır.

DSF'nin RpfC tarafından algılanması, ikinci haberci olan siklik di-GMP'nin hücresel seviyesinde, muhtemelen oto-fosforilasyon ve daha sonra RpfG'ye fosfo-transferi yoluyla bu proteini, siklik di-GMP bozulması için aktive eden bir değişiklik ile bağlantılıdır. RpfC sadece DSF için bir sensör olarak değil aynı zamanda DSF biyosentezinin baskılanmasında da rol oynamaktadır (Slater ve ark. 2000). Bu sinyal sentezinin düzenlemesi için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar RpfC'nin rpfF ifadesi üzerindeki etkisi (An ve ark. 2013)

ve RpfC ile RpfF'nin fiziksel etkileşimi yoluyla sinyal sentezinin baskılanmasını içermektedir (He ve ark. 2006). Biyoinformatik analizler, rpfF-rpfC-rpfG'nin ana elementlerinin insan patojenleri olan *S. maltophilia*'da ve aynı zamanda *Thiobacillus* ve *Leptospirillum* türleri gibi ilgili olmayan bakterilerde bulunan bitki patojenleri olan *Xanthomonas* ve *Xylella* cinsinden bakterilerde yaygın olarak korunmuş olduğunu ortaya koymaktadır.

DSF ailesi sinyalleşme sisteminin ikinci temel yolu, ilk olarak *Burkholderia*'da tanımlanmıştır. *Burkholderia*'daki BDSF sentezi RpfF'nin bir homologuna bağlıdır (Boon ve ark. 2008). Ancak BDSF algısı PAS, GGDEF ve EAL bölgelerine sahip bir protein olan RpfR'ye bağlıdır (Deng ve ark. 2012). GGDEF ve EAL alanları, ikinci mesajcı siklik di-GMP'nin (Römling ve ark. 2013) sentezinde ve bozulmasında rol oynamaktadır. İn vitro ortamda RpfR, BDSF'nin N-terminal PAS alanına bağlanarak modüle edilen siklik di-GMP fosfodiesteraz aktivitesi sergilemektedir (Deng ve ark. 2012). RpfF ve rpfR genleri bitişik ve yakın bir şekilde kopyalanmakta ve sadece *Burkholderia* türlerinde değil, aynı zamanda *Achromobacter* gibi ilgili cinslerden ve *Yersinia*, *Serratia*, *Cronobacter* ve *Enterobacter*'i de içeren Enterobacteriaceae familyası bakterilerinde de büyük ölçüde korunmaktadır. Buna göre, DSF ailesi sinyallerinin üretiminin *Burkholderia* spp'de yaygın olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, RffR/RpfF'nin biyofilm oluşumu, koloni morfolojisi ve Zebrafish embriyolarının *Cronobacter turdiumis* virulansı için bir rolü olduğu da yakın zamanda açıklanmıştır (Suppinger ve ark. 2016b).

Başka DSF ailesi sinyal transdüksiyon yolları da *Xanthomonas* ve *Burkholderia*'da tanımlanmıştır (Ryan ve ark. 2015). Xcc'nin çözünebilir histidin kinaz RpfS'si, DSF-düzenlenmiş genlerinin bir alt kümesinin ifadesini etkilemek için DSF'yi N-terminali PAS_4 alanıyla bağlar. Benzer şekilde, *B. cenocepacia*'daki karmaşık sensör kinaz BCAM0227, Xcc'nin RpfC'sinin bir homologu değildir ve BDSF'ye bağlı faktörlerin bir alt kümesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Biyoinformatik analizler, bu sensörlerin RpfS'nin *Xanthomonas* türlerinde tam olarak korunmadığını ve RpfR'nin aksine BCAM0227'nin *B. cenocepacia* ile sınırlı olduğu için yardımcı parça olarak kabul edilmesi gerektiğini düşündürmektedir (Ryan ve ark. 2015).

İki temel yolun her ikisi de bir DSF ailesi sinyalinin di-GMP döngüsüne, farklı mekanizmalarla bağlanmasını sağlamaktadır. Siklik di-GMP, hücre içindeki transkripsiyon, transkripsiyon sonrası ve post-translasyonel seviyelerdeki düzenleyici etkisiyle bilinir ve

çeşitli organizmalarda biyofilm oluşumu ve virülans faktörü sentezinin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Römling ve ark. 2013). Sonuç olarak siklik di-GMP, sinyalleşmenin düzenlenmesi ve bakteriyel süreçlerin kontrolüne izin vermektedir (Sintim ve ark. 2010; Römling ve Balsalobre 2012; Caly ve ark. 2015).

2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*'daki cis-2-dekanoik asit sinyali

P. aeruginosa'nın bir *rpfF-rpfC-rpfG* veya *rpfF-rpfR* gen kümesi yoktur, fakat *RpfF* homolog *DspI*'den cis-2-dekanoik asit üretmektedir (Davies ve Marques, 2009; Amari ve ark. 2013). *DspI* geni, yağ asidi metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan bir gen kümesinde bulunmakta, bununla birlikte bu sinyal için sensörün ve transdüksiyon mekanizmasının kimliği bilinmemektedir.

DSF sinyallerini sentezleyen *RpfF* proteinleri, krotonaz süper familyası enzimlerinin üyeleridir ve amino asit sekansları “enoil CoA hidratazlar” ile benzerliğe sahiptir (Barber ve ark. 1997; Boon ve ark. 2008; Amari ve ark. 2013). In vitro çalışmalar, *B. cenocepacia*'nın *RpfF* homologu tarafından gerçekleştirilen BDSF sentezi için birincil substratın, yağ asidi biyosentezinde bir ara madde olan 3-hidroksil-yag-açil-ACP (açil taşıyıcı protein) olduğunu belirlemiştir (Bi ve ark. 2012). BDSF'nin üretilmesi, enzimin başlangıçta 3-hidroksidodekanoil-ACP'yi cis-2-dodekanoil-ACP'ye dönüştürmek için bir dehidrataz olarak ve daha sonra serbest BDSF'yi bırakmak üzere bir tiyoesteraz olarak çalışmasını gerektirmektedir. *B. cenocepacia*'dan (veya *Xcc*) elde edilen *RpfF* ayrıca, tiyoesteraz aktivitesiyle herhangi bir yağ açil ACP substratından, serbest doymuş yağ asitleri üretebilmektedir (Bi et al. 2012; Zhou ve ark. 2015a). BDSF'nin in vitro sentezi, bu tiyoesteraz reaksiyonunu tersine çevirmek için ekzojen bir açil-ACP sentetazın eklenmesini gerektirmektedir (Bi ve ark. 2012). *RpfF*, hem dehidrataz / desatüras hem de tiyoesteraz aktivitesi olan krotonaz süper ailesinin tek üyesidir. *RpfF*'nin farklı bakterilerdeki mutasyonu sadece DSF familyasının doymamış yağ asitlerini değil, aynı zamanda doymuş yağ asitlerinin de kültür süpernatantlarındaki görünümünü etkilemektedir (Beaulieu ve ark. 2013; Huang ve Lee Wong 2007). Bu durum in vivo desatüras ve tiyoesteraz aktivitelerinin sadece DSF ailesi sinyal üretimine izin vermek amacıyla sıkı bir şekilde koordine edilmediğini göstermektedir.

2.3.3. *RpfF* ve *RpfC* arasındaki etkileşim

Yukarıda belirtildiği gibi, *Xcc*'deki *RpfC* sadece DSF için bir sensör olarak değil, aynı zamanda DSF biyosentezinin baskılanmasında da rol oynamaktadır. *RpfC*'nin bu hareketine,

kısmen RpfF'nin DSF sentezini sınırlandırmasını sağlayan RpfC ve RpfF'nin REC alanı arasındaki protein-protein etkileşimi tarafından aracılık edilebilmektedir (He ve ark. 2006). DSF'ye bağlanmak üzere RpfC'deki konformasyonel değişiklikler, RpfF'nin salınımının bir sonucu olarak DSF sentezinin hızlı otoindüksiyonuna izin verebilmektedir. RpfC REC alanının ko-kristal kompleksinin yapıları RpfF ile birlikte etkileşimlerin ve katılan rezidülerin doğasını ortaya çıkarmıştır (Cheng ve ark. 2010). Bu gözlemler aynı zamanda *Xylella fastidiosa*'da XfDSF sinyal iletimi için anahtar gibi görünen RpfF-RpfC etkileşimlerinin rolüne moleküler bir bakış açısı sağlayabilmektedir (Ionescu ve ark. 2013). DSF ailesi sinyalinin eklenmesi, *Xylella*'da rpfF mutant fenotipini vahşi tipe (*Xanthomonas*'ta olduğu gibi) dönüştürmez. Bunun yerine *Xylella*'da sinyal iletimi hem RpfC hem de RpfF gerektirmektedir. Ayrıca RpfF'nin enzimatik olarak inaktif varyantları, *Xylella*'daki RpfF'nin çok işlevli olduğunu gösteren XfDSF sinyal iletimini de destekleyebilmektedir (Ionescu ve ark. 2013). RpfF'nin sinyal transdüksiyon mekanizmasının bir parçası olarak diğer proteinlerle etkileşip etkileşmediği halen bilinmemektedir. Mevcut yapısal bilgilerin, bu anahtar rolündeki RpfF-RpfC etkileşimlerine müdahale edebilecek moleküllerin tasarımına izin verip vermeyeceği görülecektir.

2.3.4. Sinyal bozulması ve RpfB'nin rolü

Başlangıçta, bir yağ asidi CoA ligazı olduğu öngörülen RpfB'nin, *Xanthomonas*'ın sinyal sentezinde rol oynadığı düşünülmüş, ancak daha sonra RpfF'nin tiyoesteraz etkisi ile üretilen doymuş yağ asitlerinin harekete geçirilmesinde etkili olduğu anlaşılmıştır (Bi ve ark. 2014). Bu hareket doymuş yağ asitlerinin fosfolipid biyosentezinde geri kazanımlarına ve kullanılmasına izin vermektedir. Buna ek olarak, RpfB'nin DSF'nin bozunmasında bir rolü olduğu bildirilmesine rağmen in vitro RpfB'nin BDSF veya DSF'ye karşı çok az faaliyeti vardır (Almeida ve ark. 2012; Zhou ve ark. 2015b). Bu bulgular, in vivo aktivitenin ek faktörlerle veya belki de diğer proteinler ile etkileşimler tarafından yönlendirilen konformasyondaki değişim ile modüle edildiğini göstermiştir (Zhou ve ark. 2015b). RpfB'nin ortologları, birçok bakteride sıklıkla meydana gelmekte ve bu da DSF ailesi sinyallerini indirgeme yeteneğinin yaygın olabileceğini düşündürmektedir. *Burkholderia* spp'de, kodlayan genler, *Xanthomonaslar*'da görülenlere karşın, rpfF ile bağlantılı değildir.

Fonksiyonel bir yapı birçok bakterinin, özellikle hızlı degradasyona sahip *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* cinslerine ait bazı suşlarla

DSF'yi indirgeme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Newman ve ark. 2008; Caicedo ve ark. 2016). *Pseudomonas* suşundaki G mutasyon analizi, hızlı DSF inaktivasyon / degradasyonunda carAB için bir rol göstermiştir (Newman ve ark. 2008). CarAB genleri, pirimidinlerin ve arjininin biyosentezinde bir öncü olan karbamoilfosfatın sentezinden sorumlu enzimleri kodlamaktadır. Bu durum, UDP-şekerlerin de sinyal döngüsüne katılımını düşündürmektedir. RpfB'nin ortologlarının da bu bakterilerde DSF bozulmasına katkıda bulunup bulunmadığı henüz bilinmemektedir.

DSF bozunmasına neden olabilen çevresel veya bitki ile ilişkili organizmaların tanımlanması, bunların belirli bitki hastalıklarına yönelik potansiyel biyokontrol ajanları olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. DSF'yi parçalayabilen bakterilerin aşılınması, üzümde bulunan *Xylella fastidiosa*'nın, yabani hardalda bulunan Xcc'nin ve narenciyede bulunan *Xanthomonas citri*'nin virülans ve semptom üretimini azaltabilmektedir (Newman ve ark. 2008; Caicedo ve ark. 2016). Bu bulgular birlikte ele alındığında, özellikle *Xanthomonas* türlerinin neden olduğu bitki hastalıklarının biyokontrolü için daha fazla suşun seçilmesinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir.

2.3.5. Sinyalleşmeyi engelleyen DSF'nin yapısal analogları

Sinyal sentezinin engellenmesine ek olarak, sinyalleşmenin küçük molekül modülasyonu veya aşağı yönde transdüksiyon basamakları, hastalık şiddetini etkileyebilmekte ve tedaviyi iyileştirmek için bir yol sağlayabilmektedir (Njoroge ve Sperandio 2009). Yapısal sinyal analoglarının nispeten küçük kütüphaneleri veya kimyasal bileşiklerin çok büyük rastgele kütüphaneleri, yüksek verimli yöntemler kullanılarak, ilginç öncü bileşikler için taranabilmektedir. Bu strateji, bir dizi Gram-negatif patojenin sitoplazmik membranında bulunan bakteriyel AI-3 sinyalinin yanı sıra konakçı sinyalleri için bir alıcı olan sensör kinaz QseC'yi de hedeflemek amacıyla başarıyla kullanılmıştır (Rasko ve ark. 2008; Curtis ve ark. 2014). İnhibitör moleküller, bir etki oluşturmak için bakteriyel sitoplazmaya girmeye ihtiyaç duymadıklarından, hücre yüzeyinde veya sitoplazmik membranda bulunan duyuşal proteinler giriş hedefi olarak caziptir.

Son zamanlarda yapılan henüz yayınlanmamış bir çalışmada, DSF'nin yapısal analoglarının bir grubunun, *Xanthomonas*'ın RpfC'si ile ilişkili bir sensör kinaz olan, *P. aeruginosa*'nın PA1396'sı üzerindeki etkisini incelenmiş ve PA1396'nın BDSF veya DSF üreten bakterilerde türler arası sinyalleşmeye katılmakta olduğunu belirlemişlerdir.

Yukarıda belirtildiği gibi, *P. aeruginosa* DSF veya BDSF'yi sentezlemese de, gen ekspresyonundaki değişiklikleri aktive eden, biyofilm oluşumunu değiştiren ve antibiyotik toleransını arttırabilen bu molekülleri PA1396 aracılığıyla algılama yeteneğine sahiptir (Ryan ve ark. 2008). Türler arası sinyalleşmenin bu şekli, *P. aeruginosa*'nın DSF ve BDSF üreten *S. maltophilia* ve *Burkholderia* türleri ile birlikte bulunduğu, kistik fibroz (CF) ile ilişkili polimikrobiyal enfeksiyonlarda ortaya çıkabilmektedir. Ancak PA1396, *P. aeruginosa*'da bulunan DSF ailesinin tür içi sinyali olan cis-2-dekanoik aside yanıt vermemektedir.

DSF'nin çeşitli yapısal türevlerinin hem in vitro hem de mürin enfeksiyonu modellerinde *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu ve antibiyotik toleransını azalttığı gösterilmiştir. Bu tarz etkiler büyük ölçüde, moleküllerin PA1396 ile etkileşimine bağlıdır. Bu nedenle türevler yeni antibiyotik adjuvanları için öncü bileşikler temsil edebilmektedir. Aynı bileşiklerin RpfC-RpfG iki bileşenli sistemle bakterilerdeki virülans gen ekspresyonunu etkileyip etkilemediği veya RpfR'nin aktivitesini etkileyip etkilemediği ise zamanla görülecektir. RpfR bağlamında, sinyalin varlığında veya yokluğunda PAS alanının kristal yapılarının belirlenmesi, başka inhibe edici moleküllerin rasyonel tasarımına da yardımcı olabilmektedir.

2.3.6. Potansiyel terapötikler olarak DSF ailesi molekülleri

Yapılan bir çalışma, sinyal moleküllerinin kendilerinin de, bu molekülleri üretmeyen organizmalarda antibiyotik etkinliğini ve biyofilmin dağılmasını destekleyecek uygulamalara sahip olabildiğini göstermiştir. DSF ve BDSF'nin, *B. cereus*, *S. aureus*, *M. smegmatis*, *Neisseria subflava* ve *P. aeruginosa* gibi bakterilere karşı antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Tian ve ark. 2013; Deng ve ark. 2014). BDSF insanlarda ve hayvanlarda tulareminin etkeni *Francisella tularensis* için model bir organizma olan *F. novicida*'nın biyofilm oluşumunu inhibe etmekte ve biyofilmin parçalanmasına yol açmaktadır (Dean ve ark. 2015). Cis-2-dekonik asidin de *S. aureus* tarafından üremeyi ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Davies ve Marques 2009; Jennings ve ark. 2012). Buna ek olarak, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın antimikrobiyallere dirençli persister hücrelerini duyarlı bir duruma dönüştürebilmekte (Marques ve ark. 2010), antibiyotik veya antiseptiklerle kombinasyon halinde, önceden belirlenmiş tek tür veya mantar-bakteri miks biyofilmlerini ortadan kaldırabilmektedir (Rahmani-Badi ve ark. 2014; Sepehr ve ark. 2014; Rahmani-Badi ve ark. 2015).

DSF, BDSF ve CDSF'nin hepsi *Candida albicans*'da maya-hif morfolojik geçişini inhibe edebilmektedir (Boon ve ark. 2008; He ve ark. 2010; de Rossi ve ark. 2014). Maya ve hif formları arasında geçiş yapma kabiliyeti, *C. albicans* virulansının enfeksiyon sürecinde önemli rollere sahip olan hif formu ile ilgili bir özelliğidir. Bu nedenle, bu geçişin DSF ve türevleri tarafından inhibe edilmesinin tedavide potansiyel bir rolü olabileceği düşünülmektedir. BDSF'nin de, *C. albicans*'ın mayadan hif formuna morfolojik geçişinin modülasyonuna bağlı olarak kateterlere yapışmasını inhibe edebildiği bildirilmiştir (Tian ve ark. 2013). Özellikle hem BDSF hem de trans türevi, yapışmayı ve germ tüp oluşumunu engelleyebilmekte ancak altta yatan sinyal iletim mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Pratik uygulamalara ek olarak, bu gözlemler aynı zamanda DSF üreten bakteriler ve üretmeyen mikroorganizmalar arasındaki türler arası veya alemler arası sinyalleşmelerin doğada birlikte yaşadıkları ortamlarda meydana gelme olasılığını da göstermektedir. Örneğin, DSF üreten bakteriler ve *C. albicans* arasındaki etkileşimler, kistik fibröz hastalarının hava yolunda meydana geldiği gibi polimikrobiyal topluluklarda da önemli olabilmektedir. Dikkat edilmesi gereken bir husus da, in vitro çalışmalarda belirli etkiler için gerekli olan sinyal molekülleri konsantrasyonlarının, in vivo çalışmalarda elde edilen fizyolojik bir aralık içinde bulunamayabilmesidir.

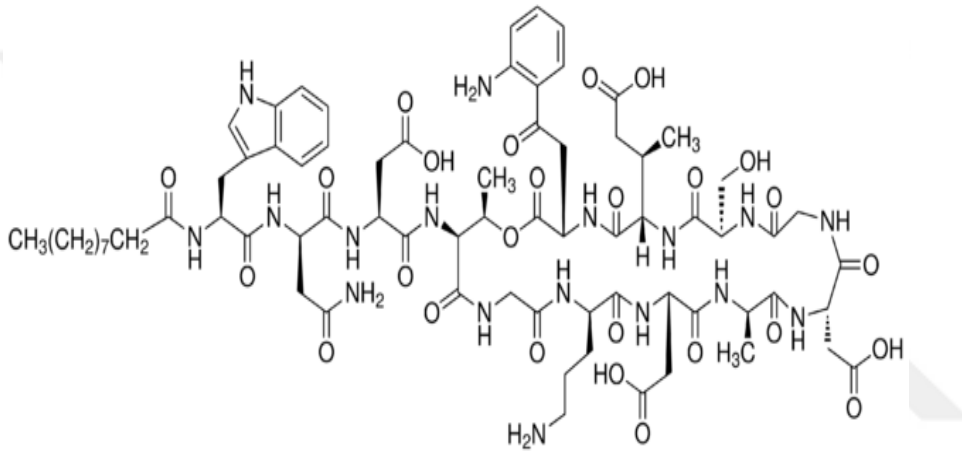
Tablo 2-2: Bakterilerde bulunan DSF ailesi sinyalleri tarafından düzenlenen faktörler-Ryan ve ark., 2015'den.

Mikroorganizma	Biyolojik yanıt Tür içi sinyalleşmede rol alan DSF ailesi sinyalleri
<i>Xanthomonas campestris</i>	Hücre dışı enzim üretimi, hücre dışı polisakkarit üretimi, pılA-bağımlı hareket, biyofilmin dağılması, küçük RNA, uzama faktörü P'nin dönüşümü, siklik glukan sentezi, <i>Arabidopsis</i> 'in stoma açılma faktörleri
<i>Xanthomonas oryzae pvs.oryzae</i> ve <i>oryzicola</i>	Demir alımı, pirince karşı demire bağımlı virülans, hücre dışı proteazlar, hücre dışı poligalakturonaz, asparajin sentezi
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Hücre dışı enzim üretimi, hücre dışı polisakkarit üretimi, flagellaya bağımlı biyofilm oluşumu
<i>Xanthomonas citri subsp. citri</i>	Konak yaprağının yüzeyine tutunma, limon ve greylort yapraklarına penetrasyon
<i>Xanthomonas hortorum pv.pelargonii</i>	Virülans, in planta hareketi
<i>Xylella fastidiosa</i>	Vektör böceklerde kolonizasyon ve tutunma, bitkilere bulaşma ve yayılma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biyofilmin dağılması, cansız persister hücre durumunun geri dönüşümü
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Tutunma, biyofilm oluşumu, swarming (yayılma) hareketi, fare, zebra balığı ve böcek modellerinde virülans
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ağır metal toleransı, antibiyotik direnci, hücre dışı proteaz üretimi, <i>Galleria mellonella</i> larvasına karşı tolerans
	Türler arası ve mikroorganizma konak arası sinyalleşmede rol alan DSF ailesi sinyalleri
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polimiksin direnci, biyofilm oluşumu, fare modellerinde persistans, tip III sekresyonu.
<i>Candida albicans</i>	Mayadan hife dimorfik dönüşümün inhibisyonu, kateterlere aderans (tutunma)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aminoglikozid direncinin inhibisyonu, biyofilm oluşumun inhibisyonu
<i>Bacillus cereus</i>	Biyofilm oluşumun inhibisyonu, aminoglikozidlere karşı duyarlılık.
<i>Escherichia coli</i>	Biyofilm oluşumun inhibisyonu, persister (kalıcı) hücrelerin duyarlı duruma dönüştürülmesi

2.4. Antibiyotiklerle ilgili genel bilgiler

2.4.1. Daptomisin

Daptomisin, genellikle Gram pozitif bakterilere karşı, konsantrasyona bağlı hızlı bir şekilde etki eden ve bakterisidal etki gösteren siklik lipopeptid yapıda bir antibiyotiktir (Şekil 2-9). Daptomisinin şu ana kadar test edildiği, Enterokoklar dışındaki klinik Gram pozitif bakteri suşlarının %90'ına karşı MİK değerleri ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, Enterokoklar için ise MİK değerleri 2-4 $\mu\text{g/ml}$ aralığında tespit edilmiştir.



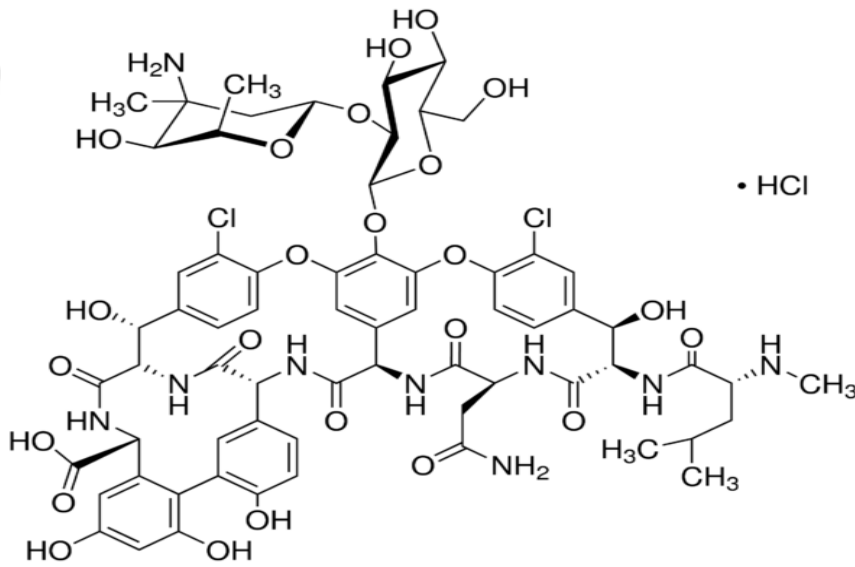
Şekil: 2-9: Daptomisinin kimyasal formülü

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2446?lang=en®ion=TR>

Bakterinin sitoplazmik zarına kalsiyuma bağımlı bir şekilde yerleşen ve bakterinin yüzeyi ile etkileşerek etki eden daptomisin, sitoplazmaya nüfuz etmeden hücre zarının parçalanmadan (lizize uğramadan) bozulmasına neden olmaktadır. Daptomisin ayrıca protein, DNA, RNA ve lipoteikoik asit sentezini engellediği gibi durağan faz da dahil olmak üzere tüm üreme fazlarında etki göstermektedir. Bu özellik, biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu endokardit ve osteomyelit gibi seyrek ve derin yerleşimli enfeksiyonların tedavisinde faydalı olabilmektedir. Daptomisinin kullanımı *S. aureus*'un neden olduğu komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (cSSTI) için 4 mg / kg / gün, sağa-gelişen enfektif endokardit (RIE) ve cSSTI veya RIE ile ilişkili bakteriyemi için 6 mg / kg / gün şeklinde tavsiye edilmektedir. Daptomisin pnömoni tedavisi için endike değildir (Gonzalez-Ruiz ve ark., 2016).

2.4.2. Vankomisin

Vankomisin ilk olarak *Streptococcus orientalis*'den türetilen trisiklik glikopeptit yapısında bir antibiyotiktir (Şekil 2-10). Vankomisin MRSA da dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilerin neden olduğu çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve önlenmesinde kullanıldığı gibi Streptokok, Enterokok ve MSSA enfeksiyonları için de kullanılmaktadır. Vankomisin, FDA tarafından onaylanmış ve etiket dışı bir çok klinik kullanıma sahiptir.



Şekil 2-10: Vankomisinin kimyasal formülü -

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/vancomycinhydrochloridefromstreptomycesorientalis148571140493911?lang=en®ion=TR>

Vankomisin'in FDA onaylı Klinik Kullanımları;

Clostridium difficile ile ilişkili ishal (oral uygulama), Stafilokok enterokoliti, Psödomembranöz kolit, Endokardit (Difteroid, Enterokokkal, Stafilokok ve Streptokok türleri), Stafilokokların neden olduğu sepsis, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları vb. şeklindedir.

Vankomisin'in Etiket Dışı Klinik Kullanımları;

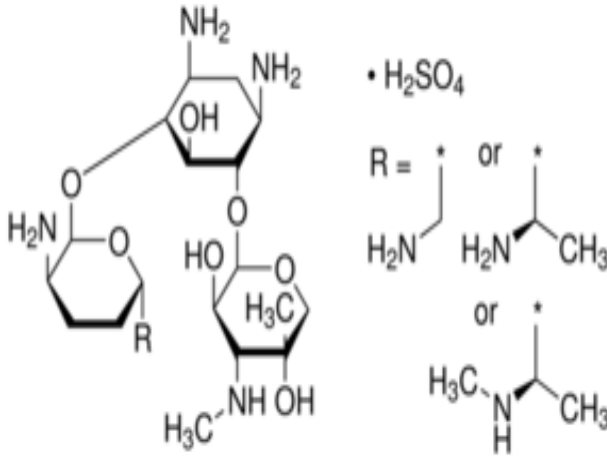
Kateterle ilgili enfeksiyonlar, toplum tarafından edinilmiş bakteriyel pnömoni, *C. difficile* enfeksiyonu, Grup B streptokok için neonatal profilaksisi, MRSA veya ampisiline

dirençli enterokoklara bağlı intra-abdominal enfeksiyonlar, bakteriyel menenjit, bakteriyel endoftalmit (sistemik veya intravitreal uygulama), doğal vertebral osteomyelit, peritonit, protez eklem enfeksiyonu, nekrotizan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, cerrahi profilaksi, cerrahi alan enfeksiyonları vb. şeklindedir (Patel ve Bernice, 2018).

Vankomisin, bakteriyel hücre duvarı içindeki peptidoglikanların polimerizasyonunu inhibe ederek bakterisidal etkisini gösteren bir glikopeptid antibiyotiktir. Bakterilerin hücre duvarı, uzun polimerlerden oluşan N-asetilmuramit asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) 'den oluşan, çapraz bağlanmış bir yapıya sahip katı bir peptidoglikan tabakası içerir. Vankomisin, D-alanil D-alaninin çapraz bağlanmasını engelleyerek peptidoglikan tabakasında NAM ve NAG'nın sentezi ve polimerizasyonunu önlemektedir. Bu inhibisyon, bakteriyel hücre duvarlarını zayıflatmakta ve nihai olarak hücre içi bileşenlerin sızınmasına yol açarak bakteri hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Vankomisin yalnızca Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir (Patel ve Bernice, 2018).

2.4.3. Gentamisin

Gentamisin, klinikte yaygın olarak kullanılan bir aminoglikozid grubu antibiyotiktir (Şekil 2-11). *Micromonospora*'dan 1963'de izole edilen gentamisin, *P. aeruginosa*'yı da içeren bir çok Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. 1971'de parenteral ilaç formu olarak kullanıma sokulmuştur. Klinik uygulamalara dayanarak gentamisinin tedavideki yanıtı iyidir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) şu hastalıkların tedavisi için gentamisin kullanımını onaylamıştır: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp.*, gibi *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteriler veya *Pseudomonas sp.*'nin yol açtığı enfeksiyonlar, *Staphylococcus* türlerinin neden olduğu bulaşıcı hastalıklar, bakteriyel menenjit, yenidoğanın bakteriyel sepsisi, bakteriyel septisemi, göz, kemik, deri ve / veya deri altı dokusunun enfeksiyonu, enfektif endokardit, *Pseudomonas* ve diğer Gram negatif bakterilerin neden olduğu periton diyalizi ile ilişkili peritonit, gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve solunum yolu enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen peritonit ve idrar yolu enfeksiyonları gibi (Chen ve ark., 2014).



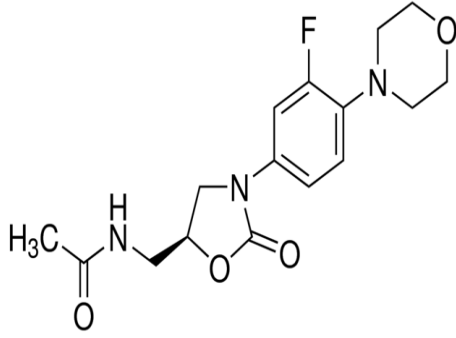
Şekil 2-11: Gentamisinin kimyasal formülü

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/gentamicinsulfate12345140541011?lang=en®ion=TR>

Gentamisin, diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi bakterilerin protein sentezini inhibe ederek etki eder ve konsantrasyona bağlı bir bakterisidal etkiye sahiptir. (Derbentli 2002 p.121). Bir çok aerop Gram negatif basile aynı zamanda Stafilocoklara ve bazı Mikobakterilere karşı da etki göstermektedir. Bakteriyel inokulum büyük olduğunda bile etkilidir ve tedavi sırasında nadiren direnç gelişir. Kuvvetli aktivitesi nedeniyle, gentamisin çeşitli klinik olgularda profilaksi ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca gentamisinin ağır Stafilocok enfeksiyonlarında betalaktamlar gibi hücre duvarına etkili antibiyotikler ile kombinasyon şeklinde yaygın bir kullanımı vardır (Chen ve ark., 2014).

2.4.4. Linezolid

Oksazolidonlar sınıfı antibiyotiklerin ilk üyesi olan linezolidin, vankomisin ve metisilin dirençli suşlar da dahil bir çok Gram pozitif bakteriye karşı etkili olduğu bilinmektedir. Diğer bir çok antibiyotik sınıfından (örn., Beta-laktamlar, aminoglikozitler, makrolidler) farklı olarak, linezolid tamamen sentetik bir bileşiktir. Etki mekanizması, bakterinin 50S ribozomunun katalitik bölgesindeki 23S rRNA'ya bağlanarak protein sentezininin inhibisyonu şeklindedir (Watkins ve ark., 2012).



Şekil 2-12: Linezolidin kimyasal formülü

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/linezolid3373516580003311?lang=en®ion=TR>

Linezolid şu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır;

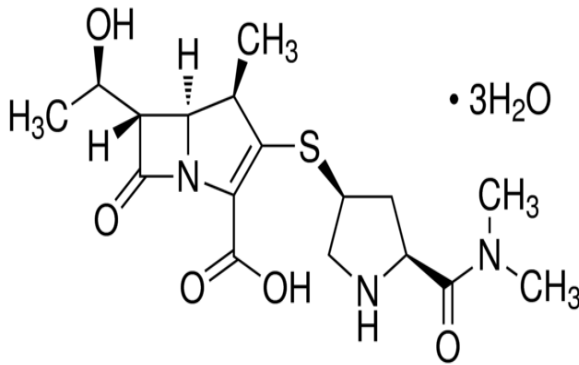
Eşzamanlı bakteriyemi vakaları da dahil olmak üzere vankomisine dirençli *E. faecium* enfeksiyonları; MSSA ve dirençli suşlar veya *S. pneumoniae* (çok ilaca dirençli suşlar dahil) dahil olmak üzere *S. aureus*'un neden olduğu nozokomiyal pnömoni; *S. aureus* (MSSA ve MRSA), *S. pyogenes* veya *S. agalactiae*'nin neden olduğu, eşlik eden osteomyelit olmaksızın diyabetik ayak enfeksiyonları dahil olmak üzere komplike cilt ve deri yapısı enfeksiyonları; MSSA veya *S. pyogenes*'in neden olduğu komplike olmayan cilt ve deri yapısı enfeksiyonları; eşzamanlı bakteriyemi veya MSSA içeren vakalar dahil *S. pneumoniae*'nin neden olduğu toplum kökenli pnömoni. Linezolid, etkili konsantrasyonlarının geniş bir doku aralığında etki gösterdiği, uygun bir farmakokinetik profile sahiptir. Bir çalışmada, enfekte yumuşak dokudaki ortalama linezolid konsantrasyonunun, ilgili serum konsantrasyonunun %51'ini oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, diyabetik ayak ülseri olan hastalar üzerinde yapılan bir başka çalışmada, linezolidin plazmadan hem sağlıklı hem de enfekte subkutan dokuya iyi nüfuz ettiğini bulmuşlardır (Watkins ve ark., 2012).

Linezolid'in hem intravenöz hem de oral formülasyonları mevcut olup oral formu %100 biyoyararlanıma sahiptir. Cinsiyet ve yaş, ilacın farmakokinetiği üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir ve hafif karaciğer yetmezliği veya herhangi bir renal yetmezlik durumunda herhangi bir doz değişikliğine gerek yoktur. Linezolid bakteriyostatiktir ve duyarlı bakterilere karşı önemli bir postantibiyotik etki gösterir. Bugüne kadarki tüm diğer antibiyotikler gibi, linezolide karşı da bakteri direncinin ortaya çıkması sadece bir zaman meselesiydi. Daha önceki araştırmacılar, linezolidin sentetik bileşimi nedeniyle doğal olarak

oluşan direnç mekanizmalarının gelişmesinin yavaş olabileceğini savunmuştur. Ancak, *S. aureus* suşlarında, 23S ribozomal RNA (rRNA) geninin alan V bölgesinde mutasyonlar yoluyla kısa bir süre sonra direnç gelişmiştir. Linezolid direncinin Cfr geni ile transfer edilebilir olması, yoğun bakım ünitesinde bir MRSA enfeksiyonu salgını ile ilişkilendirilmiştir. ABD'de yapılan yeni bir çalışmada MRSA suşları arasında linezolid direnci oranı düşük (%1) olduğu ve 2006'da gözetleme başladığından beri istikrarlı olduğu bulunmuştur (Watkins ve ark., 2012).

2.4.5. Meropenem

Meropenem, B-laktam antibiyotiklerden karbapenem sınıfına dahil olan sentetik bir antibiyotiktir (Şekil 2-13). Karbapenemlerin çoğu geniş spektrumlu antibiyotiklerdir ve bakterinin penisilin bağlayan proteinlerine (PBP) ve peptidoglikan sentezinden sorumlu enzimlerine bağlanarak etki ederler. Oksasiline dirençli stafilokoklar, bazı Gram negatif çomaklar (örn. bazı *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Stenotrophomonas* türleri), *E. faecium* dışındaki çoğu Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı etki gösterirler. Çoklu ilaç dirençli mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde de farklı antibiyotik gruplarıyla kombinasyon şeklinde kullanılabilirler (Papp-Wallace ve ark. 2011).



Şekil 2-13: Meropenemin kimyasal formülü

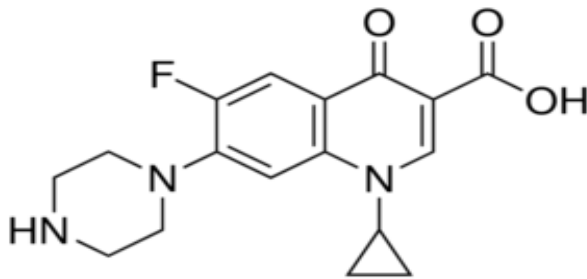
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/meropenem4375111947856711?lang=en®ion=TR>

2.4.6. Siprofloksasin

Siprofloksasin yarı sentetik florokinolon sınıfına ait geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Şekil 2-14). Etkisi, güvenilirliği ve ucuz maliyeti nedeniyle dünyada en sık kullanılan antibiyotiklerden olan siprofloksasin, ilk kez 1986 yılında piyasaya sürülmüştür. Bu ilacın bakteride iki hedefi vardır; biri DNA giraz diğeri ise DNA topoizomera IV enzimlerinin inhibisyonu. Bu enzimler bakterinin DNA replikasyonu, transkripsiyon ve DNA metabolizmasından sorumlu iki önemli enzimdir.

Florokinolonlar bir çok duyarlı mikroorganizmaya karşı hızlı bakterisidal etki göstermekle birlikte dokulara ve memeli hücrelerine çok iyi penetre olurlar. Bu bileşiklerin avantajları hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip olmaları ve gastrointestinal sistemden çok iyi emilip, kanda yeterli seviyeye ulaşarak sistemik enfeksiyonlar için kullanılabilenleridir.

Kinolonlara karşı direnç DNA giraz ve topoizomera IV enzimlerinin yapısal genlerindeki kromozomal mutasyonlarla geliştiği gibi dışa atım pompalarında artmış ekspresyon ve zar geçirgenliğini düzenleyen genlerdeki mutasyon sonucunda ilacın hücre içine alımının azalması şeklinde de olabilmektedir. Bugüne kadar siprofloksasin direnci bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında en sık *E. coli*, *Enterobacter* sp., ve *Klebsiella* spp. suşlarında görülmektedir. Ayrıca metisiline dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de de siprofloksasin ve ofloksasin gibi eski florokinolonlara karşı direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu dirençli suşlar için siprofloksasin ve ofloksasinin MIK_{90} değerleri 32 mg/l ve üstü olabilmektedir (Emmerson, 2003).



Şekil 2-14: Siprofloksasinin kimyasal formülü

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ciprofloxacin331348572133111?lang=en®ion=TR>

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 2014 yılında Florence Nightingale Hastanesi'nde izole edilmiş çeşitli klinik Stafilokok şuşlarının biyofilm oluşturma özellikleri kristal viyole boyama yöntemiyle belirlendikten sonra biyofilm oluşturan şuşların planktonik ve olgun biyofilm formlarına karşı çeşitli antibiyotiklerin tek başlarına ve QS moleküllerinden difüze olan sinyal faktörleri olan DSF ve BDSF ile kombinasyonları halinde Minimum İnhibitör konsantrasyonu ve Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyonu değerleri belirlenmiş ve olgun biyofilmlere karşı denenen Time Kill Curve yöntemiyle bu etkilerine ait zamana bağlı öldürme grafikleri hazırlanmıştır.

3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada Florence Nightingale Hastanesi'nin çeşitli ünitelerindeki farklı hastalara ait yara, burun ve kan örneklerinden izole edilmiş ve Vitek 2 cihazıyla tanıları yapılmış, 5 adet *S. epidermidis* ve 10 adet *S. aureus* suşu temin edilmiş, katalaz ve koagülaz testleri yapılarak tanıları doğrulanmıştır. Standart suş olarak *S. aureus* ATCC 29213 ve MRSA ATCC 43300 gerekli deneylerde kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada kullanılan Antimikrobiyal maddeler

Çalışmamızda antimikrobiyal madde olarak Stafilokoklara karşı etkili olduğu bilinen çeşitli antibiyotikler, ayrıca antibiyotiklerle beraber kullanıldığında çeşitli etkilere yol açan Quorum Sensing sinyal molekülleri kullanılmıştır.

3.2.1. Çalışmada kullanılan Antibiyotikler ve hazırlanışları

Çalışmamızda çeşitli antibiyotik gruplarına ait altı antibiyotik daptomisin (Cubicin, Novartis Sağlık, Gıda, Tarım Ürünleri San. Tic. A.Ş.) gentamisin (Gentamed, Koçak Farma), linezolid (Linezone, Farmako Eczacılık A.Ş.), meropenem (Meronem, Astra Zeneca), siprofloksasin (Ciproktan, Koçak Farma) ve vankomisinin (Vancotek, Koçak Farma) yanlarında belirtilen firmalardan temin edilmiştir. Antibiyotiklerin aşağıda verilen formüle göre steril distile su ile 5120-1280 µg/ml konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandıktan sonra -20°C'de 6 ay süreyle saklanmıştır. Meropenem günlük hazırlanmıştır. Deney öncesinde antibiyotiklerin istenen konsantrasyonları hazırlanışı 3.2.1.3'de belirtilen CAMHB besiyerinde dilüsyonları yapılarak hazırlanmıştır.

Tartılacak madde miktarı (mg)= $\frac{\text{İstenilen konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) \times \text{Çözücünün hacmi(ml)}}{\text{Antibiyotiğin potensi } (\mu\text{g/mg})}$

3.2.2. Çalışmada kullanılan Quorum Sensing sinyal molekülleri ve hazırlanışları

Çalışmamızda çeşitli bakterilerin salgıladığı difüze olan sinyal faktörü olarak da adlandırılan iki farklı Quorum Sensing Sinyal molekülü olan DSF (cis-11-metil-2-dodekanoik asit) Carbosynth ve BDSF (cis-2-dodekanoik asit) Adipogen firmalarından temin edilmiştir.

3.2.2.1. DSF molekülünün hazırlanışı

25 mg DSF son konsantrasyonu 25 μM olacak şekilde etanol ve hazırlanışı 3.2.2.3’de anlatılan pH 7.2 fosfat tamponunun 1:8 oranında hazırlanmış çözeltisinde çözündürülmüştür. Stok çözeltiden 250’şer μl eppendorf cryo tüplere dağıtılarak -20°C ’de saklanmıştır.

3.2.2.2. BDSF molekülünün hazırlanışı

10 mg BDSF son konsantrasyonu 25 μM olacak şekilde dimetilsülfoksitte (DMSO, Merck) çözündürüldükten sonra stok çözeltiden 200’şer μl cryo tüplere (Eppendorf) dağıtılmış ve -20°C ’de saklanmıştır.

3.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

3.3.1. %1’lik Glikozlu Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri (BD Bacto Difco)

Bacto Tryptone	17 g
Bacto Soytone	3 g
Bacto Dekstroz	2,5 g
Sodyum klorür	5 g
Dipotasyum Fosfat	2,5 g

Toz besiyerinden balonda 30 g tartıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve hafifçe ısıtılarak çözündürülmüştür. Besiyeri otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edildikten sonra son pH ’sı oda sıcaklığında $7,3 \pm 0,2$ olacak şekilde pH metre ile ayarlanmıştır. Deneyden önce hazırlanışı 3.2.2.2’de belirtilen glikoz çözeltisinden son konsantrasyon %1 olacak şekilde eklenmiştir.

3.3.2. Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri (Oxoid)

Kazeinin Pankreatik Dijesti	15g
-----------------------------	-----

Soya Fasulyesi Küspesi Papaik Dijesti	5g
Sodyum Klorür	5g
Agar	15g

Toz besiyerinden 40 g alınarak distile suyla bir litreye tamamlandıktan sonra besiyeri tamamen çözününceye kadar kaynatılmıştır. Sonrasında otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edildikten sonra son pH ’sı oda sıcaklığında $7,3\pm 0,2$ olacak şekilde pH metre ile ayarlanmıştır.

3.3.3. Katyon ilaveli Mueller Hinton Broth (CAMHB) besiyeri (Oxoid)

Et, dehydrate (kurutulmuş) infüzyonu (karışımı)	300 g
Kazein hidrolizati	17,5g
Nişasta	1,5g
Ca ⁺⁺	3,665mg
Mg ⁺⁺	6,29mg

Toz besiyerinden 21 g tartılarak distile suyla 1 litreye tamamlandıktan sonra besiyeri tamamen çözününceye kadar karıştırılarak ısıtılmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edildikten sonra son pH’sı oda sıcaklığında $7,3\pm 0,2$ olacak şekilde pH metre ile ayarlanmıştır. Ayrıca hazırlanmış steril kalsiyum ve magnezyum çözeltilerinden eklenerek katyon miktarı “CLSI standartlarına” göre ayarlanmıştır.

3.4. Çalışmada kullanılan Çözeltiler

3.4.1. %0,1’lik Kristal viyole (Merck)

Kristal viyole	0,1g
Damıtık su	100 ml

Toz şeklindeki kristal viyole boyasından 0,1 g tartılıp damıtık suda çözüldürüldükten sonra, hacmi 100 ml’ye tamamlanmıştır.

3.4.2. %10’luk Glikoz çözeltisi

Glikoz	10 g
Damıtık su	100 ml

Toz şeklindeki glikozdan 10 g tartılıp distile su çözündürülüp, 100 ml'ye tamamlandıktan sonra filtreden geçirilip steril edilmiştir. Deney sırasında hazırlanışı 3.2.1.1'de belirtilen TSB besiyerine gerektiği kadar eklenmiştir.

3.4.3. pH 7.2 Fosfat tamponu çözeltisi

K ₂ HPO ₄	13,6 g
KH ₂ PO ₄	4,0 g"
Damıtık su	1000 ml

K₂HPO₄ 'den 1,36 g ve KH₂PO₄ 'den 0,4 g tartıldıktan sonra distile suda çözündürülüp 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.4.4. Fizyolojik Tuzlu su

NaCl	8,5 g
Damıtık su	1000 ml

NaCl'den 8,5 g tartıldıktan sonra distile suda çözündürülüp 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.5. Tanı testleri

3.5.1. Koagülaz testi (Stafilaz testi, Oxoid) Staphytest Plus (Oxoid, Cambridge, United Kingdom)

Stafilokokların tanısında protein A ve pıhtılaşma faktörü (clumping) A'yı saptayabilen hazır Hızlı lateks ve hemaglutinasyon testleri kullanılmıştır. Bu testler, *S. aureus* kapsül polisakariti serotip 5 ve 8'i veya diğer *S. aureus* yapılarını saptayan monoklonal antikorlar içermektedir. Stafilokok suşlarının taze kültürlerinden birer öze dolusu alınıp, bir lamin üstüne sürülmüş, üzerlerine birer damla belirteçlerden damlatılmıştır. Aglutinasyon gözlenen suşlar koagülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu sayede koagülaz pozitif olan *S. aureus* ve koagülaz negatif olan *S. epidermidis* suşları birbirinden ayırt edilmiştir.

3.5.2. Katalaz testi

Katalaz enziminin varlığı, bakterinin 24 saatlik kültüründen süspansiyon hazırlanarak üzerine %3'lük hidrojen peroksit eklenmesi ile tespit edilmiştir. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayırdığı için 10 saniyede güçlü köpük ya da hava kabarcıkları

gözlenmektedir. Katalaz testi en sık streptokok (katalaz-negatif) ve stafilokokların (katalaz-pozitif) ayırt edilmesinde kullanılmaktadır.

3.6. Biyofilm oluşumunun incelenmesi

Çalışmada kullanılan 10 adet *S. aureus* ve 5 adet *S. epidermidis* suşunun biyofilm oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla kristal viyole ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden alınarak hazırlanışı 3.3.1’de belirtilen % 1’lik glikozlu TSB besiyeri içerisinde süspande edilmiş ve Mc Farland cihazında (Biosan) yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklığına denk gelen 1×10^8 cfu/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra % 1’lik glikozlu TSB besiyerinde son konsantrasyon yaklaşık 1×10^7 cfu/ml olacak şekilde 1/10 sulandırılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 200’er µl otomatik pipetle (Gilson) alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolağın (LP İtaliana) kuyularına ilave edilmiş ve mikrolaklar 37°C’lik etüvde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar 250’şer µl hazırlanışı 3.4.4.’de belirtilen steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kere yıkanmış, tespit işlemi için her kuyuya 200’er µl % 99’luk metanol konulup 15 dk. bekletilmiştir. Metanol kuyucuklardan otomatik pipetle çekildikten sonra mikrolaklar havada kurumaya bırakılmış, ardından kuyulara, hazırlanışı 3.4.1’de belirtilen % 0.1’lik Kristal viyole çözeltisinden 200’şer µl eklenerek 5 dk bekletilmiştir. Sürenin sonunda fazla boya çözeltileri çeşme suyu ile yıkanmış ve plaklar havada kurutulmuştur. Deneylerde pozitif kontrol olarak MRSA ATCC 43300 standart suşu, negatif kontrol olarak ise bakteri ilave edilmemiş % 1’lik glikozlu TSB besiyeri kullanılmıştır. Mor renkte boyanmış olarak görülen bakteriyel biyofilm oluşumları hem gözle kontrol edilmiş, hem de % 96’lık etanolde çözündürülerek spektrofotometrede (Multiscan Go Elisa Reader) 595 nm’de ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir.

3.7. Çalışmada kullanılan antibiyotiklere ait Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisit Konsantrasyonunun (MBK) saptanması

Çalışmada Clinical and Laboratory Standardts Institute (CLSI) tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi ile 7 adet klinik stafilokok suşuna ve bir adet standart *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı antibiyotiklerin MİK değerleri belirlenmiştir. İlk olarak antibiyotiklerin stok çözeltilerinden başlangıç konsantrasyonları (512-64 µg/ml) olacak hazırlanışı 3.3.3’de anlatılan Katyon ilaveli Mueller-Hinton buyyon besiyerinde (CAMHB) dilüsyonları yapılarak çözeltileri hazırlanmış mikrolaktaki ilk iki kuyuya bunlardan 50’şer µl eklenmiştir. 2-12. kuyulara CAMHB besiyerinden 50’şer µl eklenip 2-11. kuyu arasında seri dilüsyonları

yapılmıştır. Son kuyu üreme kontrolü için bırakılmıştır. Son olarak bütün kuyulara son konsantrasyonu ml'de 5×10^5 koloni oluşturan birim (cfu/ml) olacak şekilde bakterinin sıvı kültüründen 50'şer µl ilave edilmiştir. Mikroplaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değerleri olarak kaydedilmiştir. Üremenin görülmediği kuyulardan hazırlanışı 3.2.1.2'de anlatılan TSA besiyerlerine ekim yapılmış, 18-24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minimal bakterisit konsantrasyonu (MBK) olarak kaydedilmiştir.

3.7.1. Çalışmanın standardizasyonu

Çalışmada MİK yöntemi için, CLSI kılavuzunda referans standart suş olarak verilen *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. Deney sonuçları kılavuzda belirtilen sınır değerler aralığında bulunmuştur.

3.8. Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu (MBİK) ve Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyonun (MBEK) tayini

Biyofilm oluşturabildiği 3.6'da anlatılan yöntemle belirlenen 7 adet klinik suş seçilerek MBİK ve MBEK deneylerinde kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolaklara 10^7 cfu/ml sayıda hazırlanmış bakteri kültüründen her kuyuya 100'er µl eklenerek oluşturulan 24 saatlik biyofilme ait planktonik hücreleri uzaklaştırma amacıyla kuyular üçer kere 150'şer µl steril tuzlu su ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Antibiyotiklerin 5120 mg/lt'den 10 mg/lt'ye kadar olan konsantrasyonları 2 kat azaltılarak hazırlanışı 3.3.3'de belirtilen CAMHB besiyerinde hazırlanmış, her konsantrasyondan 100'er µl antibiyotik çözeltisi kuyulara aktarılmış ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra antibiyotik çözeltileri otomatik pipetle kuyucuklardan çekilmiş ve 3 kez steril tuzlu su ile yıkanmış ve mikrolak kuyularının içine 100 µl steril tuzlu su aktarılmıştır. Mikroplaklar steril mikrolak koruyucu bantlarıyla kaplandıktan sonra ultrasonik banyoda (Medisson) 10 dk sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra manyetik karıştırıcı (Biosan) ile 10 dk karıştırılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Her kuyudan 100'er µl örnek alınarak sayım için hazırlanışı 3.3.2'de belirtilen Tryptic Soy Agar besiyerine ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyondan sonra oluşan koloniler sayılmış, biyofilm bakterilerinin üremesini engellendiği en düşük konsantrasyon MBİK, biyofilm bakterilerinin eradike edildiği en düşük konsantrasyon MBEK olarak belirlenmiştir.

3.9. QS sinyal moleküllerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sonuçlarına etkilerinin belirlenmesi

3.9.1. QS sinyal moleküllerinin MİK sonuçlarına etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada QS sinyal molekülleri ve antibiyotiklerin beraber kullanılarak bakterilere karşı MİK değerlerinin belirlenebilmesi için, modifiye MİK yöntemi geliştirilmiştir. QS sinyal moleküllerinin hazırlanışları 3.1.2.1 ve 3.1.2.2 belirtilen stok çözeltileri hazırlanışı 3.3.3’de anlatılan CAMHB besiyerinde 1/10 sulandırılmıştır. Antibiyotikler ve besiyeri 3.7’de anlatılan MİK yöntemindeki gibi hazırlanmış, QS sinyal molekülleri son konsantrasyonu 0,5µM olacak şekilde, bakteri kültürleri de son konsantrasyonları 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde mikropklara eklendikten sonra mikropklar 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. MİK değerleri üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir.

3.9.2. QS sinyal moleküllerinin MBEK ve MBEK üzerine etkisinin belirlenmesi

Antibiyotikler ve bakteri kültürleri 3.8’de anlatılan MBEK ve MBEK yöntemindeki gibi hazırlanıp mikropklara eklenmiştir. QS sinyal molekülleri de son konsantrasyonları 0,5µM olacak şekilde ayrıca kuyulara eklenmiştir.

3.10. Time-kill curve yöntemiyle antibiyotiklerin kombinasyon halinde oluşturdukları etkilerin saptanması

Çalışmada Time kill curve (TKC) yöntemi ile Stafilokok biyofilmlerine karşı antimikrobiyal maddelerin tek başına ve DSF ile kombinasyon halinde etkileri belirlenmiştir. Çalışmada 96 kuyucuklu mikropklarda bakterilerin 24 saatlik biyofilmler hazırlanmış, kuyucuklar 3 kere 250’şer µl PBS ile yıkandıktan sonra havada kurutulmuştur. Antibiyotikler son konsantrasyonu 1x MBEK olacak şekilde CAMHB’de dilüsyonları yapılarak 100’er µl kuyulara eklenmiş, ayrıca kuyulara 80 µl antibiyotik üzerlerine CAMHB’de 1/10 sulandırılmış QS sinyal molekülleri son konsantrasyonları 0,5µM olacak şekilde (20’şer µl) eklenmiştir. Mikropklar 0, 2, 4, 6 ve 24 saat için 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra mikropklar 3 kez steril tuzlu su ile yıkanmıştır. Biyofilmlerin parçalanması işlemi 3.6’de anlatılan MBEK yöntemindeki gibi yapılmış ve her örnekten 100’er µl alınarak TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 24 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak süspansiyonun mililitresinde bulunan koloni sayısı (cfu/ml) saptanmıştır. Bütün bu deneyler üreme kontrolü olarak antimikrobiyal madde içermeyen besiyerlerinde de yapılmıştır.

Elde edilen değerler zaman “x” ekseninde, bakteri sayısının logaritmik değeri “y” ekseninde olacak şekilde gösterilerek zaman-ölüm eğrileri çizilerek, sonuçlar CLSI verilerine göre aşağıdaki şekilde yorumlanmıştır.

a) Sinerjist etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antimikrobiyal ajandan daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ($\geq 2 \log_{10}$) azalmış olması sinerjist etki olarak kabul edilmiştir.

b) Additif etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antimikrobiyal ajandan daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre <10 kat ($1 \log_{10}$) azalmış ya da artmış olması additif etki olarak kabul edilmiştir.

c) Antagonist etki: Antibiyotiklerin 24. saatte kombinasyon halinde oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısının, kombinasyonda bulunan antimikrobiyal ajandan daha aktif olanın tek başına oluşturduğu etki sonucu elde edilen bakteri sayısına göre 100 kat ya da daha fazla ($\geq 2 \log_{10}$) artmış olması antagonist etki olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda TKC yöntemini seçmemizin nedeni bu yöntemin araştırılan kombinasyonların oluşturduğu bakterisidal aktivitenin dinamiğinin llmesine olanak sağlamasıdır. Bu nedenle bakterisidal tedavinin gerekli olduğu ciddi infeksiyon hastalıklarının tedavisine yönelik araştırmaların yapılabilmesi için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem ile bakteri ve antibiyotik arasındaki karşılıklı etkileşimin 24 saatlik dinamiğinin ortaya koyulması klinik uygulamalara daha yakın sonuçların elde edilmesini mümkün kılmaktadır (Dosler ve ark. 2015).

4. BULGULAR

4.1. Biyofilm oluşturan Stafilocok suşlarının belirlenmesine ait bulgular

Çalışmada biyofilm oluşturan klinik Stafilocok suşları 3.3’de belirtilen yöntemlerle tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturma dereceleri biyofilm pozitif standart *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşu ile kıyaslanarak zayıf, orta ve güçlü olarak belirlenmiş ve Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Klinik Stafilocok suşlarının biyofilm oluşturma dereceleri

Biyofilm oluşturma derecesi		Zayıf (+)	Orta (++)	Güçlü (+++)
Bakteriler	İzole edilen bölge			
<i>S.epidermidis</i>				
MSSE 1	Yara	+	-	-
MSSE 2	Kan	+	-	-
MSSE 3	Kan	+	-	-
MRSE 1	Kan	+	-	-
MSSE 4	Burun	-	-	
<i>S. aureus</i>				
MSSA 1	Kan	-	++	-
MSSA 2	Yara	-	++	-
MSSA 3	Burun	-	-	+++
MSSA 4	Burun	-	-	++++
MSSA 5	Burun	-	-	+++
MSSA 6	Burun	+	-	-
MRSA 1	* ND	-	-	+++
MRSA 2	ND	-	-	++++
MRSA 3	ND	+	-	-
MRSA 4	ND	-	-	++++
St. MRSA ATCC 43300				+++

*ND: tanımlanmamış

Bu sonuçlara göre 5'i *S. epidermidis*, 10'u *S. aureus* olmak üzere toplam 15 suştan 6'sının zayıf, 2'sinin orta, 7'sinin ise güçlü biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Suşların izole edildiği bölgelere bakıldığında güçlü biyofilm oluşturan suşların genel olarak burundan izole edilmiş olduğu gözlenmiştir.

4.2. MİK ve MBK konsantrasyonlarının belirlenmesine ait bulgular

Çalışmada biyofilm oluşturduğu tespit edilen 4'ü *S. aureus*, 3'ü *S. epidermidis* olmak üzere 7 suşa karşı 6 antibiyotiğin etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla MİK, MBK değerleri tespit edilmiş, sonuçlar Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre MİK değerleri bazı suşlar için en düşük olan, en etkili antibiyotikler gentamisin ve siprofloksasin olup sırasıyla, *S. aureus* için 0,25; 0,25, ve *S. epidermidis* için 0,125; 0,25 µg/ml'dir. Suşa bağlı olarak *S. aureus*'a karşı en yüksek MİK değerine sahip antibiyotikler ise gentamisin (256 µg/ml), meropenem (>64 µg/ml) olup, ve *S. epidermidis*'de de suşa bağlı olarak gentamisin (32 µg/ml), siprofloksasin (64 µg/ml) ve meropenem (16 µg/ml)'dir. *S. aureus* suşlarına karşı MBK aralıkları ise vankomisin için 0,5-1; gentamisin için 0,5->256; linezolid için >8; siprofloksasin için 0,5-2; meropenem için 1->64; daptomisin için ise 0,5-1 µg/ml olarak, *S. epidermidis* suşlarına karşı MBK aralıkları gentamisin için 0,125-32 , vankomisinin, için 1-4, linezolid için 1/ >8, daptomisin için 0,5-1, siprofloksasin için 0,25-64 ve meropenem için 2-32 µg/ml olarak bulunmuştur. Buna göre en geniş MİK ve MBK aralığına sahip antibiyotikler gentamisin ve siprofloksasindir

4.3. MBİK ve MBEK konsantrasyonlarının belirlenmesine ait bulgular

Çalışmada 4'ü *S. aureus*, 3'ü *S. epidermidis* olmak üzere 7 suşın olgun biyofilmlerine karşı 6 antibiyotiğin MBİK ve MBEK değerlerinin sonuçları Tablo 4-2'de gösterilmiştir. *S. aureus* suşları için MBİK değerleri en düşük olan antibiyotikler linezolid ve siprofloksasin (20 µg/ml) iken, *S. epidermidis* için daptomisin ve linezolid (10 µg/ml)'dir. MBİK değerleri en yüksek olan antibiyotikler (>5120 µg/ml) *S. aureus* için vankomisin ve gentamisin, *S. epidermidis* için ise gentamisinidir. Buna göre MBİK aralıkları en geniş olan antibiyotikler her iki tür için de gentamisinidir. MBEK değeri en düşük olan antibiyotik her iki tür için de siprofloksasin olup, *S. aureus*'a 80, *S. epidermidis*'e 640 µg/ml'de etkili olmuştur. MBEK aralığı en geniş olan antibiyotik ise tüm suşlar için siprofloksasin (80- >5120 µg/ml) olmuştur.

Tablo 4-2: Biyofilm oluşturan Stafilokok suşlarına karşı çeşitli antibiyotiklerin MİK, MBK, MBİK ve MBEK konsantrasyonu aralıkları

Bakteriler	MİK aralığı (µg/ml)	MBK aralığı (µg/ml)	MBİK aralığı	MBEK aralığı
<i>S.aureus</i> (*n:4)				
Antibiyotikler				
Daptomisin	0,5	0,5- 1	40- 80	160- >5120
Vankomisin	0,5- 1	0,5- 1	80- 5120	>5120
Linezolid	0,5- 2	>8	20- 40	>5120
Gentamisin	0,25- 256	0,5 - >256	80- 5120	>5120
Siprofloksasin	0,25- 1	0,5- 2	20- 40	80- >5120
Meropenem	0,5- >64	1- >64	40- 160	>5120
<i>S. epidermidis</i> (n:3)				
Daptomisin	0,5	0,5- 1	10- 640	>5120
Vankomisin	1- 2	1- 4	80- 640	>5120
Linezolid	1	>8	10- 640	>5120
Gentamisin	0,125- 32	0,5- 256	80- 5120	1280- >5120
Siprofloksasin	0,25- 64	0,25- 64	40- 160	640- >5120
Meropenem	2- 16	2- 32	80- 160	1280- >5120

n: suş sayısı

4.4. QS sinyal moleküllerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular

4.4.1. QS Sinyal moleküllerinin MİK sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular

Biyofilm oluşturduğu belirlenen 6 Stafilokok suşunun planktonik hücrelerine karşı antibiyotiklerin tek başına ve QS sinyal molekülleri ile beraber MİK değerlerinin belirlendiği modifiye mikrodilüsyon yöntemine ait sonuçlar Tablo 4-3’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre DSF’nin daptomisin dışındaki bütün antibiyotiklerin, BDSF’nin ise tüm antibiyotiklerin MİK değerleri üzerine azaltıcı etkileri olmuştur. DSF ile birlikte kullanıldığında bir suşa karşı ise gentamisinin MİK değeri 8 kat; 2 suşa karşı siprofloksasinin, bir suşa karşı meropenemin MİK değeri 4 kat azalmıştır.

BDSF ise bir suşa karşı gentamisin ve meropenemin MİK değerlerini 32 kat; bir suşa karşı linezolidin, 2 suşa karşı gentamisinin MİK değerini 16 kat; 3 suşa karşı gentamisinin MİK değerini 8 kat; bir suşa karşı linezolidin, 2 suşa karşı siprofloksasinin MİK değerini 4 kat azaltmıştır.

Tablo 4-3: QS sinyal moleküllerinin antibiyotiklerin MİK konsantrasyonları üzerine etkileri

Antibiyotikler/ QS sinyal molekülleri	Bakteriler					
	MSSA 1	MRSA 2	MRSA 4	MSSE 1	MRSE1	MSSE 4
	MİK değerleri (µg/ml)					
Daptomisin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Daptomisin+ DSF	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Daptomisin+ BDSF	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Vankomisin	1	1	1	2	2	1
Vankomisin+DSF	0,5	1	1	2	1	0,5
Vankomisin+BDSF	1	1	0,5	1	1	0,5
Linezolid	0,5	1	1	1	1	0,5
Linezolid+DSF	0,25	1	0,5	1	1	1
Linezolid+BDSF	0,125	2	4	1	1	0,03
Siprofloksasin	0,5	32	0,25	64	0,25	0,5
Siprofloksasin+ DSF	0,5	32	0,25	64	0,25	0,125
Siprofloksasin+BDSF	0,5	16	0,06	64	0,12	0,03
Gentamisin	0,5	256	0,25	32	0,25	0,125
Gentamisin+ DSF	0,5	128	0,25	4	0,25	0,06
Gentamisin+ BDSF	0,06	16	0,03	1	0,03	0,03>
Meropenem	0,5	64	64	16	16	2
Meropenem+DSF	0,5	64	64	4	16	2
Meropenem+ BDSF	0,5	>64	>64	8	16	0,06

4.4.2. QS sinyal moleküllerinin “MBİK/MBEK” sonuçlarına etkilerinin belirlenmesine ait bulgular

Çalışılan Stafilokok suşlarının olgun biyofilmlerine karşı QS sinyal moleküllerinin antibiyotiklerin MBİK ve MBEK değerleri üzerine olan etkilerine ait sonuçlar Tablo 4-4’de gösterilmiştir.

Tablo 4-4: QS sinyal moleküllerinin MBİK ve MBEK konsantrasyonları üzerine etkileri

Antibiyotikler/QS sinyal molekülleri	Bakteriler					
	MSSA 4	MRSA 2	MRSA 4	MSSE 1	MRSE 1	MSSE 4
	MBİK/ MBEK değerleri (µg/ml)					
Vankomisin	640				80	80
Vankomisin+ DSF	160				20	20
Vankomisin+ BDSF	640				20	10
Linezolid	40		40		40	40
Linezolid+ DSF	20		40		40	40
Linezolid+ BDSF	40		20		20	20
Siprofloksasin		>320	10			40
Siprofloksasin + DSF		320	10			20
Siprofloksasin +BDSF		320	10			10
Gentamisin	5120	5120	1280	5120	20	80
Gentamisin+ DSF	5120	5120	1280	1280	20	40
Gentamisin+ BDSF	80	1280	320	1280	20	80
Meropenem		160		160		160
Meropenem+ DSF		80		160		20
Meropenem+ BDSF		160		40		160

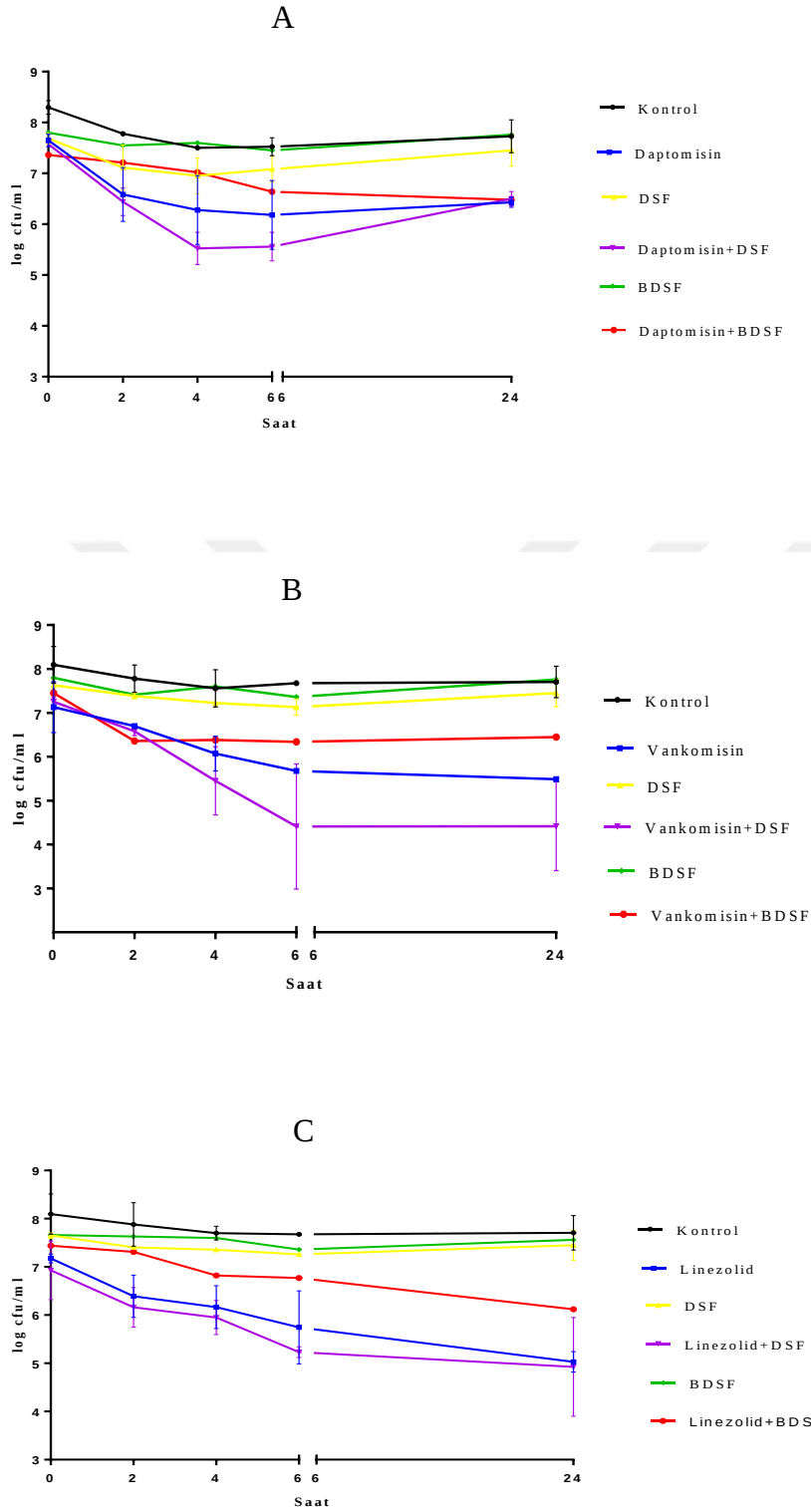
4.5. Time Kill Curve yöntemiyle zamana karşı öldürme kinetiklerinin belirlenmesine ait bulgular

Time Kill Curve yöntemiyle antibiyotiklerin ve QS sinyal moleküllerinin 6 Stafilokok suşunun olgun biyofilm hücrelerine karşı 0, 2, 4, 6 ve 24. saatlik zaman dilimlerinde zamana karşı öldürme oranları belirlenmiştir. Time Kill Curve (TKC) sonuçları grafiklerde verilmiştir.

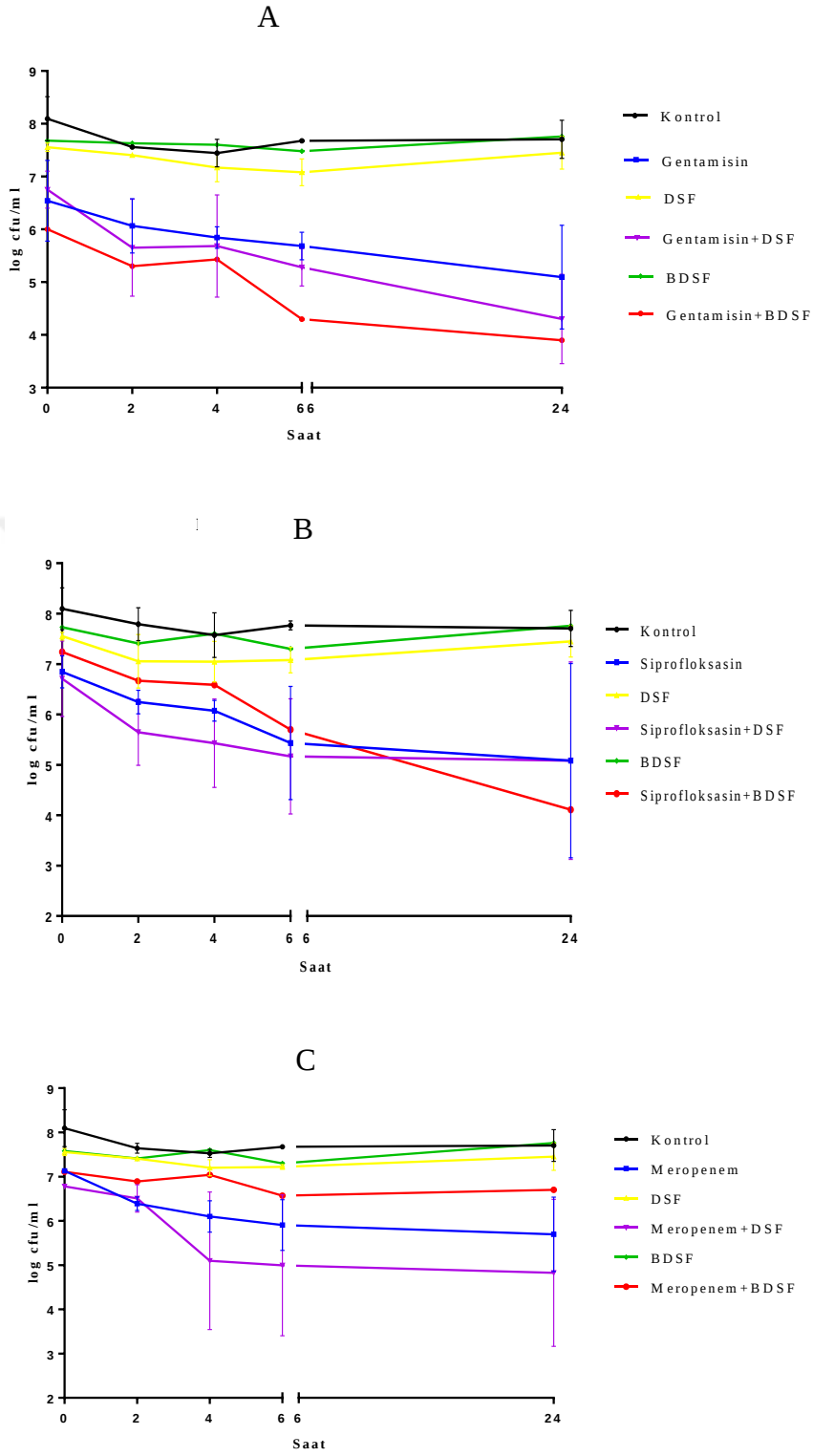
Çalışmada DSF'nin genel olarak daptomisin, vankomisin, linezolid ve gentamisin ve siprofloksasin ile; BDSF'nin ise daptomisin, gentamisin ve meropenem ile birlikte olgun biyofilmlere ait canlı bakteri sayısını 24. saatte 0,5-2 log arasında azalttığı tespit edilmiştir.

4.5.1. *S.epidermidis* suşlarına ait bulgular

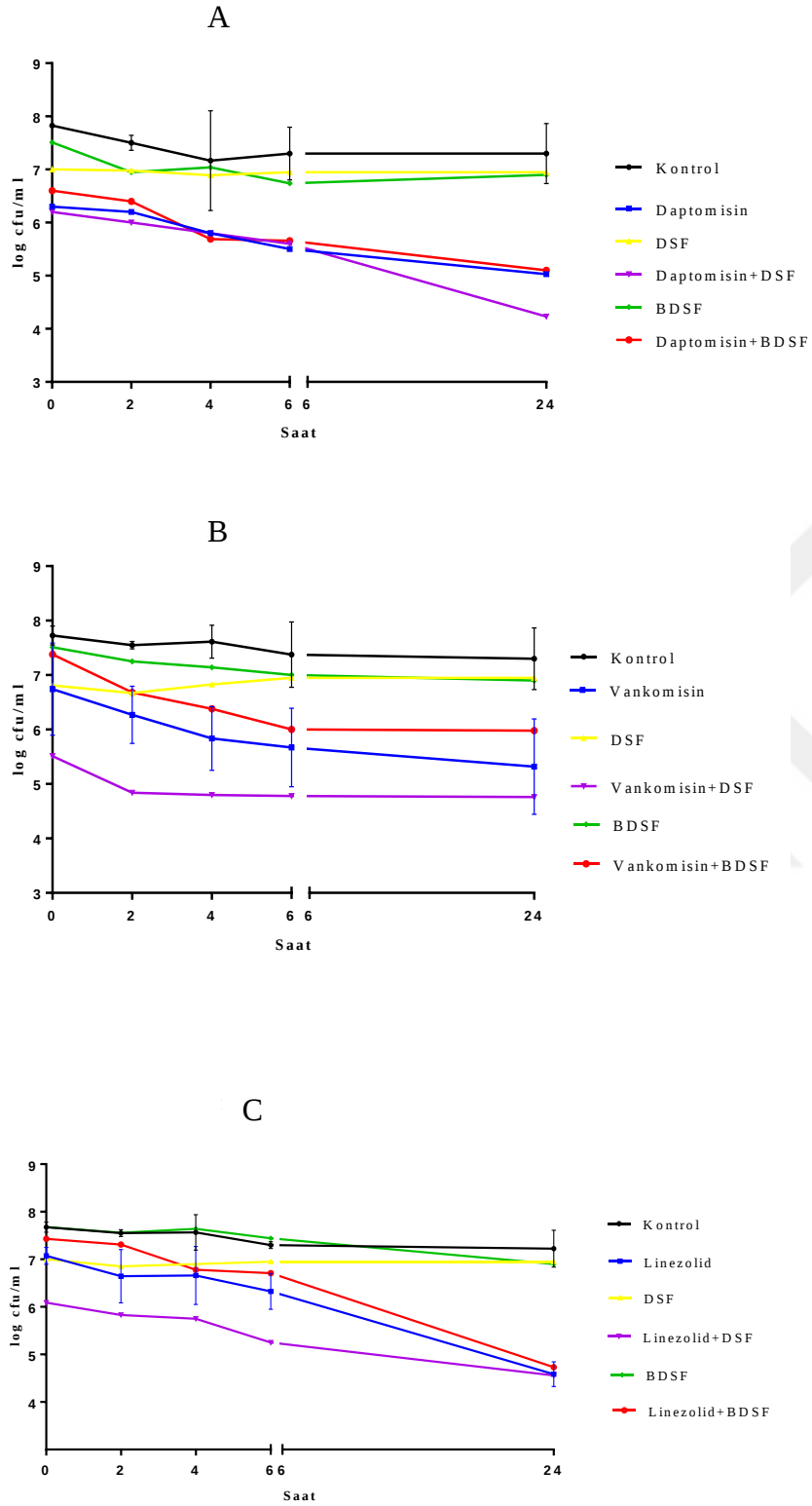
Çalışmamızda biyofilm oluşturduğu belirlenmiş olan 2 MSSE ve bir MRSE suşu seçilmiş, bu suşların olgun biyofilmlerine karşı TKC yöntemi ile QS sinyal molekülleri ile antibiyotiklerin tek başlarına ve kombinasyon halindeki etkileri Şekil 4.1-4.4'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre DSF sinyal molekülünün vankomisinle birlikte MSSE suşlarının biyofilmlerine ait canlı bakteri sayısını 24.saatte 1 log₁₀'dan fazla, BDSF'nin ise meropenemle birlikte MRSE canlı bakteri sayısını 24. Saatte 2 log₁₀ azalttığı tespit edilmiştir.



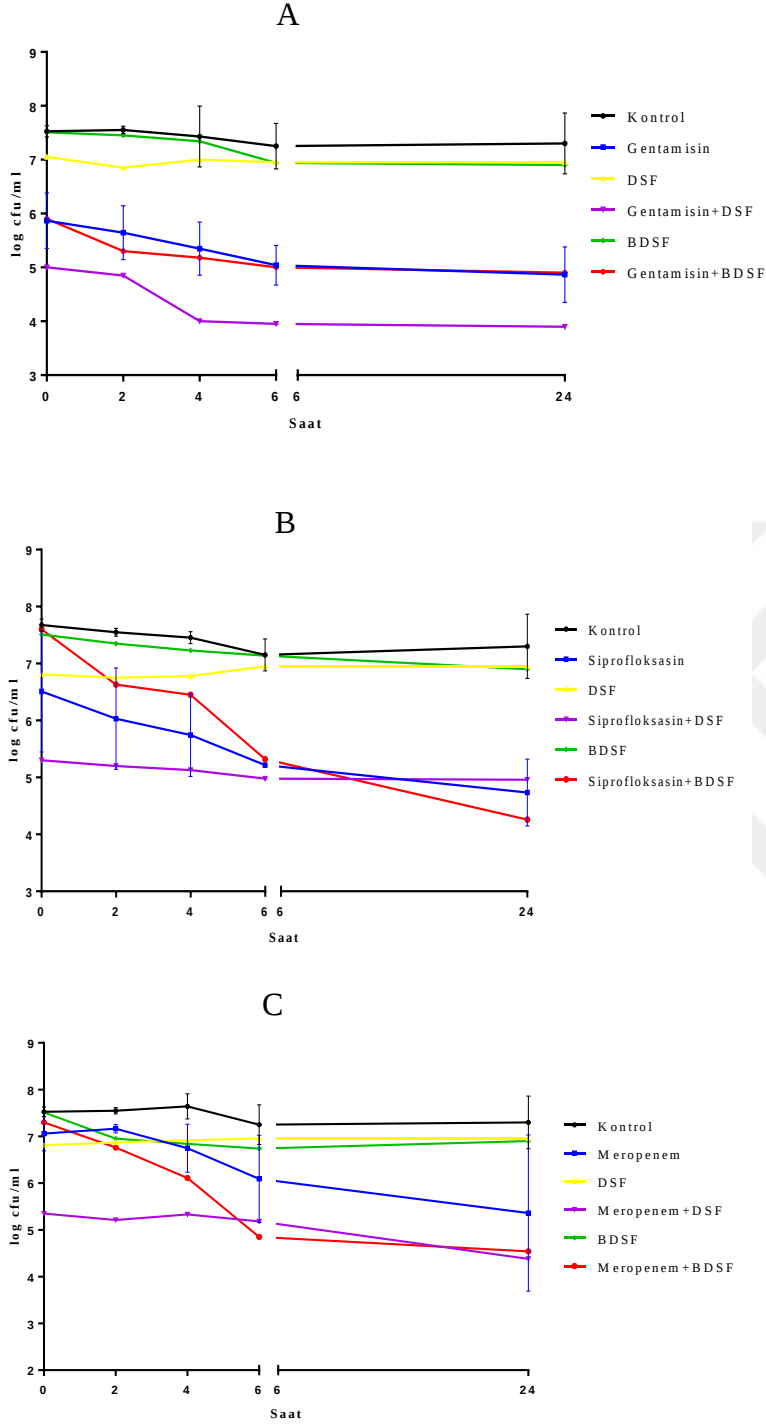
Şekil 4-1: MSSE suşlarının olgun biyofilmlerine karşı a) daptomisin b) vankomisin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler



Şekil 4-2: MSSE suşlarının olgun biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler



Şekil 4-3: MRSE suşunun olgun biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisinin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. Saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler

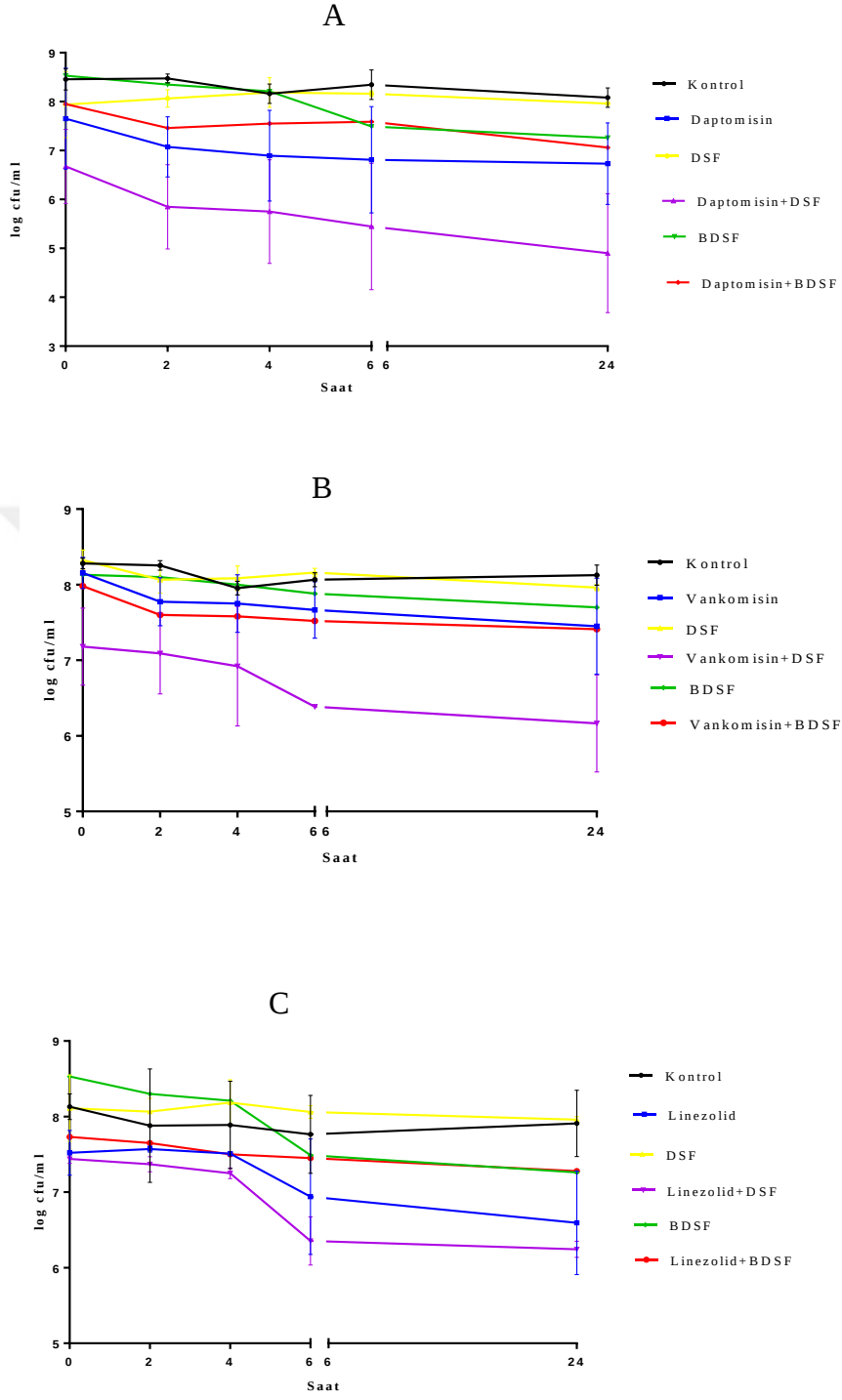


Şekil 4-4: MRSE suşunun olgun biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler

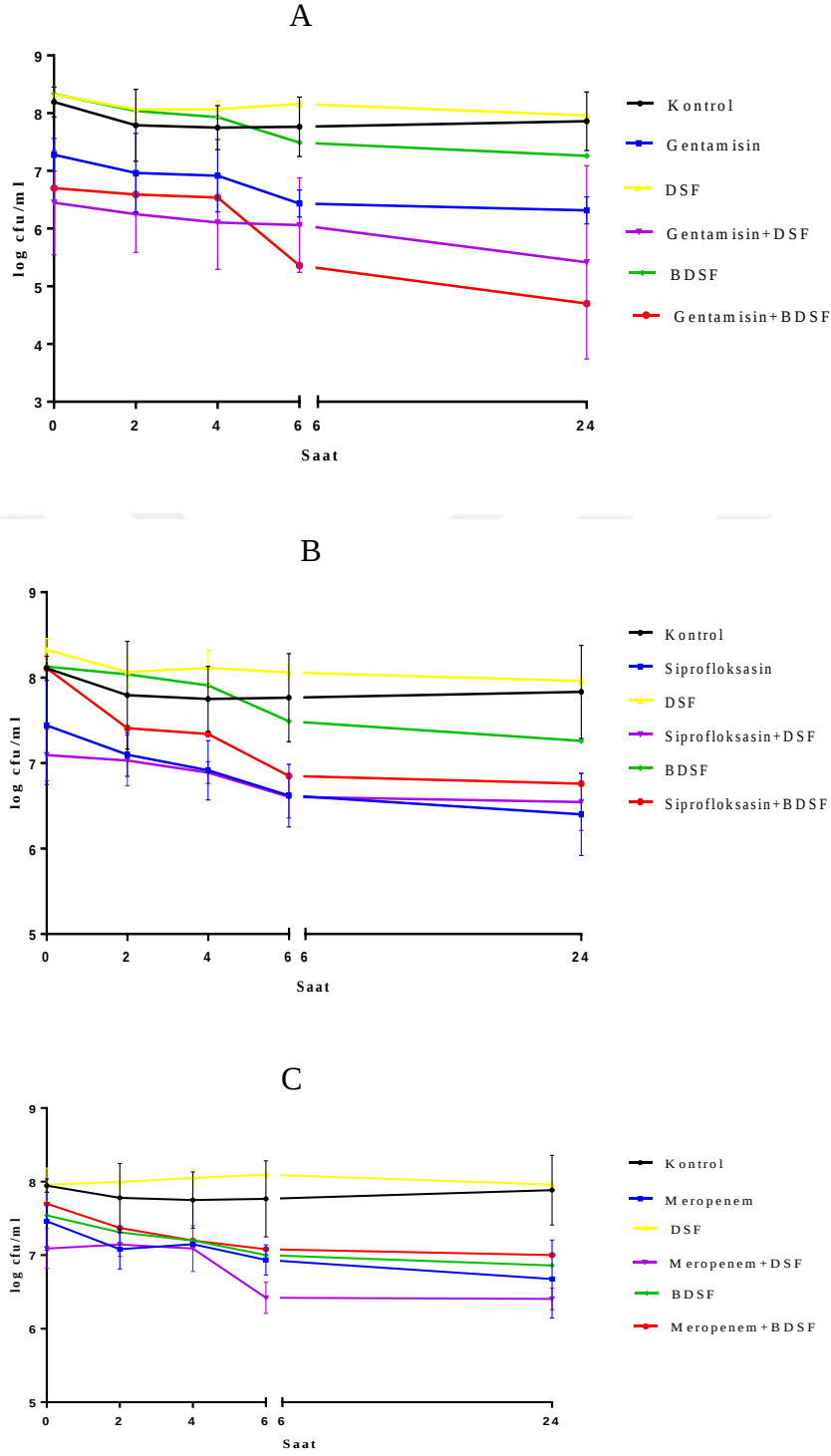
4.5.2. *S.aureus* suşlarına ait bulgular

Çalışmada biyofilm oluşturduğu belirlenmiş 2 MRSA ve bir MSSA suşu seçilmiş, bu suşların olgun biyofilmlerine karşı TKC yöntemi ile QS sinyal molekülleri ile antibiyotiklerin tek başlarına ve kombinasyon halindeki etkileri Şekil 4.5-4.8’de gösterilmiştir.

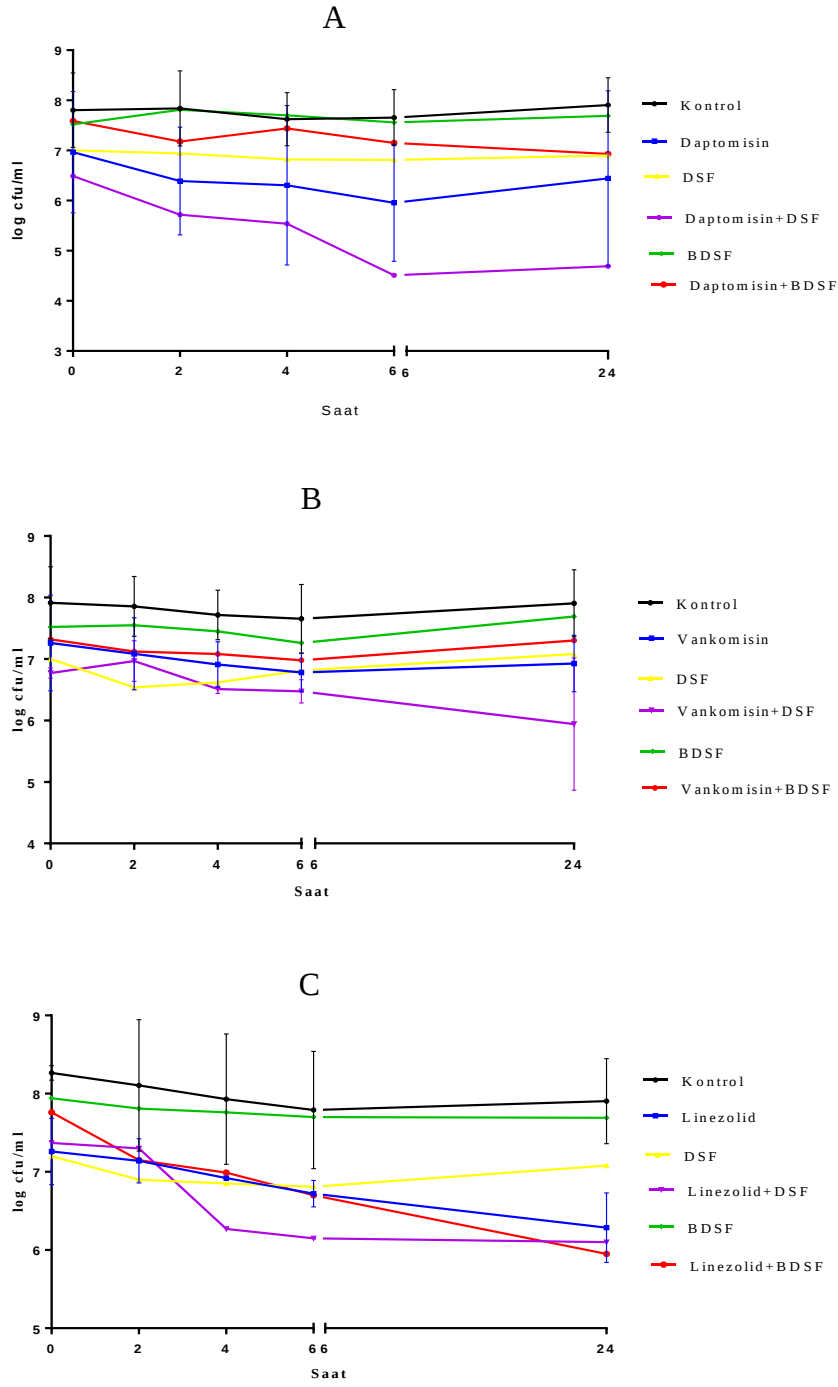
Bu sonuçlara göre DSF sinyal molekülünün, daptomisin veya vankomisinle birlikte MRSA suşlarının biyofilmlerine ait canlı bakteri sayısını $1,5 \log_{10}$, BDSF’nin ise gentamisin ile birlikte 24. saatte $2 \log_{10}$ ’a kadar, DSF’nin daptomisin, vankomisin ve linezolid ile birlikte MSSA suşunun biyofilmlerine ait canlı bakteri sayısını $1,5 \log_{10}$ ’a kadar siprofloksasin ile birlikte $2 \log_{10}$ ’a kadar; BDSF’nin ise gentamisin ile birlikte 24. saatte $1,5 \log_{10}$ ’dan fazla azalttığı tespit edilmiştir.



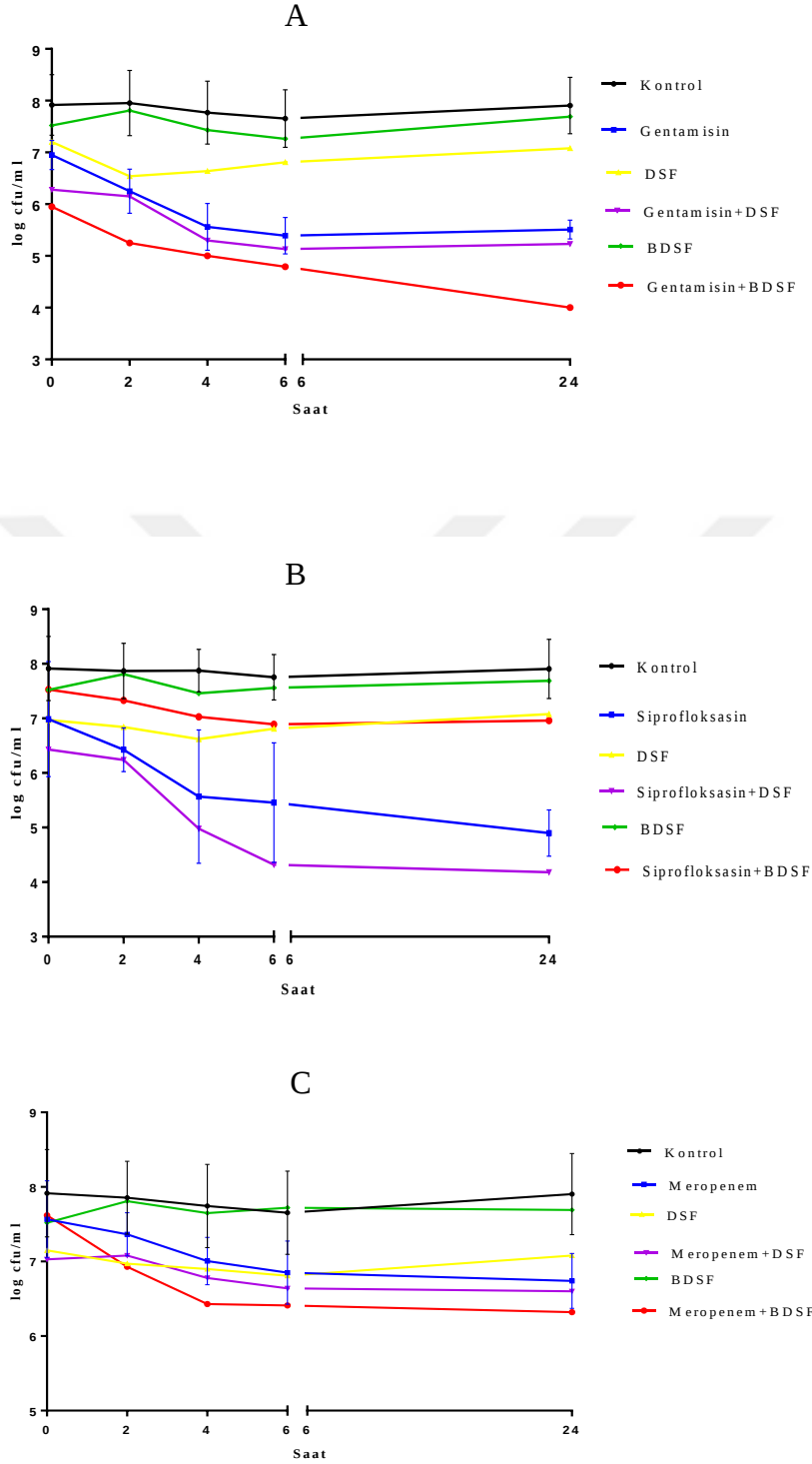
Şekil 4-5: MRSA suşlarının olgun biyofilmlerine karşı a) daptomisin b) vankomisin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler



Şekil 4-6: MRSA suşlarının olgun biyofilmlerine karşı a) gentamisin b) siprofloksasin c) meropenem tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler



Şekil 4-7: MSSA suşunun olgun biyofilmlerine karşı a) daptomisinin b) vankomisin c) linezolidin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler



Şekil 4-8: MSSA suşunun olgun biyofilmlerine karşı a) gentamisinin b) siprofloksasinin c) meropenemin tek başına, DSF veya BDSF molekülleri ile birlikte 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerdeki zamana bağlı öldürme etkisine ait grafikler

5. TARTIŞMA

Gerek ülkemizde gerekse dünyada gün geçtikçe artan antibiyotik direnç oranları, antibiyotiklerin rastgele ve akılcı olmayan kullanımları ile son yıllarda daha da artmış, buna ilave olarak mikroorganizmaların ilaç hedeflerini bozmak, bağışıklık sistemini yanıltmak veya biyofilm gibi dirençli yapılar geliştirmesi gibi nedenlerle dirençli patojenlerin sayısında endişe verici bir artış olmuştur.

Mikroorganizmaların çoğunluğu, stres koşullarına uyum sağlayabilmek için üremenin düzenlenmesi, popülasyondaki heterojenite, proteolitik sistemler gibi farklı tipte sağkalım mekanizmaları geliştirmektedir. Patojen mikroorganizmalar, bu mekanizmalara ilave olarak virülans faktörleri sayesinde konağın çeşitli immün yanıtlarına karşı dayanma ve canlılığını sürdürme kabiliyetine de sahiptir. Bu faktörlerden biri olan biyofilm, polisakkarid, protein ve DNA'dan oluşan bir polimer matriksi içinde gömülü, yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların heterojen bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşan yapılardır. Direnç mekanizmaları, kolonizasyon için uygun ortamın olması, mikrobiyal topluluğun işbirliği ile sağladığı yararlar ve yaşam alanlarındaki olağanüstü büyüme biçimi gibi çeşitli faktörler biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır (Jefferson, 2004).

Biyofilm matriksi, antimikrobiyal ajanlara karşı fiziksel bir bariyer görevi görmekle beraber mikroorganizmaların hayatta kalması için koruyucu bir ortam da oluşturmaktadır. Biyofilm içinde tek bir tür veya birçok mikroorganizma türü bir arada bulunabilmektedir. Biyofilm ile ilişkili hastalıklara neden olduğu bilinen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *C. albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) gibi mikroorganizmaların ilaçlara ve konağın immün sistemine karşı dirençli yapıları nedeniyle ciddi sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır (Kumar ve ark., 2017). *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* gibi klinik açıdan önemli patojenlerin yaklaşık % 80'i orto-dental protezler, kontakt lensler, kardiyovasküler valfler, idrar sondaları, kalp pili ve meme implantları gibi tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonlara yol açmaktadır (Scott, 2009). Bu mikroorganizmalar gerek tıbbi cihazlar gibi abiyotik, gerekse akciğer dokusu gibi biyotik ortamlarda, antimikrobiyal maddelere karşı planktonik formlarına göre 1000 kata kadar daha dirençli olan biyofilm oluşturabilmektedir.

Planktonik formda bulunan bakteriler, antibiyotiklerin hedefleri olan düzenleyici yolları modifiye ederek, antibiyotiklerin parçalanmasını sağlayan enzimleri sentezleyerek, efluks mekanizmaları oluşturarak ya da hücre duvarı bileşenlerini modifiye ederek mevcut olan antibiyotiklere karşı direnç geliştirirler (Siddiqi ve ark., 2004; Wright, 2005). Planktonik hücrelerin bu direnç mekanizmaları ile ilgili literatürde çok sayıda ve detaylı çalışmalar mevcuttur. Buna karşılık biyofilm içinde bulunan mikroorganizmaların planktonik hücrelere göre çok daha ciddi oranlarda bulunan antibiyotik direncinin aydınlatılması konusunda elde edilen veriler henüz çok sınırlıdır. Bu mekanizmaların planktonik formdakilerden farklı olarak genellikle fenotipik adaptasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarla mekanik stres, enzimatik sindirim, pH, oksijen ihtiyacı, sıcaklık ve besin yetersizliği gibi nedenlerin hücrelerin biyofilmden ayrılmasını tetiklediği gösterilmiştir. Bu durumlardan faydalanılarak, günümüzün sağlık alanındaki en önemli amaçlarından biri haline gelmiş olan biyofilm ile mücadele amacıyla çeşitli antibiyofilm stratejileri geliştirilmiştir.

Biyofilmle mücadele amacıyla geliştirilen stratejiler arasında gerek antibiyotikler gibi kimyasal maddeler gerekse fiziksel yöntemler bulunmaktadır. Biyofilmlerin fiziksel olarak ortamdan uzaklaştırılması yada oluşumuna izin verilmemesi amacıyla kayma gerilimini sağlayan jet püskürtme, spreyleme ve fırçalama; soğuk plazma, fotodinamik ve/ veya fototermal terapi, yüzeylerarası gerilimi sağlayan mikrokabarcıklar ve damlacıklar; basınç ve elektrik dalgaları (ultrason, akustik ve lazer şokdalgası) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Koo ve ark., 2017). Kimyasal olarak mikroorganizmaların üremesinin engellenmesi yada öldürülmeleri esasına dayanan yöntemlerde ise birbirinden çok farklı stratejilerle, farklı maddelerin kullanılmaları söz konusudur. Örneğin, tıbbi cihazlarda gümüş kaplama kullanımı bakterinin yüzeye yapışmasını önlemekte, antibiyotiklerden klaritromisin *P. aeruginosa*'da biyofilm matriksi oluşumunu bloke etmekte, siprofloksasin ise biyofilmin genel kalınlığını azaltarak olgunlaşmamış biyofilmi polimorfonükleer nötrofillerin fagositozuna maruz bırakabilmektedir. Streptokinaz enzimi, *S. aureus*'a ait biyofilmin matriks polimerini yok etmekte, AHL QS sinyal molekülleri ise normal biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Yeşil çaydaki epigallocateşin gallat ve polifenol, *P. aeruginosa* biyofilminde amiloid fibrilleri modifiye ederek antibiyotiğin etkisini arttırmaktadır. Bahsedilen maddelerin kullanılmaları sonucunda bağışıklık sistemi elemanları bakteri hücrelerini kolayca fagosit edebilmekte veya antibiyotik duyarlılığı geri kazandırılabilir.

Biyofilme karşı immünolojik yanıtı güçlendirmeyi amaçlayan çalışmalardan birinde güçlü biyofilm oluşturan bakterilerden hazırlanan aşının, Poli-Nasetil- β -glukozamin'e (PNAG) karşı antikorları uyarmakta olduğu ve *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı toleransı arttırdığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2017). Bir başka çalışmada ekstraselüler matriks proteinlerinin, farelere intradermal olarak enjekte edildiğinde hümmoral immün yanıtı indüklemekte ve Th-2 yanıtını arttırmakta olduğu belirlenmiştir. Bu mekanizmalar *S. aureus*'un fagositozunu kolaylaştırmış ve doku içinde biyofilm döngüsünün dağılma aşamasında bakterileri sınırlamıştır (Gil ve ark, 2014). Biyofilmden elde edilen tüm protein lizatının kullanılması spesifik olmayan bir immün yanıtı indüklemesine rağmen, biyofilm ile ilişkili protein (Bap), birikim ile ilişkili protein (Aap) ve yüzey maruz kalan protein gibi spesifik antijenlerin rekombinant formuna spesifik antikorların üretimini de başlatmakta ve bakteriyel üremeyi baskılamaktadır. Bahsedilen immünolojik tedavi rejimleri sırasında antibiyotik ilave edilmesi de bakterilerin uzaklaştırılmasına yardımcı olabilmektedir. (Kumar ve ark., 2017).

Pirazinamid gibi antibiyotikler membran enerjisini tüketerek ve persister hücrelerdeki trans-translasyonu engelleyerek tedavi süresini kısaltmaktadır. (Zhang ve ark., 2003; Shi ve ark., 2011). Bu şekilde persister hücrelerin hedeflenebilmesi, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların ortadan kaldırılma şansını önemli ölçüde artırabilmektedir. Bir çalışmada cis-2-dekanoik asidin metabolik aktiviteyi artırarak persister hücreleri ilaca duyarlı duruma dönüştürdüğü bildirilmiştir. Bu şekilde bir cis-2-dekanoik asit ve antimikrobiyal maddelerin kombinasyonu bakterilerin üremesini engelleyebilmektedir (Marques ve ark., 2014).

İlaç endüstrisinde son yıllarda hızla gelişen ve gerek spesifik bir dokuya ilaç hedefleme gerekse farklı formlarda stabil olamayan bazı aktif maddelerin ilaç olarak kullanılabilmesi gibi çok çeşitli alanlarda yarar sağlayan nanopartiküller, yüzey yükü ve ligand bağlama özellikleri kolaylıkla modifiye edilebilmektedirler. Bu şekilde dizayn edilen nanopartiküller hücre geçirgenliğini, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu veya anahtar enzimlerin rekabetçi inhibisyonunu etkileyerek antimikrobiyal aktivite gösterebilirler. Antibiyotiklerle kıyaslandığında etki şekilleri tamamen farklı olduğundan, bakterilerin nanopartiküllere direnç geliştirme olasılıkları çok daha düşüktür. Örneğin, Fe₃O₄ içeren katalitik nanopartiküller, peroksidaz benzeri umut verici bir aktivite göstermekte ve biyofilm matrisini bozan ve matriksin içinde gömülü bakterileri öldüren serbest radikallerin oluşumunu tetiklemektedir.

P. aeruginosa, konaktan demir alımına yardımcı olan yüksek afiniteli sideroforlara sahiptir. Kistik fibrözlü hastalarda serbest demir genellikle balgam veya akciğerden izole edilen suşlarda tespit edilmektedir. Biyofilmin dispersiyonu için ilaç tedavisinden önce metal şelatların veya D-amino asitlerinin nanomolar konsantrasyonlarının kullanılması, ortamdaki demiri bağlayacağı ve bakterinin kullanımına izin vermeyeceği için *P. aeruginosa* gibi demire ihtiyaç duyan bakterileri ve dolayısıyla bunların oluşturacağı biyofilmi zayıflatmak yeni stratejiler olarak ortaya çıkmaktadır (Banin ve ark. 2006, Kolodkin-Gal ve ark., 2010). Biyofilmlerin dispersiyonunda kullanılan diğer küçük moleküller ise lipozomlar, aptamerler, dendrimerler ve antimikrobiyal peptidlerdir (Koo ve ark., 2017). Bu maddelerin yanı sıra QS sistemleri de yeni ve üzerinde yoğun olarak çalışılan antibiyofilm stratejilerinden bir tanesidir. QS inhibitörleri kullanılarak biyofilm oluşumunda ilk basamak olan hücrelerin agregasyonunun bozulması çok hücreli yapının oluşumunu baskılamaktadır.

Enfeksiyon tedavilerinin vazgeçilmezleri olan antibiyotikler esas olarak mikroorganizmaların üremesini yavaşlatır yada öldürürken, eş zamanlı olarak yukarıda bahsedilen QS inhibitörlerinin, nanopartiküllerin, biyofilm parçalayan ajanların ve antibiyotiklerin kullanımını birleştiren yeni stratejiler, mikrobiyal biyofilm fizyolojisinin çeşitli yönlerini hedefleyerek biyofilmi zayıflatmak ve hatta ortadan kaldırmak için umut vaad edici görünmektedirler. Biz de çalışmamızda, günümüzde hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlarda yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan metisiline dirençli ve duyarlı Stafilokok suşlarının planktonik formları ve olgun biyofilmlerine karşı yeni antimikrobiyal ve antibiyofilm mekanizmalarından kabul edilen DSF ve BDSF gibi QS sinyal moleküllerinin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyon halindeki in vitro etkilerini araştırdık.

Geçmişten günümüze en önemli patojen bakteriler arasında yer alan Stafilokokların, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların en yaygın etkenleri arasında bulundukları bilinmektedir. Stafilokokların ortam koşullarına kolayca uyum sağlayabilmesi, virülans faktörlerinin yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilmesi ve en etkili antibiyotiklere karşı bile hızla direnç geliştirebilmeleri, bu bakterilerle mücadele konusuna ilgiyi arttırmıştır. Stafilokokların direnç geliştirdiği antibiyotiklerin ilk sıralarında yer alan metisilin direnci, günümüzde hala tedavisi güç olan enfeksiyonların en önemli nedenlerindendir. Stafilokokların, antibiyotik direncini arttıran ve tedavisini güçleştiren en önemli virülans faktörlerinden biri de biyofilm oluşturmalarıdır. Özellikle metisiline dirençli Stafilokoklar sıklıkla biyofilmle ilişkili, ciddi ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Normal deri floramızda bulunan ancak uygun ortam oluştuğunda çeşitli enfeksiyonlara yol açabilen *S.epidermidis* de, Stafilokok türleri arasında *S. aureus*'dan sonra günümüzde biyofilmle ilişkili enfeksiyon etkenleri arasında sayılan ikinci en önemli türdür.

Hastanelerde veya toplumda yaygın olan MRSA klonlarının biyofilm oluşturma özelliklerini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin, Cha ve ark.'nın (2011) klinik MRSA suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ve antibiyotiklere olan dirençlerinin incelenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada 86 MRSA suşunun 44'ünün (% 51,2) biyofilm oluşturduğu, bunlardan 8'inin ise güçlü biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Liu ve ark.'nın (2015) yaptıkları çalışmada metisiline dirençli ve duyarlı klinik *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşturma dereceleri incelenmiş, toplam 163 suştan biyofilm oluşturan 23 MRSA suşunun 5'inin güçlü, 3'ünün orta; 18 MSSA suşunun 2'sinin güçlü, 3'ünün orta; 28 MRSE suşunun 8'inin güçlü, 9'unun orta; 14 MSSE suşunun ise 4'ünün güçlü, 3'ünün orta biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Metisiline duyarlı ve dirençli suşların biyofilm oluşturma dereceleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda da diğer araştırmacılara benzer şekilde, hastanelerin çeşitli ünitelerindeki farklı hastaların kan, yara ve burunlarından izole edilmiş 4 adet klinik MRSA suşundan birinin zayıf, üçünün ise güçlü, 6 adet MSSA suşunun ise üçünün güçlü, ikisinin orta ve birinin zayıf biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. 4 adet klinik MSSE suşunun birinin güçlü biyofilm 3'ünün zayıf, MRSE suşunun ise zayıf biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşturan suş burundan izole edilmiştir.

Çeşitli ülkelerde metisiline duyarlı ve dirençli klinik Stafilokok suşlarına karşı çeşitli antibiyotiklerin güncel duyarlılık durumlarını takip etmek ve bu antibiyotiklerin tedaviye uygunluklarını belirlemek amacıyla minimum inhibitör ve minimal bakterisit konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalara devam edilmektedir. Örneğin; Cha ve ark.'nın (2011) yaptıkları bir çalışmada güçlü biyofilm oluşturan 8 MRSA suşunun çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemiyle incelenmiştir. MİK ve MBK aralıkları sırasıyla vankomisin için 0,25-1; 0,5->128 µg/ml; gentamisin için 0,25-64; 0,5->128 µg/ml; linezolid için 2-4; >128 µg/ml; daptomisin için ise 0,125; 0,125-0,25 µg/ml şeklinde gösterilmiş, bu sonuçlarına göre en etkili antibiyotik daptomisin olarak belirtilmiştir. Bir başka çalışmada Holmes ve ark. (2007) tarafından, invaziv klinik MRSA suşlarına karşı 11 adet antimikrobiyal ajanın inhibitör etkileri ile vankomisin ve daptomisinin bakterisidal

etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre MİK aralıkları vankomisin için 0,38-1,5; daptomisin için 0,25-1; siprofloksasin için 0,25->16; linezolid için 1-4; gentamisin için ise 0,12->8 µg/ml olarak ortaya koyulmuş olup bu sonuçlara göre MİK aralıkları en geniş antibiyotikler siprofloksasin ve gentamisin olmuştur.

Çalışmamızda, biyofilm oluşturabilen 4 *S. aureus* suşuna karşı yapılan antibiyotik duyarlılık deneylerinde bulunan MİK aralıkları, diğer araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde vankomisin için 0,5-1; gentamisin için 0,25-256; linezolid için 0,5-2; siprofloksasin için 0,25-1; meropenem için 0,5-64; daptomisin için ise 0,5 µg/ml olup, bu sonuçlara göre en düşük MİK değerine sahip antibiyotik siprofloksasin, en geniş MİK aralığına sahip antibiyotik ise gentamisin olarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki MBK aralıkları ise vankomisin için 0,5-1; gentamisin için 0,5->256; linezolid için >8; siprofloksasin için 0,5-2; meropenem için 1->64; daptomisin için ise 0,5-1 µg/ml olarak bulunmuş olup bu değerlerin bakterisidal etkili antibiyotikler için beklendiği gibi genellikle MİK değerlerine eşit yada bu değerlerin iki katı oldukları tespit edilmiştir.

Hellmark ve ark.'nın (2015) yaptıkları bir çalışmada prostetik eklem enfeksiyonlarından izole edilmiş 33 adet klinik *S. epidermidis* suşuna karşı çeşitli antibiyotiklerin MİK aralıkları belirlenmiştir. Bu değerler gentamisin için 0,032->256, vankomisin için 0,5-3, linezolid için 0,047-0,38, daptomisin için 0,094-1,5 ve siprofloksasin için 0,047->32 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da benzer olarak 3 klinik *S. epidermidis* suşuna karşı MİK/MBK aralıkları gentamisin için 0,125-32, vankomisin için 1-2/ 1-4, linezolid için 1/ >8, daptomisin için 0,5/ 0,5-1, siprofloksasin için 0,25-64/ 0,25-64 ve meropenem için 2-16/ 2-32 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar *S. epidermidis* suşlarının genel olarak gentamisin, meropenem ve siprofloksasine dirençli, daptomisin, linezolid ve vankomisine ise duyarlı olduklarını göstermiştir.

Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıkları genel olarak oluşturmayanlara göre daha azdır, çünkü biyofilm matriksi kompleks yapısından dolayı antibiyotiklerin penetrasyonuna önemli bir engel oluşturmakta, bu durum da tedavi seçeneklerini sınırlandırmaktadır. Biyofilmle ilişkili enfeksiyonları önlemek için ideal yaklaşım, henüz biyofilm oluşmadan gerekli önlemleri alarak biyofilm oluşumunun engellenmesidir ki bu amaçla, yukarıda ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi kateter / implant yüzeylerinin antimikrobik maddelerle kaplanması yada fiziksel olarak yüzey geriliminin

arttırılması, mikroorganizmaların yüzeylere yapışmasını engellemek için sub-inhibitör konsantrasyonlarda antimikrobiyal kullanımı gibi klasik ve yeni geliştirilen stratejiler uygulanmaktadır. Ancak her zaman biyofilm oluşumunu öngörerek bu önleyici tedavileri kullanmak mümkün olamadığı gibi, bazen de uygulansalar bile başarılı sonuçlar elde edilemediğinden, olgun biyofilm oluşumu kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu durumlarda biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisine katkı sağlamak amacıyla antibiyotiklerin mikroorganizmaların olgun biyofilmlerine karşı olan inhibitör ve daha da önemlisi eradike edici konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Cha ve ark.'nın (2011) yaptıkları çalışmada vankomisin, gentamisin ve linezolidin klinik MRSA suşlarına karşı MBİK aralıkları 32->128; daptomisinin ise 0,5->64 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmada zayıf ve güçlü biyofilm oluşturan suşlar karşılaştırıldığında MİK, MBK ve MBİK değerlerinin nerdeyse aynı olduğu, sadece birkaç suşa karşı daptomisin ve linezolidin diğer antibiyotiklere göre daha düşük MBİK değerlerine sahip oldukları bildirilmiştir. Smith ve ark.'nın (2009) yaptıkları bir çalışmada daptomisin ve vankomisinin MRSA biyofilmlerine karşı klindamisin, linezolid ve tigesiklinden daha etkili oldukları gösterilmiştir. Laplante ve ark.'nın (2009) yaptığı çalışmada ise televansin ve vankomisinin biyofilm oluşturan stafilokok suşlarına karşı etkileri incelenmiş, MBİK aralığı 4-16, MBİK aralığı ise 2->256 µg/ml olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda *S. aureus* suşlarına karşı MBİK/ MBİK aralıkları sırasıyla daptomisin için 40-80/160->5120; siprofloksasin için 20-40/ 80->5120; vankomisin için 80-5120/>5120, linezolid için 20-40/>5120, gentamisin için 80-5120/>5120 ve meropenem için 40-160/>5120 µg/ml olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre daptomisin, diğer çalışmalarla da paralel şekilde, MBİK değeri en düşük antibiyotik olup linezolid ve vankomisinin değerleri ise benzerdir. Daptomisinin, kalsiyuma bağımlı bir şekilde bakterinin sitoplazma zarına yerleşip zarın bozulmasına neden olması ve siklik lipopeptid yapısı nedeniyle biyofilme daha iyi penetre olabildiği, buna karşılık vankomisinin büyük bir molekül yapısına sahip olması ve linezolidin de bakteriyostatik etkili bir ajan olması nedeniyle biyofilm üzerine etkilerinin sınırlı kaldığı düşünülmektedir.

Pettit ve ark.'nın (2005) yaptıkları çalışmada *S. epidermidis* ATCC 35984 suşuna karşı gentamisin ve vankomisin için MBİK değerleri >4096 µg/ml olarak bildirilmiştir. Reiter ve ark.'nın (2013) çalışmasında çeşitli klinik MRSE suşlarına karşı gentamisin, linezolid ve

vankomisinin etkileri araştırılmış, sonuçlara göre linezolidin ulaşılabilir konsantrasyonlarda (2- 128 µg/ml) MRSE biyofilminin inhibisyonunda diğer antibiyotiklere göre oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Leite ve ark.'nın (2011) yaptıkları çalışmada ise iki klinik *S. epidermidis* suşunun planktonik hücrelerine ve olgun biyofilmine karşı daptomisin, linezolid ve rifampisin etkisi incelenmiş, sonuç olarak serum pik konsantrasyonunda daptomisinin *S. epidermidis*'in olgun biyofilmine karşı en etkili ajan olduğu bildirilmiştir

Çalışmamızda *S. epidermidis* suşlarının MBİK/MBEK aralıkları daptomisin için 10-640/>5120, vankomisin için 80-640/ >5120, linezolid için 10-640, gentamisin için 80-5120/1280->5120, siprofloksasin için 40-160/ 640->5120, meropenem için 80-160/ 1280->5120 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar *S. epidermidis* biyofilmlerinin antibiyotiklere duyarlılıklarının suşa özgü olabileceğini, daptomisinin, *S. aureus* suşlarındakine benzer şekilde biyofilme karşı etkili olmasına rağmen, *S. epidermidis* suşlarının olgun biyofilmlerine karşı en etkili antibiyotiğin siprofloksasin olduğunu göstermektedir. DNA giraz ve topoizomeras IV enzimlerini inhibe ederek DNA hasarına neden olan ve hızlı bakterisidal etkili bir antibiyotik olan siprofloksasinin, biyofilm tabakasına en iyi penetre olan antibiyotiklerden olduğu, yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Singh ve ark., 2010).

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerimizin MBİK değerlerinin, aynı suşlara ait MİK değerleri ile kıyaslandığında *S. aureus* için ortalama 20-320 kat, *S. epidermidis* için ise 10-640 kat fazla antibiyotik gerektirdiği; MBEK değerlerimizin ise *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşları için sırasıyla 320->10000 ve 80->10000 kat fazla olduğu görülmektedir. Gerek çalışmamızda, gerekse başka araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışmada elde edilen bu değerler, antibiyotiklerin toksik olmayan serum konsantrasyonlarının çok üzerinde olup, tedavide uygulanma şansları bulunmamaktadır. Bu durumun üstesinden gelebilmek için antibiyotiklerin birbirleriyle yada farklı özelliklerdeki çeşitli kimyasal maddelerle kombine olarak kullanılmaları ümit verici alternatif tedavi yöntemlerindendir.

QS sinyal moleküllerinin mikroorganizmaların çeşitli biyolojik fonksiyonlarını düzenlemekle birlikte, tür içi iletişim, türler arası etkileşim ve rekabette rol oynadıkları bilinmektedir. Hastalıkların ortaya çıkışına neden olan mikroorganizmaların virülans faktörleri de bu sinyal molekülleri aracılığıyla düzenlenebilmektedir. QS sinyal moleküllerinin, bakterilerin kendilerine zarar vermediği halde diğer mikroorganizmaları öldüren bakteriyosinlerine benzer mekanizma ile kendilerini salgılayanın dışındaki

bakterilerin iletişimine engel oldukları, bu bakterilerin agregasyonunu ve dolayısıyla biyofilm oluşumunu inhibe edebildikleri gösterilmiştir. Bu bilgiden hareketle, QS sinyal molekülleri ile antibiyotiklerin birlikte kullanımları ile, antibiyotiğin gerek planktonik formdaki bakterilere gerekse biyofilme olan etkinliğinin arttırıldığı ortaya konmuştur.

Deng ve ark.'nın (2014) yaptıkları bir çalışmada QS sinyal moleküllerinden olan DSF ve yapısal ilişkili moleküllerin bazı patojen bakterilere karşı antibiyotiklerin etkinliklerini arttırdıkları bildirilmiştir. DSF ailesi sinyallerinin bir çoğunun aminoglikozid grubu bir antibiyotik olan ve ribozomun 30 S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eden gentamisinle çok iyi sinerjizm gösterdiği belirtilmiştir. T-14-DSF veya C-15-DSF, gentamisinin *B. cereus*'a karşı olan MİK değerini 8 µg/ml'den 0,625 µg/ml'ye indirmiş yani 128 kat azaltmıştır. Benzer olarak T-14 DSF, yine bir aminoglikozid grubu antibiyotik olan kanamisin ile sinerjist etki göstererek *B. cereus*'un duyarlılığını 2-64 kat, rifampisinle ise daha zayıf bir sinerjizm oluşturarak 4 kata kadar arttırmıştır. Gentamisin ve kanamisinden farklı olarak rifampisin bakteri hücrelerindeki DNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek gen transkripsiyonunu, dolayısıyla RNA moleküllerinin oluşumunu ve protein sentezi için gerekli translasyonu engellemektedir.

Aynı çalışmanın sonuçlarına göre DSF sinyalinin *B. cereus*'un gentamisin ve kanamisine karşı duyarlılığına etkisi sinyal molekülünün son konsantrasyonuna bağlıdır. DSF'nin 5-50 µM konsantrasyonlarda eklenmesiyle *B. cereus*'un gentamisine duyarlılığı 2-16, kanamisine 4-16 kat; C13-DSF'nin 10-50 µM konsantrasyonlarda eklenmesiyle ise gentamisine 2-32, kanamisine 2-16 kat artmıştır.

DSF sinyalleri *B. cereus*'un ilaç direnci, biyofilm oluşumu ve persistansı gibi özelliklerini engellemektedir. Bu sinyallerin *B. cereus* üzerine etki mekanizmasını aydınlatmak için DSF varlığında *B. cereus* ATCC 10987'nin global gen ekspresyonu özellikleri mikroarray yöntemiyle analiz edilmiş olup, bir seri ilaç efluks sistemini ve direnç proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyon seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Bu durum *B. cereus*'un üreme oranını fazla etkilemese de antibiyotik direncini azaltabildiği gösterilmiştir. DSF sinyal molekülünün 50 µM konsantrasyonda eklenmesiyle biyofilm oluşumunun büyük ölçüde inhibe edildiği, persistans oranının ise 4 ve 8 saat inkübasyonun ardından sırasıyla 5,5 ve 8,5 kat azaldığı gösterilmiştir. DSF molekülü 50 µM konsantrasyonda olacak şekilde eklendiğinde *Bacillus thurigiensis*'e karşı ampisilin,

rifampisin, kanamisin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprimin MİK değerlerini sırasıyla 4, 4, 16, 16, 2, 2 ve 4 kat azaltmış; *S. aureus*'a karşı ampisilin, kanamisin ve gentamisinin MİK değerlerini 2, 2 ve 8 kat; *Mycobacterium smegmatis*'in kanamisin, gentamisin, kloramfenikol ve trimetoprimine karşı duyarlılığını 4, 2, 2 ve 2 kat arttırmıştır. Ayrıca kanamisin ve gentamisinin *Neisseria sublava* ve *P.aeruginosa*'ya karşı MİK değerlerini de 2'şer kat azaltmış, ancak bu bakterilerin diğer antibiyotiklere duyarlılığını etkilememiştir. Bu sonuçlara göre DSF'nin sinerjist etkisi antibiyotiğe ve türe özgü olarak değişmektedir (Deng ve ark. 2014).

Çalışmamızda klinik Stafilokok suşlarına karşı 0,5 μ M gibi düşük konsantrasyonda denenilen DSF'nin, vankomisin ve linezolidin MİK değerini 2, siprofloksasin ve meropenemin 4, gentamisinin ise 8 kata kadar azalttığı gösterilmiştir. Daptomisinin MİK değerine ise herhangi bir etki gözlenmemiştir. DSF türevlerinden olan BDSF'nin 0,5 μ M konsantrasyonda eklenmesinin ise tüm suşlarında vankomisinin etkisini 2, siprofloksasinin 4 kat; *S. aureus* suşlarında linezolidin etkisini 4, gentamisinin 16 kat; bir MSSE suşunda daptomisinin MİK değerini 2 kat; diğer *S. epidermidis* suşlarında ise linezolidin MİK değerini 16, gentamisinin 32, meropeneminkini ise 32 kata kadar azaltabildiği gözlenmiştir.

QS sinyal moleküllerinin konsantrasyona bağlı olarak mikroorganizmalara ait biyofilmlere oluşum aşamasında etki ettiklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Boon ve ark.'nın (2008) yaptıkları bir çalışmada farnesol ile yapısal ilişkili olan ve DSFye çok benzeyen BDSF'nin *C. albicans*'daki biyofilm oluşumunda önemli bir faktör olan germ tüp (çimlenme borusu, gerçek hif) oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Farnesol 5 μ M son konsantrasyonda BDSF ve DSF molekülleri sırasıyla germ tüp oluşumunu yaklaşık % 60 ve % 12 azaltmıştır. Ayrıca BDSF 0,5 μ M konsantrasyonda *C. albicans*'ın hif uzamasını %15 azaltmış, 100 μ M gibi yüksek konsantrasyonda ise üremesini tamamen inhibe etmiştir.

Dean ve ark.'nın (2015) yaptıkları bir çalışmada BDSF'nin 5 μ M gibi düşük konsantrasyonda *Francisella novicida*'nın biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği, antibiyofilm aktivitesinin konsantrasyona bağımlı olduğu ve ayrıca 50 μ M gibi yüksek konsantrasyonda ise olgun biyofilmi parçaladığı bildirilmiştir. Deng ve ark.'nın (2013) yaptıkları çalışmada ise BDSF'nin *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu ve virülans faktörlerinin üretimini engellediği bildirilmiştir. Buna göre BDSF'nin 0,05; 0,1; 0,25 ve 0,5

mM konsantrasyonlarda eklenmesinin *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu sırasıyla % 10,2; % 20,2; % 27,9 ve % 44 oranında azalttığı gösterilmiştir.

QS sinyal moleküllerinin sadece biyofilm oluşumunu engellemekle kalmadığı, aynı zamanda düşük konsantrasyonlarda dahi antimikrobiyal ajanlarla kombine edildiklerinde olgun biyofilmlerin dispersiyonunu tetiklediklerini ve antibiyotiğin biyofilme olan etkisini arttırdığını kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. Örneğin Sepehr ve ark.'nın (2014) yaptıkları bir çalışmada *P. aeruginosa* tarafından üretilen ve DSF gibi doymamış bir yağ asidi olan cis-2-dekenoik asidin (CDA) *E. coli*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *B. cereus* gibi gıda patojeni çeşitli mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilmlerin dispersiyonunu indüklediği bildirilmiştir. Çalışmada 310 nM CDA'nın antibiyotik ve dezenfektanlarla birlikte kullanıldıklarında mikroorganizmaların biyofilm kütlelerinde % 80'e kadar bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *S. aureus*'un olgun biyofilmine karşı 1 µg/ml siprofloksasin tek başına biyofilm kütlelerinde % 11'lik bir azalmaya neden olurken 310 nM CDA ve siprofloksasin birlikte olgun biyofilme 1 saat muamele edildiğinde % 87'lik bir azalma görülmüştür.

Rahmani-Badi ve ark.'nın (2014) yaptıkları bir çalışmada ise *K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin tek tür ve miks biyofilmlerine karşı ampisilin tek başına biyofilm kütlelerinde % 21'lik bir azalmaya neden olurken, 310 nM CDA ile kombinasyonu % 78'lik bir azalma sağlamıştır. Siprofloksasin ve CDA kombinasyonu ise tek tür içeren biyofilm kütlelerinde % 90, miks biyofilmin kütlelerinde ise yaklaşık % 80'lik bir azalma meydana getirmiştir. Aynı çalışmada üriner kateterlerde oluşturulan 120 saatlik biyofilmler antibiyotiklerle tek başına muamele edildiğinde kontrole göre canlı bakteri sayısında 2 kat, 310 nM CDA 256 µg/ml ampisilin veya 1 µg/ml siprofloksasin ile birlikte uygulandığında ise 4 kat azalma olduğu gösterilmiştir. Bu veriler CDA'nın sadece polistiren yüzeye sahip mikropoplaklarda değil, silikon yüzeyli üriner kateterlerdeki biyofilmleri de uzaklaştırabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda QS sinyal moleküllerinden DSF ve BDSF'nin 0,5µM gibi çok düşük konsantrasyonları ile antibiyotik kombinasyonlarının Stafilokokların olgun biyofilmleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Diğer araştırmacıların sonuçlarıyla paralel şekilde DSF vankomisin MBK değerini 4 , linezolidin 2, gentamisin 4 ve meropeneminkini 8 kat; BDSF ise vankomisin MBK değerini 8, linezolidin 2, siprofloksasinin 4, gentamisin 64 ve meropeneminkini 4 kata kadar azaltmıştır.

Çalışmamızda Stafilokokların olgun biyofilmlerine karşı antibiyotiklerin tek başına ve QS sinyal molekülleri ile birlikte MİK ve MBEK değerlerinin belirlenmesi ile bu maddelerin etkinlikleri konusunda önemli bilgiler edinilmiştir. Ancak bu deneyler ile antimikrobiyal maddelerin ancak 24. saatteki etkileri belirlenebilmiş olup bu etkinin zamanlaması ve bakterilerin ölüm oranlarıyla ilgili herhangi bir sonuç elde edilememektedir. Bu problemi aşmak ve antibiyotiklerin tek başına ve QS sinyal molekülleriyle beraber olgun biyofilm üzerine ne kadar sürede ve ne kadar etki ettikleri ile ilgili bilgi edinmek amacıyla zamana bağlı öldürme deneyleri yapılmıştır.

TKC yöntemiyle elde edilen sonuçlarına göre antibiyotiklerin tek başına olan etkilerine kıyasla DSF, MSSA suşlarının biyofilmdeki canlı bakteri sayısını siprofloksasinle birlikte 2 ve 6. saatler arasında yaklaşık 2 log₁₀ ve daptomisin veya gentamisinle 6. saate kadar 1 log₁₀; MRSE suşlarına karşı vankomisinle birlikte ilk 2 saatte 2 log₁₀, gentamisin veya siprofloksasinle yine ilk 2 saatte 1 log₁₀ ve linezolid veya meropenemle ilk 6 saatte 1 log₁₀; MSSE suşlarına karşı ise siprofloksasinle birlikte ilk 2 saatte 1 log₁₀, 4. saatte 2 log, meropenemle ilk 4 saatte 1,5 log, vankomisinle ilk 6 saatte 1,5 log ve daptomisinle ilk 4 saatte 1 log₁₀ azaltmıştır. BDSF ise, MRSA suşlarının biyofilmdeki canlı bakteri sayısını antibiyotiklerin tek başına olan etkilerine kıyasla linezolid veya gentamisinle birlikte 4 ve 6. saatler arasında 1 log₁₀; MSSA suşlarına karşı linezolid veya gentamisinle birlikte 6. saate kadar 1 log ve meropenemle ilk 4 saatte 1 log₁₀; MRSE suşlarına karşı meropenemle birlikte ilk 6 saatte 1 log₁₀; MSSE suşlarına karşı ise gentamisinle birlikte ilk 6 saatte 2 log₁₀'a kadar azaltmıştır. Bu sonuçlara göre QS sinyal moleküllerinin antibiyotikler ile kombinasyon şeklinde olgun biyofilmlere ait canlı bakteriler üzerine ilk 6 saatte belirgin bakterisidal etki gösterdikleri tespit edilmiştir.

TKC deneylerimizin 24. saatteki sonuçlarına göre DSF, *S. aureus* suşlarının olgun biyofilmlerine ait canlı bakteri sayısını, antibiyotiğin tek başına olan etkisine kıyasla daptomisin ile birlikte 1 log₁₀, vankomisin yada gentamisinle ise yaklaşık 1,5 log₁₀; BDSF ise gentamisinle birlikte 2 log₁₀ kadar azaltmıştır. *S. epidermidis* suşlarının olgun biyofilmlerine ait canlı bakteri sayısını DSF'nin vankomisin ile birlikte 1 log₁₀'dan fazla; BDSF'nin ise meropenemle birlikte 2 log₁₀'dan fazla azaltabildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *S. aureus* suşları için en etkili kombinasyonların gentamisin ile BDSF, *S. epidermidis* suşları için ise vankomisin ile DSF veya meropenem ile BDSF olabileceği görüşündeyiz.

Sonuç olarak;

Çalışmamızda kullanılan DSF, BDSF gibi QS sinyal moleküllerinin mikroorganizmaların hem planktonik hem de biyofilm formlarına karşı çeşitli antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldıklarında, gerek molekülün veya antibiyotiğin yapısı ve konsantrasyonuna, gerekse mikroorganizmanın türüne ve metabolik durumuna bağlı olarak farklı kademelerde etkili olabildikleri görülmektedir. Her ne kadar bu sinyal moleküllerinin tam olarak nasıl etki ettiklerine dair henüz yeterince ve net bilgiler bulunmasa da, bu moleküllerin bakterilerce salgılanan ve kendisini salgılayan tür içindeki haberleşmeyi sağlayarak biyofilm oluşumunu kolaylaştırıcı maddeler oldukları düşünüldüğünde, ait oldukları türün biyofilm oluşturmalarını kolaylaştırırken diğer tür bakteri ya da mantarların çoğunluğu algılamalarını bozarak biyofilm oluşumunu bloke ettikleri yada bu biyofilmlerin dispersiyonunu artırarak etki gösterdikleri tahmin edilmektedir.

Son zamanlarda üzerlerinde gittikçe daha çok çalışma yapılmaya başlanan QS sinyal moleküllerinin farklı türevlerinin, farklı konsantrasyonlarda kullanılarak antimikrobiyal ajanlarla kombine edilmesi ve daha fazla patojen bakteri suşuna karşı etkilerinin gerek in vitro gerekse in vivo yöntemlerle araştırılması ile yapı ve etki mekanizmalarının net bir biçimde aydınlatılacağı ve yakın gelecekte yeni tedavi seçenekleri arasında yer alabilecekleri gibi biyofilm kontrolü için yaygın uygulamalara sahip endüstri ve sağlık sektörü için de yeni stratejilerden biri olabilecekleri düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Almeida, R.P.P., Killiny, N., Newman, K.L., Chatterjee, S., Ionescu, M. ve ark. (2012) Contribution of *rpfB* to cell-to-cell signal synthesis, virulence, and vector transmission of *Xylella fastidiosa*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **6**, 453-462.
- Amari, D.T., Marques, C.N.H., Davies, D.G. (2013). The putative enoyl-coenzyme A hydratase DspI is required for production of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion autoinducer *cis*-2-decenoic Acid. *Journal of Bacteriology*, **195**, 4600-4610.
- An, S.Q., Febrer, M., McCarthy, Y., Tang, D.J., Clissold, L. ve ark. (2013). High-resolution transcriptional analysis of the regulatory influence of cell-to-cell signalling reveals novel genes that contribute to *Xanthomonas* phytopathogenesis. *Molecular Microbiology*, **88**, 1058-1069.
- Archer, G.L., (1998). *Staphylococcus aureus*: A well armed pathogen, *Clinical Infectious Diseases*; **26**, 1179-81.
- Barber, C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson, T.J.G., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P. and Daniels, M.J. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, **24**, 555-556.
- Barry, A.L. ve ark., (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1999). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents-Approved Guideline, M26-A, NCCLS, Wayne, Pa, USA, **19(18)**, 1-29.
- Beaulieu, E.D., Ionescu, M., Chatterjee, S., Yokota, K., Trauner, D. ve ark. (2013). Characterization of a diffusible signaling factor from *Xylella fastidiosa*. *MBio.*, **4(1)**, e00539-12. doi: 10.1128/mBio.00539-12.
- Berkiten, R. (2005) Gram pozitif koklar: *Staphylococcus*, İçinde. E. Bozkaya (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji 2*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.Nobel Matbaacılık; pp. 2-10.
- Berube, B.J., Bubeck Wardenburg, J. (2013). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)*, **5**, 1140–1166.
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Reviews*, **55**, 733–51.
- Bi, H., Christensen, Q.H., Feng, Y., Wang, H., Cronan, J.E. (2012) The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase

- homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Molecular Microbiology*, **83**, 840-855.
- Bi, H., Yu, Y., Dong, H., Wang, H. and Cronan, J.E. (2014) Xanthomonas campestris RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. *Molecular Microbiology*, **93**, 262-275.
- Boon C., Deng, Y., Wang, L.-H., He, Y., Xu, J.-L., Fan, Y. Pan, S.Q. and Zhang, L.H. (2008) A novel DSF-like signal from Burkholderia cenocepacia interferes with Candida albicans morphological transition. *ISME Journal*, **2**, 27-36.
- Boucher, H., Mille, L.G., Razonable R.R. (2010). Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clinical Infectious Diseases*; **51**(2), 183-197.
- Caicedo, J. C., Villamizar, S., Ferro, M. I. T., Kupper, K. C., Ferro, J. A. (2016) Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell–cell signalling in Xanthomonas citri and reduce citrus canker disease severity. *Plant Pathology*, **65**, 782–791.
- Caly, D.L., Bellini, D., Walsh, M.A., Dow, J.M., Ryan, R.P. (2015) Targeting cyclic di- GMP signalling: a strategy to control biofilm formation? *Current Pharmaceutical Design*, **21**, 12-24.
- Carmody, A.B. and Otto, M. (2004) Specificity grouping of the accessory gene regulator quorum-sensing system of Staphylococcus epidermidis is linked to infection. *Archives of Microbiology*, **181**(3), 250-3
- Cha, J.O., Park, Y. K., Lee, Y. S., Chung, G. T. (2011). In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones prevalent in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.11.018>
- Chatterjee, S., Newman, K.L., Lindow, S.E. (2008b) Cell-to-cell signaling in Xylella fastidiosa suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1309-1315.
- Chatterjee, S., Wistrom, C. and Lindow, S.E. (2008a) A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of Xylella fastidiosa. *Proceedings of National Academic Science USA*, **105**, 2670-2675.
- Chen, C. , Chen, Y. , Wu, P., Chen, B. (2013) .Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. *Journal of the Formosan Medical Association*, **113**, 72-82

- Cheng, Z., He, Y.-W., Lim, S.C., Qamra, R., Walsh, M.A., Zhang L. H. and Song, H. (2010) Structural basis of the sensor-synthase interaction in autoinduction of the quorum sensing signal DSF biosynthesis. *Structure*, **18**, 1199-1209.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E. ve ark.(1994). Diminished virulence of a sar/agr mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *The Journal of Clinical Investigation*, **94**,1815–22.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E., Yeaman, M.R., Sullam, P.M. (1994) Diminished virulence of a sar-/agr-mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *The Journal of Clinical Investigation*, 94, 1815–1822.
- Claessens, J., Roriz, M., Merckx, R., Baatsen, P., Van Mellaert, L., & Van Eldere, J. (2015). Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(4), 368–375
- Claret L., Miquel S., Vieille N., Ryjenkov D.A., Gomelsky M., ve ark. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 33275–83.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Seventh Edition, Approved Standard M7-A7, CLSI, Wayne, Pa, USA, 2006.
- Costerton, J.W. (2015). A short history of the development of the biofilm concept. İçinde M. Ghannoum(Ed.), *Microbial Biofilms; 2th Ed.*, Washington, DC, USA: ASM Press; pp.4-19.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284** (5418), 1318-22.
- Cramton, S.E., Götz, F. (2015). Biofilm Development in *Staphylococcus*. İçinde M. Ghannoum(Ed.), *Microbial Biofilms; 2th Ed.*, Washington, DC, USA: ASM Press; pp. 64-84.
- Curtis, M.M., Russell, R., Moreira, C.G., Adebisin, A.M., Wang, C., Williams, N.S., Taussig, R., Stewart, D., Zimmern, P., Lu, B., Prasad, R.N., Zhu, C., Rasko, D.A., Huntley, J.F., Falck, J.R. and Sperandio, V. (2014) QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. *mBio* 5, e02165

- Davies D.G., Marques, C.N.H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, **191**, 1393-1403.
- Dean, S.N., Chung, M.C., van Hoek, M.L. (2015) Burkholderia Diffusible Signal Factor Signals to Francisella novicida To Disperse Biofilm and Increase Siderophore Production. *Applied Environmental Microbiology*, **81**, 7057-7066.
- Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*, **20**, 2361–70.
- Deng, Y. ve ark. (2013). Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of Pseudomonas aeruginosa through interference with quorum sensing systems and T3SS. *BMC Microbiology*, **13**, 231–242.
- Deng, Y. ve ark. (2014). Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiology*, **14**:51-60, Erişim 15.01.2015, <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-51>.
- Deng, Y., Schmid, N., Wang, C., Wang, J., Pessi, G., ve ark. (2012). Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proceedings of National Academic Science USA*, **109**, 15479-15484.
- Deng, Y., Wu, J., Tao, F. and Zhang, L.H. (2011) Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chemical Reviews*, **111**, 160-173.
- Derbentli, Ş. (2002). Antimikrobiyal maddeler. İçinde. E. Bozkaya (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji 1*. Ankara: Nobel Matbaacılık, p.121.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schliever, P.M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology Reviews*, **13(1)**, 16-34.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 16–34.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilm: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8(9)**, 881-890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*; **15**, 167–93.

- Dosler, S., Karaaslan, E., Gerceker, A.A. (2015). Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*. **0**, 1-10.
- Dow, J. M. (2016). Diffusible Signal Factor (DSF)-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. <https://doi.org/10.1111/jam.13307>
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.Q., Feng, J.X. ve ark. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of National Academic Science USA*, **100**, 10995-11000.
- Emmerson, A. M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(90001), 13–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208>.
- Farber, B.F., Kaplan, M.H., Clogston, A.G. (1990). Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *The Journal of Infectious Diseases*, **161**, 37–40.
- Foster, T.J. (2005). Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*; **3**, 948–58
- Foster, T.J. , Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends Microbiology*; **6**, 484–8.
- Frieri, M.,Kumar, K. , Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, *10*, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gladstone, G.P. , VanHeyningen, W.E. (1957). Staphylococcal leucocidins. *British Journal of Experimental Pathology*, **38**,123–37.
- Gladwin, M., Trattler, B. (2011). Staphylococci. İçinde. C. Scott Mahan (Ed.), *Clinical Microbiology*, 5th Ed., Miami FL, USA: MedMaster, Inc.; pp.40-47.
- Gonzalez-Ruiz, A. , Seaton, R.A. , Hamed, K. (2016) Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. *Infection and Drug Resistance*, **9**,47-58.
- Gordon, R.J. , Lowy, F.D. (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, 350-9.
- Gülay, Z. (2012). Koagülaz negatif Stafilokoklar: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. İçinde S. Ulusoy (Ed.), *Önemli ve sorunlu Gram pozitif bakteri enfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; pp.131-169

- Harrison, J.J., Raymond, J. T., Lyriam L. R. Marques, Ceri., H. . (2005) Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology *American Scientist* Vol. 93, No. 6), pp. 508-515)
- He, Y.W., Wang, C., Zhou, L., Song, H., Dow, J.M. and Zhang, L.H. (2006) Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 33414-33421
- He, Y.W., Wu, J., Cha, J.S., Zhang, L.H. (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiology* **10**, 187.
- Hellmark, B., Unemo, M., Nilsdotter-augustinsson, Å., Söderquist, B. (2009). Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clinical Microbiology and Infection*, **15(3)**, 238–244.
- Holmes, R. L., Jorgensen, J. H. (2008). Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00945-07>
- Huang, P. and Lee Wong, A.C. (2007) A cyclic AMP receptor protein-regulated cell-cell communication system mediates expression of a FecA homologue in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 5034-5040.
- Hussain M., Wilcox, M., White, P., (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: Biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology*, **10**, 191-207.
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M. ve ark. (2011). *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nature Medicine*, **17**, 1310–1314.
- Ionescu, M., Baccari, C., Da Silva, A.M., Garcia, A., Yokota, K. ve ark., S.E. (2013) Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *Journal of Bacteriology* ,**195**, 5273-5284.
- Ionescu, M., Yokota, K., Antonova, E., Garcia, A., Beaulieu, E., Hayes, T., Iavarone, A.T. and Lindow, S.E. (2016) Promiscuous diffusible signal factor production and responsiveness of the *Xylella fastidiosa* Rpf system. *mBio* **7**, e01054-16.

- Irie, Y., Parsek, M.R., (2008). Quorum Sensing and Microbial Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 67-79.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Gerard, L., Vande- nesch, F., ve ark. (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **182**, 6517–6522.
- Jefferson, K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, **236 (2)**, 163–173.
- Jennings, J.A., Courtney, H.S. and Haggard, W.O. (2012) Cis-2-decenoic Acid Inhibits *S. aureus* Growth and Biofilm In Vitro: A Pilot Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **470**, 2663-2670
- Ji, G., Beavis, R. and Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, **276**, 2027–2030
- Kakkar, A., Nizampatnam, N.R., Kondreddy, A., Pradhan, B.B. and Chatterjee, S. (2015) *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 6697-6714.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48(7)**, 2633–2636..
- Kolenbrander, P.E., Palmer, Jr. R.J. Human oral bacterial biofilms. İçinde M.A. Ghannoum, G.A. O'Toole (Ed.) *Microbial biofilms*. Washington, DC: ASM Press; 2004.
- Konig, C., Schwank, S., Blaser, J. (2001). Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *European Journal of Clinical Microbiology*, **20**, 20–6.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, **15(12)**, 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., Hasnain, S. E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, **307(8)**, 481–489.
- LaPlante, K. L., & Mermel, L. A. (2009). In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus*

- faecalis strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01642-08>
- Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V, Otto, M., Mclean, R. J. C., & Lee, C. (2014). Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00167>
- Lin, C.F., Chen, C.L., Huang, W.C., Cheng, Y.L., Hsieh, C.Y. ve ark. (2010). Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins (Basel)*, **2**, 2158–2176. [PubMed: 22069678]
- Liu, H., Zhao, Y., Zhao, D., Gong, T., Wu, Y., Han, H. Ve ark. (2015). Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. *Emerging Microbes and Infections*, *4*(1), e1. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.1>
- Marques, C.N., Davies, D.G. and Sauer, K. (2015) Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. *Pharmaceuticals (Basel)*, **8**, 816-835.
- Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R.P. and Muir, T.W. (1999) Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 1218–1223.
- McCormick, J.K, Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews of Microbiology*, **55**,77–104.
- Menzies, B.E. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Current Opinion Infectious Diseases*; **16**, 225–9.
- Morikawa, K, Takemura, AJ, Inose, Y, Tsai, M, Nguyen Thi le, T, Ohta, T, Msadek, T. (2012). Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*. *8*:e1003003. [PubMed: 23133387]
- Newman, K.L., Almeida, R.P., Purcell, A.H. and Lindow, S.E. (2004) Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of National Academic Science USA*,**101**, 1737-1742.
- Newman, K.L., Chatterjee, S., Ho, K.A. and Lindow, S.E. (2008) Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **21**, 326-334.
- Njoroge, J. and Sperandio, V. (2009) Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Molecular Medicine*, **1**, 201–210.

- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, **48**, 1429–1449.
- Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, **48**, 1429–49.
- Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F. and Moghazeh, S. (1995) The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular and General Genetics*, **248**, 446–458.
- Nygaard, T.K., Pallister, K.B., DuMont, AL, DeWald, M, Watkins, R.L. ve ark. (2012). Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS ONE*.; 7:e36532. [PubMed: 22574180]
- O’Riordan, K., Lee, J.C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**, 218–34.
- Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A., Lowy, F.D. (1985). Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity*; **50**, 218–24.
- Otto, M. (2004). Quorum-sensing control in *Staphylococci* - A target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.016>
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion Infectious Diseases*, **0**, 32-37.
- Otto, M., Echner, H., Voelter, W. and Götz, F. (2001) Pheromone cross-inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, **69**, 1957–1960.
- Otto, M., Süssmuth, R., Jung, G. and Götz, F. (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. *FEBS Letters*. **424**, 89–94
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960.
- Patel, S., Bernice, F. (2018). Vancomycin. Erişim 15.01.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review Microbiology*; **48**, 585–617
- Peacock, S.J., Moore, C.E, Justice, A. ve ark. (2002). Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **70**, 4987–96.

- Pettit, R. K., Weber, C. A., Kean, M. J., Hoffmann, H., Pettit, G. R. ve ark. (2005). Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005>
- Pillai, S.K. ve ark. (2005). Antimicrobial Combinations. İçinde. V. Lorian (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 365-440
- Prevost, G., Couppie, P., Monteil, H. (2003). Staphylococcal epidermolysins. *Current Opinion Infectious Diseases*, **16**, 71–6.
- Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., Arbeit, R.D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, **20**, 95–102.
- Purevdorj-Gage L.B., Stoodley, P. (2015). Biofilm structure, behaviour and hydrodynamics. İçinde. M. Ghannoum(Ed.), *Microbial Biofilms; 2th Ed.*, Washington, DC, USA: ASM Press; pp. 160-173.
- Purevdorj-Gage L.B., Stoodley, P. (2015). Quorum Sensing in Biofilms. İçinde. M. Ghannoum(Ed.), *Microbial Biofilms; 2th Ed.*, Washington, DC, USA: ASM Press; pp. 118-140.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W. ve ark.. (2000). Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 3357–63.
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Fallahi, H. and Heidari-Keshel, S. (2015) Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 383.
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Mohammadi, P., Soudi, M.R., Babaie-Naiej, H., Fallahi, H. (2014) A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, **63**, 1509-1516
- Rasko D.A., Moreira, C.G., Li, de R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R and Sperandio, V. (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, **321**(5892),1078-80. doi: 10.1126/science.1160354.
- Reiter, K. C., Villa, B., Paim, T. G. da S., de Oliveira, C. F., & d'Azevedo, P. A. (2013). Inhibition of biofilm maturation by linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus*

- epidermidis clinical isolates: Comparison with other drugs. *Journal of Medical Microbiology*, **62**, 394–399.
- Römling, U., Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>.
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **77**, 1-52.
- Ryan, R. P., & Dow, J. M. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017871-0>
- Ryan, R. P., An, S., Allan, J. H., McCarthy, Y., Dow, J. M. (2015). The DSF Family of Cell – Cell Signals : An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators, *PLOS Pathogens*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004986>.
- Schmid, N., Pessi, G., Deng, Y., Aguilar, C., Carlier, A.L. ve ark. (2012) The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in *Burkholderia cenocepacia* H111, *PLoS One*, **7**, e49966.
- Schuch, R., Khan, B. K., Raz, A., & Rotolo, J. A. (2017)., Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61(7)**, 1–18.
- Sepehr, S., Rahmani-Badi, A. and Babaie-Naiej, H. (2014) Unsaturated fatty acid, cis-2-decenoic acid, in combination with disinfectants or antibiotics removes pre-established biofilms formed by food-related bacteria. *PLoS One*, **9**, 1078–1080
- Shadia, M.A., Aeron, A. (2014). Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. *SAJ Biotechnology*, **1**, 1-10.
- Siddiqui, A.H, Whitten, R.A. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) [Updated 2018 Feb 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482221/>
- Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Sintim, H.O., Smith, J.A., Wang, J., Nakayama, S. and Yan, L. (2010) Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP

- signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future Medicinal Chemistry*, **2**, 1005-1035.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C.E., Daniels, M.J. and Dow, J.M. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, **38**, 986-1003
- Souli, M., Giamarellou, H. (1998). Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 939–41.
- Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. (2009). Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**, 3505–7.
- Sultan, N. (2014). Stafilokoklar ve benzer Gram-pozitif koklar, İçinde A.C. Başustaoğlu (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji*. (6.baskı). Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti.; 209-223.
- Suppiger, A., Eshwar, A.K., Stephan, R., Kaever, V., Eberl, L. and Lehner, A. (2016b) The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*. *Scientific Reports*, **6**, 18753.
- Tao, F., Swarup, S., Zhang, L.H. (2010) Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, **12**, 3159-3170.
- Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.201200313>.
- Timmerman, C.P., Mattsson, E., Martinez-Martinez, L. ve ark. (1993). Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infection and Immunity*, **61**, 4167–72.
- Torres, P.S., Malamud, F., Rigano, L.A., Russo, D.M., Marano, M.R. ve ark., (2007) Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology*, **9**, 2101-2109.
- Tzianabos, A.O, Wang, J.Y., Lee, J.C. (2001). Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, **98**, 9365–70.

- Udine, C., Brackman, G., Bazzini, S., Buroni, S., Van Acker, H., Pasca, M.R., Riccardi, G. Coenye, T. (2013) Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems. *PLoS One*, **8**, e55112.
- Usluer, G. (2012). *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar. İçinde S. Ulusoy (Ed.), *Önemli ve sorunlu Gram pozitif bakteri infeksiyonları..* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; pp.41-57
- Valeva, A., Walev, I., Pinkernell, M., Walker, B., Bayley, H., Palmer, M., Bhakdi, S. (1997). Transmembrane betabarrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*; **94**,11607–11611
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., Otto, M. (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, **188**(5), 706-18.
- Wang, L.H. ve ark. (2004). A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology*; **51**(3), 903-912.
- Wang, L.H., He, Y.W., Gao, Y.F., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C., Wang, S.X., Weng, L.X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R.X. and Zhang, L.H. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology*, **51**, 903-912.
- Watkins, R., Lemonovich, T., File T. (2012). An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Place in therapy. *Core Evidence*, **7**, 131-143.
- Wilke, GA, Bubeck Wardenburg, J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, **107**,13473– 13478.
- Yarwood, J.M., Schlievert PM. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1620–5.
- Zhang, L. H., Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: Diverse implications. *Molecular Microbiology*, **53**(6), 1563–1571. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04234.x>
- Zhou, L., Wang, X.Y., Sun, S., Yang, L.C., Jiang, B.L. and He, Y.W. (2015b) Identification and characterization of naturally occurring DSF-family quorum sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*. *Environmental Microbiology*, **17**, 4646-4658.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lössner, I.,(1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element. *Molecular Microbiology*, **32(2)**, 345- 56.



HAM VERİLER

FORMLAR

BİYOFİLM OLUŞTURAN STAFİLOKOKLARA KARŞI ANTİBİYOTİKLERİN TEK BAŞINA VE DİFÜZE OLAN SİNYAL FAKTÖRÜ İLE KOMBİNASYONLARININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%4 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.havuz.info.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.slideserve.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.readbag.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ETİK KURUL KARARI

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



Sayı : 741

Tarih : 03.04.2015

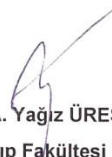
Konu : Pror.Dr.Gülten ÖTÜK

Sayın Prof.Dr.Gülten ÖTÜK
Eczacılık Fakültesi

İlgi :Eczacılık Fakültesinin 11/03/2015 gün ve 49 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Merve BİLGİN'in yürüteceği 2015/614 dosya numaralı "Biyofilm oluşturan Stafilokoklara karşı antibiyotiklerin tek başına ve difüze olan sinyal faktörü ile kombinasyonlarının in vitro araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 27/03/2015 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


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

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	Bilgin
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	30.08.1983
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	24074495364
Email	mervebilgin83@hotmail.com	Tel	05383013147

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü.Eczacılık Fak. Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.	-
Yük.Lis.	İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Mikrobiyoloji A.B.D.	2011
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	İstanbul Erkek Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniv.	2012-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	YÖKDİL Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	72,5	88,75
Almanca	İyi	İyi	İyi	-	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72	74	70

Bilgisayar Bilgisi

ProGram	Kullanma becerisi
Ms Office (word,excel, powerpoint)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslar arası Makaleler

1. Urek, S., Bilgin, M., Halli, U. (2013). Toxicological Profile of Homosalate as Cosmetic Ingredients. *Global Journal of Pathology and Microbiology*, **1**, 7-11.

2. Tan, N., Şen, B., Bilgin, M., Tan, E. (2015). "Antimicrobial activity of extracts from an endemic *Salvia cilicica* Boiss. and Kotschy" *African journal of microbiology research*, **9(2)**,130-134. DOI:10.5897/AJMR204.7223.
3. Tan, N., Yazıcı-Tütüniş, S., Bilgin M., Tan, E. Miski, M. (2017). "Antibacterial Activities of Pyrenylated Coumarins from the Roots of *Prangos hulussii*". *Molecules*, **22(7)**, 1098; doi:10.3390/molecules22071098
4. Gümüş, D., Kalaycı-Yüksek, F., Uz, G., Bilgin, M., Anđ-Küçüker, M. (2018). "The Possible Effects of Different Hormones on Growth Rate and Ability of Biofilm Formation in Different Types of Microorganisms" *ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA*, 34 / 1.

Uluslar arası Bildiriler

1. Tan, E., Bilgin, M., Tan, N., Yazıcı Tütüniş, S., Akalin Uruşak, E., " Antibacterial Activity of *Salvia* Species from Turkey", 47th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016), Nice, FRANCE, 11-14 Eylül 2016, pp.74-74
2. Yazıcı Tütüniş, S., Tan, N., Miski, M., Bilgin, M., Akalin Uruşak ,E., Tan, E., "Antibacterial Activities of The Root Extracts of *Prangos turcica* A. Duran, M. Sagioglu & H. Duman", 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity" (ISCNP-29 & ICOB-9), İzmir, TURKEY, 24-27 Eylül 2016, pp.20- 20
3. Sen Utsukarcı, B., Gürdal, B., Bilgin, M., Satana, D., Demirci, B., Tan, N., Mat, A., "Pharmacognostical investigation on *Salvia cassia*". *Lamiaceae 2017*, Antalya, TURKEY. Nat.Vol. Essent.Oils. 2017(4)2/23. 3
4. Kalaycı-Yüksek, F. , Bilgin, M. , Uz, G., Gümüş, D., Anđ-Küçüker, M. The possible effects of IL1 β , IL-6 and TNF- α on growth rate in two different UPEC strains. 10th Balkan Congress of Microbiology/Microbiologia Balkanica 2017, Sofya, Bulgaristan, 16-18 Kasım, 2017.
5. Gümüş, D., Kalaycı-Yüksek, F., Uz, G., Bilgin, M., Anđ- Küçüker, M., "The possible effects of different hormones on growth rate and ability of biofilm formation in different types of microorganisms". 10th Balkan Congress of Microbiology/Microbiologia Balkanica 2017, Sofya, Bulgaristan, 16-18 Kasım, 2017.

6. Gulsoy, Toplan G., Tan, N. , Bilgin, M. , Gulec, M. , Tan, E., “Antibacterial activities of *Teucrium kotschyanum* from Turkey”.GA 2017, Basel, İsviçre, 3-7 Sept., 2017.
7. Bilgin, M., Dosler, S., “Antibacterial and antibiofilm activities of various antibiotics alone and in combination with diffusible signal factor against biofilm forming staphylococci”. 28th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, Spain, 21 – 24 April, 2018.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Bilgin, M, Ötük, G, “Çeşitli dezenfektan maddelerin atık sulardan izole edilen mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının araştırılması”, XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, Aydın
2. Bilgin, M, Döşler S., Ötük, G, “Atık sulardan izole edilen mikroorganizmalara karşı çeşitli antibiyotiklerin in vitro antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi”, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Sempozyumu, 18-24 Nisan 2014, İstanbul.
3. Tan, N., Bilgin, M. , Yazıcı Tütüniş, S., Tan, E., "Bazı *Salvia* Türlerinin Antibakteriyel Aktivite Açısından Karşılaştırılması", XXII. Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı (BİHAT 2016), TRABZON, TÜRKİYE, 31 Ağustos - 5 Eylül 2016, ss.104-104

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yoga ve Resim.