

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NON-FERMANTATİF GRAM NEGATİF
BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Fatih TURSUN

ELAZIĞ - 2018

ONAY SAYFASI



Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN



Yüksek Lisans Sınava Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN



Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmamı gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmamın bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.


Muhammed Fatih TURSUN

17.09.2018

İmza

Danışman

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

iii

İTHAF

Anneme, babama, eşim Meral'e, çocuklarım Muhammed Emir ve Ahmed Ertuğrul'a ithaf olunur.



TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince tezimin hazırlanmasında beni yűnlendiren, örnekle rin deęerlendirilmesinde hiçbir yardımı esirgemeyen, her zaman sabırlı ve hoőgrűlű olan tez yöneticim Prof. Dr. Zűlal Aőçı Toraman'a;

Yűksek lisans eğitimim sırasında yetiőmemde önemli katkıları olan, bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. Mustafa Yılmaz, Prof. Dr. Adnan Seyrek, Prof. Dr. Yasemin Bulut'a;

Birlikte alıőtıęım Uzm. Dr. Pınar NER, Dr. Nurgűl BİR BEN, Bűnyamin İREHAN, Necip ARLI ve Elazıę Veteriner Kontrol Enstitűsű alıőanları ile tűm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalıőanlarına desteklerinden dolayı teőekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------------------------------|
| ONAY SAYFASI | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| ETİK BEYAN..... | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| İTHAF | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| TABLO LİSTESİ..... | viii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | ix |
| KISALTMALAR LİSTESİ..... | x |
| 1. ÖZET | 1 |
| 2. ABSTRACT..... | 3 |
| 3. GİRİŞ | 6 |
| 3.1. Nonfermentatif Gram Negatif Bakteriler | 8 |
| 3.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9 |
| 3.1.2. <i>Burkholderia cepacia</i> Kompleks | 12 |
| 3.1.3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 14 |
| 3.1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> | 17 |
| 3.2. BİYOFİLM..... | 20 |
| 3.2.1. Biyofilm ve Önemi | 22 |
| 3.2.2. Biyofilm Yapısı..... | 24 |
| 3.2.3. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler | 25 |
| 3.2.4. Biyofilm Oluşum Basamakları | 26 |
| 3.2.4.1. Tutunma | 28 |
| 3.2.4.2. Yapışma | 29 |
| 3.2.4.3. Toplanma..... | 29 |
| 3.2.4.4. Olgun Biyofilm Oluşumu..... | 30 |
| 3.2.4.5. Kopma veya Ayrılma Evresi | 30 |
| 3.2.5. Biyofilm ve Gen Transferi..... | 30 |
| 3.2.6. Quorum Sensing Sistem (QSS-Mikrobiyel Populasyon Etkileşimi) ... | 31 |
| 3.2.7. Neden Biyofilm..... | 34 |
| 3.2.7.1. Savunma..... | 34 |
| 3.2.7.2. Adhezyon ve Kolonizasyon | 34 |
| 3.2.7.3. Yaşanabilir Çevre Geliştirme | 35 |
| 3.2.7.4. Kominite Oluşturma..... | 35 |
| 3.2.8. Biyofilm Oluşumunun Klinik Olarak Önemi | 36 |
| 3.2.9. Biyofilmlerin Neden Olduğu İnfeksiyonlar..... | 38 |
| 3.2.9.1. İnsanlarda Biyofilmlerin Neden Olduğu İnfeksiyonlar..... | 39 |
| 3.2.9.2. Tıbbi Cihazlarda Biyofilm Oluşumu..... | 40 |
| 3.2.10. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç İlişkisi | 42 |
| 3.2.10.1. Antimikrobiyal Ajanların Geç Penetrasyonu | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.2.10.2. Biyofilmi Oluşturan Mikroorganizmaların Çoğalma Hızlarının Değişmesi..... | 44 |
| 3.2.10.3. Biyofilm Oluşumuna Bağlı Meydana Gelen Fizyolojik Değişimler | 44 |
| 3.2.11. Biyofilm Oluşumunu Engelleme Stratejileri | 46 |
| 3.2.12. Biyofilm Tanı Yöntemleri | 48 |
| 4. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 49 |
| 4.1. GEREÇ..... | 49 |
| 4.1.1. Besiyerleri..... | 49 |
| 4.1.2. Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Malzemeler | 49 |
| 4.1.2.1. Kongo Red Agar (KKA) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanmasında: | 49 |
| 4.1.2.2. Standart Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanmasında: | 50 |
| 4.1.2.3. Mikroplate (MP) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanmasında | 50 |
| 4.1.3. Antibiyotik Diskleri | 50 |
| 4.1.4. Diğer malzemeler..... | 50 |
| 4.2. YÖNTEM..... | 51 |
| 4.2.1. Biyofilm Oluşumunun Saptanması:..... | 53 |
| 4.2.1.1. Kongo Kırmızılı Agar (KKA) Yöntemi..... | 53 |
| 4.2.1.2. Standart Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi | 53 |
| 4.2.1.3. Mikropleyt (MP) Yöntemiyle Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi | 54 |
| 4.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri | 55 |
| 4.2.2.1. Disk Difüzyon Testinin Yapılışı | 55 |
| 5. BULGULAR..... | 57 |
| 6. TARTIŞMA | 72 |
| 7. KAYNAKLAR | 87 |

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Pseudomonas aeruginosa 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri. . | 11 |
| Tablo 2. İnsanlarda biyofilm ile ilişkili infeksiyonlar. (111)..... | 40 |
| Tablo 3. Çalışmaya alınan bakterilerin soyutlandığı klinik örneklerin dağılımı. . | 57 |
| Tablo 4. Non-fermentatif Gram negatif basillerin soyutlantığı örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı. | 58 |
| Tablo 5. Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların türleri, sayıları ve oranları. | 59 |
| Tablo 6. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların biyofilm varlığının tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. | 59 |
| Tablo 7. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların biyofilm varlığının tespitinde kullanılan yöntemlerin bakteri türlerine göre karşılaştırılması. | 60 |
| Tablo 8. Mikroorganizmaların kullanılan test yöntemlerine göre biyofilm pozitifliklerinin karşılaştırılması. | 60 |
| Tablo 9. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının Mikropleyt yöntemiyle biyofilm test sonuçları. | 61 |
| Tablo 10. Mikropleyt (Kristal Viole) yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı. | 61 |
| Tablo 11. Mikropleyt (Safranin) yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı. | 62 |
| Tablo 12. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının ST yöntemiyle biyofilm test sonuçları. | 63 |
| Tablo 13. Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı. | 64 |
| Tablo 14. Standart Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı. | 65 |
| Tablo 15. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının Kongo Kırmızılı Agar yöntemiyle biyofilm test sonuçları..... | 67 |
| Tablo 16. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının KKA yöntemiyle biyofilm test sonuçları..... | 67 |
| Tablo 17. Kongo Kırmızılı Agar Test yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı. | 69 |
| Tablo 18. Biyofilm pozitif olan suşların disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları. | 69 |
| Tablo 19. Biyofilm pozitif olan A.baumanii suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları. | 70 |
| Tablo 20. Biyofilm pozitif olan P.aeruginosa suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları. | 70 |
| Tablo 21. Biyofilm pozitif olan B.cepacia suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları. | 71 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Biyofilm ve oluşum aşamaları (70). | 24 |
| Şekil 2. Biyofilm oluşum aşamaları. | 27 |
| Şekil 3. Biyofilm yapısında sinyal moleküllerinin iletimi (104). | 33 |
| Şekil 4. Biyofilmde antibakteriyellere karşı gelişen direnç (118). | 43 |
| Şekil 5. Mikropleyt (Kristal Virole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu. | 62 |
| Şekil 6. Mikropleyt (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu. | 63 |
| Şekil 7. Standat Tüp (Kristal Viyole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu. | 64 |
| Şekil 8. Standat Tüp (Kristal Viyole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumunda pozitif örnekler. | 65 |
| Şekil 9. Standart Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumunda pozitif örnekler. | 66 |
| Şekil 10. Standat Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu. | 66 |
| Şekil 11. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemine göre biyofilm pozitifliği ve biyofilm negatifliği. | 68 |
| Şekil 12. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemine göre Biyofilm oluşumu. | 68 |

KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-------------|---|
| ADP | : Adenozin di Fosfat |
| AHL | : Asil Homoserin Lakton |
| ATP | : Adenozin tri Fosfat |
| BCC | : Burkholderia cepasia kompleks |
| BCSA | : Burkholderia cepasia Selektif Kompleks |
| BOS | : Beyin Omirilik Sıvısı |
| CFTR | : Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör Protein |
| ÇİD | : Çoklu İlaç Direnci |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| EF2 | : Elongasyon faktör 2 |
| EMB | : Eosin Metilen Blue |
| EPS | : Ekstrasellüler Polimerik Matrix |
| HE | : Hastane Enfeksiyonu |
| KF | : Kistik Fibrozis |
| LAM | : Leeds Acinetobacter Medium |
| MİK | : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu |
| NBTE | : Non-Bakteriyel Trombotik Endokarit |
| NFGN | : Non-fermentatif Gram Negatif Bakteriler |
| ONPG | : Ortonitrofenil-beta-galaktopiranozid |
| PBP | : Penisilin Bağlayan Protein |
| PKK | : Prosterik Kalp Kapakçığı |
| PMNL | : Polimorfonükleer Lökosit |
| PQS | : <i>Pseudomonas</i> kinolon sinyal molekülü |
| QSS | : Quorum Sensing Sistem (Çevreyi Algılama Sistemi) |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| SVK | : Santral Venöz Kateter |
| YBÜ | : Yoğun Bakım Ünitesi |

1. ÖZET

Nonfermentatif Gram-negatif bakteriler (NFGNB) immün sistemi baskılanmış ve özellikle ilaç tedavisi alan hastalarda, artan oranlarda, fırsatçı patojenler olarak infeksiyonlara neden olmaktadır. NFGNB'den *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia* önemli hastane infeksiyonlarına yol açmaktadırlar. Mikroorganizmaların virulans özelliklerinden olan biyofilmler, kateterler, eklem ve kalp protezleri gibi kalıcı ya da kalıcı olmayan tıbbi araçları veya kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarını kolonize eden bakterilerin bakteri yüzeylerinde glikokaliks özellikle mukoid bir yapı olup, bakteriyi antibakteriyel ajanlar ile konak bağışıklık sisteminden koruyarak kronik infeksiyonlara zemin hazırlayabilirler. Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S.maltophilia*) ve *Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*) izolatlarının biyofilm üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde Kongo Kırmızılı Agar (KKA), Standart Tüp (ST) Yöntemi ve Mikropleyt (MP) Yöntemi kullanıldı. 150 adet non-fermentatif Gram-negatif bakteri izolatının CRA yöntemine göre izolatların 71'i(%47,33) biyofilm pozitif iken 79'u(%52,67) biyofilm negatif olarak tespit edildi. Kristal viole boyar madde kullanılarak yapılan ST yöntemine göre izolatların 57'si(%38), biyofilm pozitif iken 93'u(%62,33) biyofilm negatif olarak tespit edildi. Safranin boyar madde kullanılarak yapılan ST yöntemine göre ise 65'i(%43,33) biyofilm pozitif olarak tespit edilirken 85'i(%56,67) biyofilm negatif olarak belirlendi. Kristal viole boyar

madde kullanılarak yapılan MP yöntemine göre izolatların 61'i(%40,66), biyofilm pozitif iken 89'u(%59,34) biyofilm negatif olarak tespit edildi. Safranin boyar madde kullanılarak yapılan MP yöntemine göre ise 83'ü(%55,33) biyofilm pozitif olarak tespit edilirken 67'si(44,67) biyofilm negatif olarak belirlendi. Farklı klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmalarda biyofilm varlığı oranı konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Biyofilm oluşumunun belirlenmesine yönelik yapılan test yöntemleri arasında gold test olarak ifade edilen mikropleyt yöntemi, yaptığımız çalışmada da en yüksek biyofilm pozitiflik oranına sahip olarak bu durumu desteklemiştir. Biyofilm pozitif olan *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*)'suşlarının disk diffüzyon yöntemine göre belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre en çok direnç Amoksisilin-Klavunat(AMC) ve Trimetoprim- Sülfometoksazol(SXT)'e iken bu durum *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*)'da ciprofloksasin(CIP) ve Trimetoprim-Sülfometoksazol(SXT) şeklinde gerçekleşti.

Sonuç olarak, non-fermentatif Gram negatif suşlarında biyofilm üretiminin belirlenmesinde kullanılan yöntemler arasında biyofilm poziflik oranı en fazla safranin boyası kullanılarak yapılan MP yöntemi olmuştur. Bunun yanısıra antimikrobiyallere karşı direnç gelişiminde biyofilm oluşumunun önemli rol oynadığı sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Non-Fermentatif Gram Negatif Bakteriler, Biyofilm, Antibiyotik Direnci

2. ABSTRACT

Biofilm Formation of Non Fermentative Gram Negative Bacteria and Determination of Antibiotic Sensitivity

It is known that nonfermentative Gram-negative bacteria can cause infections increasingly, as opportunistic pathogens, in patients having suppressed the immunological system and receiving drug treatment. NFGNB which are *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* cause important nosocomial infections. The virulence features of microorganisms that are mucoid structures in glycolic in the bacterial surfaces that colonize respiratory tracts in certain cases such as biofilms, catheters, joints and cardiac prostheses or in certain diseases such as cystic fibrosis and they protect against host infectious system by bacterial antibacterial agents, they can prepare the ground. The aim of this study was to determine the biofilm production and antibiotic susceptibilities of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) *Stenotrophomonas maltophilia* (*S.maltophilia*) and *Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*) isolated from various clinical specimens. Determination of biofilm formation was carried out by using congo red agar (CRA), standart tube (ST) method and mikroplate (MP) were used. It was found that 71(%47.33) of the isolates of nonfermentative Gram-negative bacterial isolate were 79(%52,67) biofilm was negative and 57(%38) of the isolates were positive 93(%52,67) compared to the ST method using crystal viole stain, whereas biofilm was negative (%52,67) compared to ST 65(43.33) were found to be positive and 85 (%56.67) biofilms were negative. 61(%40.66) of the isolates and 89 (%59.34) of the biofilms were negative according to the MP method

used safran stain. Biofilm which is one of microorganisms virulence features and also it has characteristic that is mucoid structures in glycoalytic on surface of bacteria colonizing on catheters, joints and cardiac prostheses or in case of respiratory tract diseases such as cystic fibrosis. can cause chronic infections by protecting them against host's immune system. It was aimed to determine susceptibilities of and biofilm production of isolates from various samples, which are *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S.maltophilia*) and *Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*). Standard tube (ST) method and microplate (MP) was used in determining of biofilm production used Congo red agar. It was found that while among 150 samples 71(47.33%) of the isolates of nonfermentative Gram-negative bacterial isolate were positive, the rest of samples, which means 79 (%52,67) biofilm were. Percent 38 (%57) of the isolates were positive, percent %52,67 were negative, according to ST method. And also according to the same method , percent % 65 (43.33) were found to be positive and 85 (%56.67) biofilms were negative. According to principles of crystal violet method, it was found that isolates 61 (%40,66) were positive and 89 (%59,34) were negative. Existence of biofilm on Microorganisms Isolated from various samples are in accordance with results of other studies at the same topic. It was found out that the test in microplate method called as Gold Test among tests used to determine of biofilm production has the highest biofilm positive rate and this has supported the result found through this study. Biofilm positive *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*)'s strains were resistant to amoxicillin-clavunat(AMC) and trimetoprim-sulfamethoxazole(SXT)

but *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) was resistant to amoksisilin-klavunat(AMC) ve trimetroprim- sülfometoksazol(SXT).

As result amongs methods used to determine biofilm production pozitiveness rate of nonfermantative gram-negative bacteria strain the most used method is the MP prepared by using bile paint which is used , to most extent, in the MP . In addition it was found that biofilm production has key role in antimicrobial resistance shaping.

Key Words: Non-fermantative Gram-negative bacterial, Biofilm, Antibiotic Resistance

3. GİRİŞ

Hastane infeksiyon (HI)' larına bağı mortalite ve morbiditedeki artış ve artan tedavi maliyetleri, infeksiyonların kontrol stratejilerinin geliştirilmesini ve olabildiğince eksiksiz bir şekilde uygulanmasını gerekli kılmaktadır. Bu nedenle her merkezin kendi hasta profilini, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları, bunların direnç paternlerini, her bölümdeki HI dağılımını ve sıklığını bilmesi ve bu parametrelere bağı olarak doğru stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir (1). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' inde HI'nun, her yıl 77.000' in üzerinde ölüme ve yıllık 5-10 milyar dolarlık bir harcamaya sebep olduğu bilinmektedir (2; 3)

Günümüzde antibiyotik kullanımının yaygın ve kimi zaman kontrolsüz olması nedeniyle kullanılan antibiyotiklere karşı direnç önemli bir sorun haline gelmiştir (3). HI' nun sıklığı ve antibiyotik duyarlılığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve aynı hastanenin farklı birimlerine göre değişmektedir (4). Günümüzde HI'nunda Gram-pozitif bakteriler daha sık görülmesine rağmen Gram-negatif bakterilerin önemi de gün geçtikçe artmaktadır. Gram-negatif bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesiyle bunların neden olduğu HI'nun önemi artmakta ve mevcut antibiyotiklerle bu infeksiyonların tedavisi zorlaşmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) görülen HI'larında yüksek dozda, geniş spektrumlu parenteral antibiyotik kullanımı gerektiğinden bu ünitelerde çoklu ilaç direnci (ÇİD) daha önemli hale gelmektedir. Dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarda, mortalitenin artması, hastanede yatış süresinin uzaması ve maliyetin artması nedeniyle önemli sorunlar oluşmaktadır (5).

Hastane infeksiyonlarında görülen bakterilerin sayıca artışı ve bu grup bakterilerde antibiyotiklere karşı görülen direnç değişiklikleri nedeniyle, son yıllarda hem yeni patojenler ortaya çıkmış, hemde bilinen mevcut patojenler yeni virulans ve direnç mekanizmaları kazanmıştır. Hastane infeksiyonlarında giderek önem kazanan nonfermentatif Gram-negatif bakteriler (NFGNB), su içeren ortamlardan köken almış olan, minimal üreme koşullarında üreyebilen ve virülans yönünden çeşitlilik gösteren bir organizma grubudur. Bu grupta *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Flavobacterium* ve *Alcaligenes* cinsleri yer almaktadır (6; 7).

Biyofilm; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ve gen transkripsiyonlarına bağlı olarak farklı fenotipik özellik gösterebilen ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden (EPS) oluşmuş matriks olarak tanımlanmaktadır. Biofilm oluşturabilme kabiliyetinin; bakteriyel adherans ve antibiyotik fagositoza karşı dirençte önemli rolleri olduğunun bilinmesinin yanında, bakterilerin bir topluluk oluşturarak yeni gen modülasyonlarıyla ortama adaptasyon yeteneği kazanmalarının keşfiyle beraber tıbbi önemleri daha da artmıştır (8).

Biyofilmlerin halen günümüzde doğal kapak endokarditi, osteomyelit, kronik bakteriyel prostatit, orta kulak infeksiyonları, tıbbi implant infeksiyonları ve özellikle kistik fibrozis (KF) hastalarında gözlenen kronik akciğer infeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Oluşan biyofilmin, genetik olarak planktonik formlarına göre 10-1000 kat daha dirençli olması ve tedavi sonrası relaps oranının

yüksek olması, biofilm oluşturan bakterilerin sebep olduğu infeksiyonların önemini bir kat daha arttırmaktadır (9).

Bu çalışmada, fırsatçı patojenler olarak bilinen, mortalite ve morbititesi yüksek olan HI'larına sebep olan NFGN bakterilerde biyofilm oluşumunu ve antibiyotiklere karşı oluşturulan direncin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.1. Nonfermentatif Gram Negatif Bakteriler

Nonfermentatif Gram-negatif bakteriler immün sistemi baskılanmış ve özellikle ilaç tedavisi alan hastalarda, fırsatçı patojenler olarak infeksiyonlara neden olmaktadır (10). Bu mikroorganizmalar insanlarda derinin bakteriyel florası başta olmak üzere solunum yolu florası ve oral florada bulunmaktadır. Doğada toprak, su ve nemli ortamlarda bulunmalarının yanı sıra özellikle hastane ortamında yaygın olarak bulunmaktadır. NFGN bakteriler kazanılmış ilaç direnci taşımaya eğilimlidirler. Bununla birlikte dirençli suşlarla meydana gelmiş olan infeksiyonlarda kullanıma giren yeni antimikrobiyal bileşenlere karşı da bakteriyel direncin hızla artmakta olduğunu bildiren raporlar mevcuttur. (11).

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S.maltophilia*) ve *Burkholderia cepacia* (*B.cepacia*) önemli hastane infeksiyonlarına yol açan NFGN bakteriler arasında yer almaktadır (12). Neden oldukları kronik infeksiyonlar arasında sepsisemi, solunum yolu infeksiyonları ve genitoüriner sistem infeksiyonları, intrakraniyal infeksiyonlar, endokardit, gastrointestinal sistem infeksiyonları, cerrahi alan infeksiyonu gibi birçok nozokomiyal infeksiyonlar bulunmaktadır (13).

3.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Günümüzde en önemli fırsatçı patojenler arasında yer alan *P.aeruginosa* doğada; toprak, su ve bitkilerde bulunur. Sağlıklı bireylerde kolonize olabilen bu bakteriler spor oluşturmeyen, 0,5-0,8 µm eninde ve 1,5-3,0 µm boyunda düz veya hafif kıvrık Gram-negatif basiller olup, *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en patojen türdür (9; 14) Polar flagel nedeniyle hareketlidir. *P.aeruginosa* en iyi 37°C'de üremesine rağmen 42°C'de üreyebilme özelliğine sahiptir. Çoğu suşta, ekstraselüler polisakkarit olan alginat bulunur. Alginat sentezinin fazla miktarda olması, bakterinin mukoid koloni oluşturmaya neden olduğu gibi, biyofilm oluşumunda da büyük öneme sahiptir. *P.aeruginosa*'nın pek çok karbon kaynağını kullanabiliyor olması kompleks besiyerlerinin yanı sıra basit besiyerlerinde de üreyebilme avantajı sağlamaktadır. Bakteri 45-50°C ısılarda ve distile suda dahi üreyebilme yeteneğine sahip olduğundan izolasyonları kolaydır. *P.aeruginosa* için seçici besiyerleri bulunmakla beraber setrimid agar deterjan içerdiği nedeniyle diğer mikroorganizmaların üremesini önleyen selektif bir besiyeridir. *P.aeruginosa* nitrat içeren ortamlarda nitratı son elektron alıcısı olarak kullanabildiğinden zorunlu aerob olmasının yanında anaerob koşullarda da üreyebilmektedir (14; 15; 16).

Pseudomonas aeruginosa'nın izole edildiği klinik örnekler infeksiyonlara bağlı olarak değişmekle birlikte pü, yara ve yanık sürüntüleri, idrar, BOS, kan, balgam, vb. örneklerdir. Yüzeyle tutunmayı sağlayan pek çok adezin *P.aeruginosa*'da bulunmaktadır. Bakterinin uç kısımlarında bulunan pili; hem konak dokulara adezyondan sorumlu olup, hem de cansız yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol alan virulans faktörlerden biridir. Bunun yanısıra *P.aeruginosa*'da

bulunan nöraminidaz enzimi ile de epitel hücelere aderans kolaylaşmış olur (14; 17; 18)

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden kolaylıkla ayırt edilebilmesini sağlayan sitokrom oksidaz aktivitesi *P.aeruginosa*'nın taşıdığı en önemli özelliklerinden biridir. Bu özellikleri nedeniyle karbonhidratları fermente etmezler. Ancak glikoz, fruktoz ve ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken, laktoz ve sukrozu okside etmez. İndol ve H₂S testleri negatiftir (17; 18).

Sağlıklı insanlarda nadiren hastalığa neden olmalarına rağmen, insanlarda sıkla karşılaşılan saprofit bir mikroorganizmadır. Bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar (konak savunmasının bozulmasına neden olan yanık, kanser kemoterapisi, uzun vadeli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner veya damar içi kateter, endotrakeal entübasyon ayrıca nötropeni, hipogammaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi) infeksiyon oluşumuna zemin hazırlar (17).

Pseudomonas aeruginosa'nın neden olduğu infeksiyonlar kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Cilt ve mukoza yüzeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında virülans faktörleri, konağın immun direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları önemli yer tutmaktadır. İnfeksiyon, kolonizasyon aşamasında kalabilir veya sistemik infeksiyonlara neden olabilir (14; 19; 20). *P.aeruginosa*'nın virülans faktörleri ve biyolojik etkileri Tablo 1'de gösterilmiştir (17).

Tablo 1. Pseudomonas aeruginosa 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri.

| Virulans faktörleri | Biyolojik etkileri |
|---|---|
| Yapısal Faktörler | |
| Kapsül: | Mukoid polisakkaridin yapılması. Adhezyon sağlanması Antibiyotiklerin bakterisidal etkisinin azaltılması. Nötrofil ve lenfosit aktivasyonunun önlenmesi. |
| Nöraminidaz: Piluslar ve nonpilus | Pilusların adhezyonunun kolaylaştırılması. Akciğer ve yara yerine adhezyon sağlanması. |
| Adezinler: Lipopolisakkarid: | Endotoksik aktivite. |
| Pyosyanin: | Siliyer fonksiyonunun bozulması. İnflamasyonun başlatılması. Toksik oksijen radikallerinin salınması ve doku hasarı. |
| Toksin ve Enzimler | |
| Ekzotoksin A: | Protein sentezinin EF2 etkileyerek önlenmesi Doku hasarının oluşması |
| Ekzototoksin S: Sitotoksin: | İmmünsüpresyonun sağlanması Protein sentezinin önlenmesi, immünosüpresyon Lökosit fonksiyonlarının bozulması |
| Elastaz, Alkalın proteaz: Fosfolipaz C: Rhamnolipid: | Pulmoner mikrovasküler yapıların hasarlanması Elastin içeren dokuların harabiyeti İnflamasyonun başlatılması Lesitin içeren dokuların harabiyeti ve pulmoner siliyer aktivitenin inhibisyonu |

Pseudomonas aeruginosa'nın hücre dışına salgıladığı birçok virulans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili "las" ve "rhl" olarak tanımlanan iki ÇA sistemi ile kontrol edildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (21). Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (LasA ve Las B), alkalen proteaz, hidrojen siyanid, ekzotoksin A, piyosyanin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen (rpoS), ve süperoksit dismutaz başta olmak üzere pekçok virulans etmeninin üretimini kontrol eder (22).

Pseudomonas aeruginosa sadece toplum kaynaklı infeksiyonlarda değil aynı zamanda hastane kaynaklı infeksiyonlarda da önemli bir yere sahiptir. Özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere, cerrahi ve yanık ünitelerinde sıklıkla karşılaşılan mikroorganizmalardır. *P.aeruginosa* ile infeksiyon gelişme riski

altında olanlar çoğunlukla mekanik ventilasyon, antibiyotik tedavisi, ve kemoterapi alan hastalardır. Mikroorganizmalar kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli olmaları ve konağın savunma sisteminin baskılanmış olduğu durumlar nedeniyle genellikle sebep oldukları enfeksiyonlar ağır seyirli devam etmekte ve tedavileri oldukça zorlaşmaktadır. *P.aeruginosa* bağışıklık sistemi baskılanmış olan, mekanik ventilasyon alan ve antibiyotik tedavisi gören hastalarda gelişen pnömonilerin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır (14; 20).

3.1.2. *Burkholderia cepacia* Kompleks

Toprak, su ve bitkilerden izole edilebilen bir mikroorganizma olan *B.cepacia* kompleksi, enfeksiyon etkeni olan diğer bakterilerden daha nadir olarak kronik granulomatozis hastalığı olanlarda, kanser hastalarında, ve transplantasyon hastalarında ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (23; 24).

Özellikle kistik fibrozis hastalarında oldukça ciddi problemlere neden olan bir bakteri olan *B.cepacia* kompleksi bir akciğer patojeni olarak bildirilmektedir (25).

Burkholderia cepacia kompleksi, bakteriyal kökenli akciğer patojenleri olarak sunulan *Staphylococcus aureus*, *P.aeruginosa* ve *Haemophilus influenzae* (*H.influenzae*) gibi son zamanlarda büyük önem taşıdığı bildirilmektedir. Bunun yanısıra *B.cepacia* kompleksi hastane enfeksiyonlarına neden olduğu gibi hastane dışında da temas yolu ile de sıklıkla bulaşabilen bir patojendir (26).

Burkholderia cepacia kompleksin solunum yolu enfeksiyonlarında *P.aeruginosa* ile beraber bulunabildikleri ve bu durumda kistik fibroz hastaları için oldukça önemli patojenler olarak yer aldıkları bildirilmiştir (27). Duyarlı hastalar

arasında kolaylıkla yayılma özelliğine sahip olan *B.cepacia* kompleksinin temas ile birlikte hızla yayılabilen bir bakteri olduğu bildirilmiştir (28; 29).

Son yıllarda akciğer infeksiyonlarının şiddetlenmesinde *B.cepacia* kompleksi türlerinin büyük rol oynadığı belirtilmektedir. Bunun yanısıra *B.cepacia* kompleksi tarafından infekte olmuş kistik fibroz hastalarında şiddetli ilerleyen bakteriyemi ile birlikte solunum bozukluğunun da ortaya çıktığı bildirilmektedir. *Burkholderia cepacia* kompleks bakterileri için 1985 yılında selektif bir besiyeri olan *B.cepacia* Selektif Agar (BCSA) geliştirilmesi ile birlikte kistik fibrozlu hastalardan daha fazla izole edilebilmiştir (30; 31).

Burkholderia cepacia kompleks ile infekte olan hastaların çoğunda kronik bir seyir görülmekte ve bakterinin virulansına bağlı olarak kademeli olarak hastaların durumları bozulabilmektedir. Bu durumda gelişen ateş ve bakteriyemi hastaların bir yıl içerisinde kaybedilmesine neden olmaktadır. Klinikte “Cepacia sendromu” denen bu durum hastaların yaklaşık %20’sinde ortaya çıkmaktadır (24).

Sıvı ortamlarda üreyebilen *B.cepacia* kompleks bakteriler dezenfektan çözeltileri, distile su, fizyolojik tuzlu su gibi sıvıları kontamine edebilmektedir. Diyalizat sıvılarında da üreyebilmeleri nedeniyle hemodiyaliz hastalarında salgınlara neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (32).

Burkholderia cepacia kompleks suşlarının neden olduğu infeksiyonların kontrol edilebilmesi, bu bakterinin pek çok antibiyotiğe karşı geliştirdiği dirençten ötürü oldukça zordur. Bu sebeple bakterinin duyarlı olduğu antibiyotiğin belirlenmesi ve tedavinin doğru verilmesi oldukça önem taşımaktadır (27; 28).

Burkholderia cepacia kompleks antibiyotiklere en dirençli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Aminoglikozid ve polimiksinlere intrinsek direnç gösterir. İlaç atım pompaları nedeniyle, kloramfenikol, trimethoprim ve florokinolonlara, β -laktamaz enzimleri sayesinde de β -laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir. Kistik fibrozisli hastalardan izole edilen suşlar genellikle çoklu ilaç direncine sahiptir (24).

3.1.3. *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia (*S.maltophilia*) ilk önce *Pseudomonas* cinsi içinde, daha sonra *Xanthomonas* cinsi içinde, bugün ise *Stenotrophomonas* cinsi içinde yer almaktadır. Son zamanlarda artan oranlarda izole edilen, *S.maltophilia* nozokomiyal infeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir (33). *S.maltophilia* doğada, sularda, toprakta, bitkilerde, insan ve hayvan dışkılarında, sütte ve hastane ortamında yaygın olarak bulunmaktadır. Nehir, kuyu suyu, atık sular ve şişe suyunda da tespit edildiği bildirilmiştir (34; 35).

Toplum kaynaklı infeksiyonlardan nadiren izole edilen *S.maltophilia* çoklu antibiyotik direncine sahip olmaları nedeniyle hastane infeksiyonlarına neden olmaktadır. Günümüzde hastanelerde ve özellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) gittikçe artan oranda infeksiyon etkeni olarak izole edilmektedirler (36). *S.maltophilia* klinik örneklerden en çok soyutlanan *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* türlerinin ardından en sık izole edilen Gram-negatif nonfermentatif bakteridir (34; 37).

Zorunlu aerob olan *S.maltophilia*'nın optimal üreme sıcaklığı 35°C olup, 5°C altında ve 40°C üzerindeki sıcaklıklarda üreyemez. Normal atmosfer basıncında

veya %5'lik CO₂ içeren ortamda üreyebilir. Kanlı agar, EMB agar ve MacConkey agarda üreyebilir. Kanlı agarda düzgün kenarlı, parlak, beyaz, açık sarı veya gri renkte olabilen koloniler oluşturur. MacConkey ve EMB agarda laktoz negatif koloniler görülür (34; 38; 39). Kanlı agarda birleşen kolonilerin etrafında yeşil renk değişimi gözlenebilir. *S.maltophilia*'nın beta hemoliz yapmadığı kabul edilmektedir (34; 38; 39).

Metabolik olarak nispeten inaktif olduğu kabul edilen *S.maltophilia* glukozu okside edebilir. Jelatin ve eskülini hidrolize eden *S.maltophilia* katalaz ve lizin dekarboksilaz pozitifdir. *S.maltophilia*'nın arjinin dekarboksilazı, üre hidrolizi, nitrat ve nitrit oluşumu negatifdir. Oksidaz negatifdir, ancak bazı suşlarda oksidaz reaksiyonu hafif pozitiflik verebilir. Ortonitrofenil-beta-dgalaktopiranozid (ONPG) testi pozitifdir (38; 40)

Stenotrophomonas maltophilia oksidaz reaksiyonunun olumsuz, DNAz olumlu olması ile *Pseudomonas*'lardan, kolistin ve polimiksin B'ye duyarlı olması, oksidasyon-fermentasyon reaksiyonunun negatif olması ve DNAz pozitif olması ile *B.cepacia*'dan ayrılır (38; 41)

Virulans faktörleri çok iyi bilinmeyen *S.maltophilia*'nın patojenitesi ve klinik örneklerden izole edildiğinde gerçek infeksiyon, kolonizasyon veya kontaminasyon ayırımı tam olarak yapılamamaktadır. İnfeksiyonun sıklıkla immün sistemi baskılanmış kişilerde gelişmesi virulansın nispeten düşük olabileceğini düşündürmektedir (34; 42).

Stenotrophomonas maltophilia DNAz, RNAz, fibrinolizin, lipaz, hyaluronidaz, elastaz gibi ekstraselüler enzimler üretmektedir. Bu enzimlerin

S.maltophilia patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Alkalin serin proteaz en önemli virülans faktörü olup, insan serumunu ve doku proteinlerini yıkan bir enzimdir. Bu enzim kollajen, fibronektin ve fibrinojenin protein komponentlerini yıkar. Lokal doku hasarı ve hemorajiden sorumludur (34; 38; 42; 43).

Stenotrophomonas maltophilia'nın dış membran lipopolisakkariti kompleman aracılı hücre ölümüne karşı koymada ve kolonizasyonda rol oynayan önemli bir virülans faktörüdür Yapılan çalışmalarda lipopolisakkarit kaybının *S.maltophilia* virulansında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (44; 45).

Biyofilm oluşturabilme özelliği *S.maltophilia*'nın bir diğer virülans faktörüdür. Özellikle flagella ve fimbrial adezinler biyofilm oluşumu ile ilişkilidir. Fimbriyal protein SMF-1 epitel hücrelerine adezyonda ve inert yüzeylerde biyofilm oluşumunda görev alır (44; 45) Plastik yüzeylere tutunabilme yeteneği ile kateter, solunum cihazları, protezler gibi tıbbi cihazlarda kolonizasyona, biyofilm oluşumuna ve damar yolu ile ilişkili enfeksiyonlara neden olabilir Biyofilm üreten *S.maltophilia* suşları fagositlere ve antibiyotiklere daha dirençli olmaktadır (40; 46; 47).

Stenotrophomonas maltophilia, çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde mekanik ventilatör alan hastalarda, KF hastalarında ve immün sistemi baskılanmış hastalarda morbidite ve mortaliteye yol açan nozokomiyal bir patojendir. *S.maltophilia* KF'li hastalarda solunum yolundan artan sıklıkta izole edilmektedir. KF'li hastalar arasında prevalansın gün geçtikçe arttığı bildirilmiştir. *S.maltophilia* özellikle erişkin KF'li hastalarında daha yüksek oranlarda izole edilmektedir (48; 49).

Bakteriyemi ve pnömoni *S.maltophilia*'nın sebep olduğu ve sıklıkla komplikasyonlara neden olan ve ölümlü sonuçlanan hastane infeksiyonlarıdır. Bu mikroorganizmanın neden olduğu hastane infeksiyonları genellikle damar içi katater, dezenfektan solüsyonlar, mekanik solunum cihazları aracılığıyla olmaktadır. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın neden olduğu diğer infeksiyonlar arasında damarıçi ilaç kullananlarda ve kardiyopulmoner cerrahi sonrası görülen endokardit, uzun süreli lens kullananlarda veya oküler cerrahi sonrası ortaya çıkan endoftalmit, menenjit nörocerrahi sonrası komplikasyon olarak görülen menenjit sayılabilir. Ayrıca *S.maltophilia*'nın izole edildiği selülit ve miyozit olguları rapor edilmiştir (42; 50; 51).

Birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olan *P.aeruginosa* ve *S.maltophilia* sık mutasyonlar ile tüm tedavilere dirençli hale gelebilmektedir. Dolayısıyla ile hastaneler ve özellikle yoğun bakım üniteleri gibi aşırı antibiyotik kullanılan ortamlarda önemli infeksiyonlara neden olabilmektedirler (52; 53).

3.1.4. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, 1-1,5 µm eninde, 1,5-2,5 µm boyunda, optimal 35-37°C'de üreyen Gram-negatif basillerdir. Zorunlu aerob olup, hareketsiz, sporsuz ve kapsüllüdür. Enterobacteriaceae üyelerinden, anaerob koşullarda üreyememesi ve nitrat redüksiyonunun negatif olması özellikleri ile ayrılır. Gram boyamada kristal viyole boyasını zor bırakması nedeniyle Gram-pozitif gibi gözlenebilir (54).

MacConkey agarda hafif pembe renkli koloniler oluşturur. *Pseudomonas*'lardan oksidaz testinin negatif olması ile ayrılırlar. Glikoz ve laktozu okside etmesi, üreaz testinin negatif olması *Acinetobacter* tanısını destekler.

Vankomisin, sefsulodin ve sefradin içeren Leeds Acinetobacter Medium (LAM) besiyeri *Acinetobacter*ler için selektif besiyeri olarak kullanılmaktadır (55; 56).

Acinetobacter baumannii doğada yaygın olarak bulunmakta olup, insan deri florasında normal flora elemanı olarak bulunabildiğinden klinik örneklerden çoğunlukla izole edilebilmektedir. Özellikle vücudun nemli bölgelerinde sıkça bulunan *A.baumannii* türleri insan derisinin doğal konakçıları arasında kabul edilmektedir. Sağlıklı insanların %25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdığı düşünülmektedir. *Acinetobacter* türleri hastane çalışanlarının deri florasında en sık izole edilen nonfermentatif Gram-negatif basildir. Bu durum, dirençli bakterinin hastane ortamında yayılmasında son derece önem taşır (57).

Diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında *A.baumannii* türleri kuruluk, farklı ısı ve pH dereceleri gibi olumsuz koşullara dayanıklı olmaları nedeniyle cansız yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmektedirler. Doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (55; 58).

Sağlıklı insanlarda normal flora elemanı olan *A.baumannii* başta ağız olmak üzere, üst solunum yollarında, genitoüriner sistemde ve alt gastrointestinal sistemde bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Faringeal kolonizasyon ise %7 oranında görülmektedir (55; 58; 59). Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların dışkılarında çoğul ilaç dirençli *A.baumannii* türlerinin izole edildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (54).

Acinetobacter baumannii türleri hastanelerde kullanılan buhar makinesi, periton diyalizat banyoları, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi

kateterleri, mekanik ventilasyon cihazlarının yanısıra hastane havasından bile izole edilmiştir (55; 60).

Hastane personelinin derisinde sürekli olarak bulunan *A.baumannii* türleri en yaygın nonfermentatif Gram-negatif bakterilerdir. Bu nedenle hastane çalışanları, rezervuar insanlar ve cansız materyaller, hastalar arasında geçiş için uygun bir ortam sağlamaktadır (55). Özellikle yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan hastaların yaklaşık %71' ini yatışı takip eden birinci haftanın sonunda *A.baumannii* türlerinin kolonize olduğu ve bu hastalarda *A.baumannii*'nin sebep olduğu infeksiyonların arttığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (61). *A.baumannii* infeksiyonları için en önemli risk faktörleri arasında hastanede uzun süreli yatış, cerrahi müdahale sonrası endotrakeal tüp takılması, intravasküler, ventriküler veya üriner kateter uygulaması, invaziv alet varlığı, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, parenteral beslenme ve mekanik ventilasyon gibi işlemler yer almaktadır (58).

Genellikle hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olan *Acinetobacter* türleri, toplum kaynaklı infeksiyonlara nadiren sebep olurlar. Tüm organlarda özellikle süperatif infeksiyonlara neden olan *Acinetobacter* türleri arasında en çok ve en ciddi klinik tablolara neden olan bakteri *A.baumannii*' dir. *A.baumannii*' pnömoni, bakteriyemi, sepsis, menenjit, üriner sistem ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olurlar (58).

Acinetobacter türlerinin virulans potansiyelleri bağışıklık sistemi normal olanlarda düşük olduğundan infeksiyon oluşturma olasılığı oldukça düşüktür. Düşük ısı ve asidik pH'da üreyebilme özelliklerinin yanısıra bilinen sitotoksin

üretimi yoktur. *A.baumannii* 'nin sahip olduğu ve bakteri hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin endotoksijenik özelliği hakkında çok az bilgi mevcuttur. (55).

Fagositozdan bakteriyi koruyan polisakkarit kapsül, insan epitel hücrelerine adheransı güçlendiren fimbria, dokulardaki yağları parçalayan enzimler ve bakteriyosin varlığı virulans faktörleri arasında sayılabilir. Bazı *Acinetobacter* türlerinin dış membran reseptör proteinleri gibi sideroforları ürettikleri gösterilmiştir. *A.baumannii* 'nin önemli virulans faktörlerinden biriside bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliğidir (55).

3.2. BİYOFİLM

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra, teknolojik gelişmelere bağlı olarak (özellikle elektron mikroskopunun artan kullanımı ile birlikte), mikrobiyoloji alanında önemli mesafeler kaydedilmeye başlanılmıştır. Bu döneme kadar, bakterilerin sıvıların içerisinde, planktonik olarak ve aynı zamanda diğer mikroorganizmalardan bağımsız olarak, serbest biçimde tek olarak bulunduğu düşünülmüş olup, yapılan çalışmalarla durumun böyle olmadığı aksine mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmek için planktonik formdan ziyade herhangi bir yüzeye tutunmak suretiyle biyofilm denilen bir yapı oluşturarak canlılıklarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya çıktığı pek çok çalışma yapılmıştır (62). Nemli ve ıslak yüzeylerde oluşan mukoidal yapıdaki mikroorganizmaların fenotipik olarak planktonik formlarından daha farklı oldukları bildirilmiş ve bu mukoidal yapılar biyofilm olarak adlandırılmıştır (63).

Biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1970' li yıllardan günümüze artarak bildirilmeye devam etmektedir. Biyofilm ile ilgili bilimsel çalışmaların artması ile birlikte biyofilm yapısı, oluşum nedeni ve mekanizması ile ilgili çalışmalar hızla ilerlemiş ve böylece derin yeraltı suları ve okyanusun derinlikleri haricinde biyofilmlerin varlığı tüm doğal ekosistemlerde tespit edilmiştir (64).



3.2.1. Biyofilm ve Önemi

Biyofilm, bakteriyel hücrelerin mikrobiyal olarak değişime uğramasıyla herhangi bir yüzeye veya birbirine tutunarak, matriksde denilen hücre dışı ekzopolisakkarit madde içerisine gömülü halde bulunan bir tek mikroorganizmadan köken alan, genetik yapı ve protein sentezi açısından planktonik formundan tamamen farklı, makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500µ boyutlarında, farklı ortamlara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi zor bir yapıdır (62).

Bakteriler tercihen olumsuz şartlarda biyofilm yaparlar. Biyofilm oluşumu sonrası sessil hücreler tarafından sentezlenen eksopolisakkarit matriks, biyofilme viskoelastik bir yapı kazandırır (65). Bakterilerin uygun koşullarda oluşturdukları biyofilmler kırılabilir bir yapıya sahipken, uygun olmayan koşullarda ürettikleri biyofilmlerin viskozitelerinin arttığı ve mekanik kırılmalara karşı daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (66).

Biyofilmin temel birimini bir veya birkaç türdeki bakteri hücresinden oluşan mikrokoloniler oluşturur. Mantar benzeri şekle sahip olan mikrokolonilerin %10-25'i hücrelerden, %75-90'ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır (66).

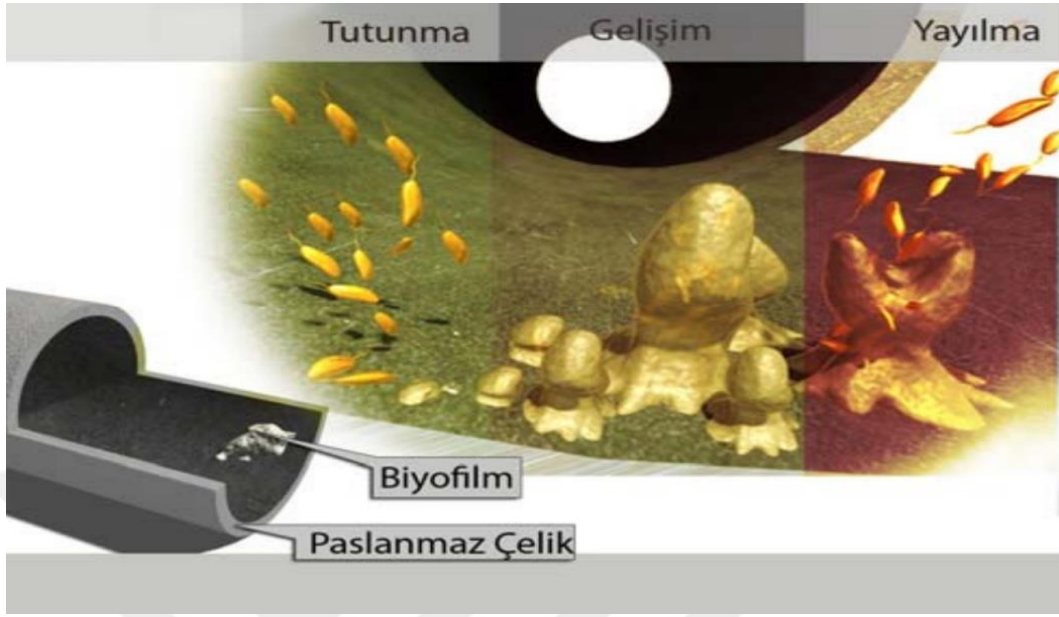
Endüstriyel su sistemlerinde ve petrol boru sistemlerinde önemli sorunlara neden olan biyofilmlerin tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp, başta yabancı cisim infeksiyonları olmak üzere çok sayıda kronik infeksiyonda rol oynadığı tespit edilmiştir (67).

Biyofilm yapısının bakterilerin adheransında, antibiyotik direncinde ve fagositoza karşı önemli bir engel olduğunun bilinmesi son yıllarda tıbbi önemini arttırırken; bakterilerin bir araya gelerek topluluk oluşturmaları ve gen modülasyonu aracılığıyla ortama adapte olmaları (Quorum sensing) tıbbi önemini daha da arttırmıştır (68).

Biyofilmler antibiyotik tedavilerinde aynı genetik yapıya sahip planktonik formlarına oranla 100–1000 kat daha fazla direnç geliştirmektedirler. Biyofilmlerin fagositoza karşı oluşturdukları direnç ve tedavi sonrası relaps oranının yüksek olması biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların uzaklaştırılmasının nedenli güç olduğunun en önemli göstergesidir (69).

Biyofilm oluşumunun başta doğal kapak endokarditi, osteomyelit, kronik bakteriyel prostatit, dental taşıyıcılık, tıbbi implant infeksiyonları, orta kulak infeksiyonları ve özellikle kistik fibrozisli kronik akciğer hastalıkları olmak üzere pekçok hastalıkta önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir (8).

Biyofilmin şematik yapısı Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyofilm ve oluşum aşamaları (70).

3.2.2. Biyofilm Yapısı

Biyofilmler üç boyutlu olarak incelendiğinde, mikroorganizmaların yüzeyinde düzensiz bir halde bulunan ekzopolisakkarit yapıda bir matriksten oluşmaktadır. Biyofilm matriksinin genişliği ve yoğunluğu sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda bakteri türleri arasında da değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Biyofilmlerin büyük bir bölümü (%73-98) hidrate şekildedir (71).

Mikroskobik olarak incelendiğinde biyofilmler içerisinde kanal sistemlerinin bulunduğu, mevcut ortamda bulunan organik ve inorganik yapıdaki moleküllerin ekstraselüler matrikste toplanmasıyla, mercan kayalıklarına benzer bir yapı oluşturan ve bu yapı üzerinde piramid veya mantar şeklindeki uzantılardan oluşan

bir yapı görünümünde olduğu tespit edilmiştir. Biyofilmin yoğun ve kompleks olan bu mercan kayalık görünümlü yapısı, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstraselluler yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (71).

Ortamda yer alan besinlerin hücre içine alınarak kullanımı ile biyofilm içerisinde oluşan atıklarının uzaklaştırılması biyofilmin gelişme potansiyeli ile ilişkili olup, bunların yanısıra besin azlığı sonucu eksprese olan Quorum-Sensing (QS) moleküllerinin salınımı, O₂ varlığı, ortamın pH'ı, karbon kaynağı ve ozmolarite de biyofilm gelişimde çok önemli bir etkiye sahiptir (71).

Yapılan çalışmalar ile bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınan ve bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyerek hücreler arası sinyal iletimini sağlayan (acylated homoserine lactonase ve benzeri) moleküllerin biyofilm yapımının düzenlenmesinde de rol oynadığı belirlenmiş ve biyofilmin patojenitesinde ve çevreye uyumunda önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (71).

3.2.3. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Biyofilm oluşumunun ilk adımı bakterinin yüzeye yapışması kabul edilir. Bu ilk adım bakterinin yapışacağı yüzeyin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bakteri, virüs vb. mikroorganizmaların substrata yapışabilmesi onların hidrofobik özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes (L.monocytogenes)*' in hidrofobik yüzeye sahip alanlarda daha fazla buldukları tespit edilmiştir (72).

Biyofilm oluşumunu etkileyen faktörleri iç ve dış faktörler olmak üzere iki gruba ayırabiliriz. İç faktörleri su, besin maddelerinden faydalanabilme, antimikrobiyal madde varlığı, pH değeri, oksijen varlığı ve oksijen ihtiyacı ile elektriksel yük değişkenliği gibi durumlar oluştururken dış faktörleri ise materyalin yüzeyi, yüzey alanı, yüzeyin pürüzlü olup olmaması, sıvının akış hızı ve sıvının yoğunluğu ile besin maddesi kıtlığı şeklinde sıralanabilir (73).

Aynı zamanda bakteri yüzeyinin biyokimyasal yapısının da tutunmada önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur. Mikroorganizmaların sıcaklığa, bağlı neme, kalıntı miktarına bağlı olarak uzun süre ortamda çoğalmadan bulunabildiği bilinmektedir (74).

3.2.4. Biyofilm Oluşum Basamakları

Mikroorganizma, glikokaliks ve yüzey bir biyofilmin oluşması için gerekli bileşenlerdir ve bu bileşenlerden birinin eksikliğinde biyofilm meydana gelmez (66). Bir biyofilmin yapısı %95-97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmlerin yapısında tek bir bakteri türü bulunabildiği gibi yapısında çok sayıda farklı bakteri türünü de barındırabilirler Farklı bakteri türlerinden meydana gelen biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturmaktadır. Biyofilmi oluşturan bu farklı mikrokoloniler su kanalları aracılığıyla birbirlerinden ayrılmaktadır. Biyofilmde yer alan bu kanallar mikroorganizmalar tarafından ihtiyaç duyulan su akışı, besin maddelerinin taşınımı ve oksijenin difüzyonunu sağlarlar. Olgun bir biyofilmin meydana gelmesi biyofilmin yapısına, biyofilmi oluşturan bakteri türüne ve

çevresel faktörler ile ilişkili olarak birkaç dakika ile birkaç hafta sürebilir. Örneğin; *P.aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır (2).

Biyofilm ile ilgili yapılan çalışmalarda biyofilm gelişimi ile ilgili pekçok gen bulunmuş ve bu genlerin metabolik aktiviteler, hücre duvar yapımı, adezyon, quorum sensing, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Mikro çevrede meydana gelen değişiklikler biyofilm oluşum sürecinde gen ekspresyonlarında değişiklikler yaparak biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşumuna etki eden genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu artırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilmi meydana getiren genetik materyal plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır (75).

Uygun mikroorganizmaların varlığında biyofilm gelişimi neredeyse her çevre ve her yüzeyde meydana gelebilir. Biyofilm oluşumu 5 evrede gerçekleşmektedir: Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 2' de şematize edilmiştir (76).



Şekil 2. Biyofilm oluşum aşamaları.

3.2.4.1.Tutunma

Bakterilerin ilk olarak bir yüzeye tutunmaları ile biyofilm oluşumu başlamaktadır. Dinamik bir olay olan biyofilm oluşumunda, ilk adım olan tutunmayı takiben biyofilm fenotipinin oluşmasını sağlayan bir dizi genetik işlem başlar. Çevresel uyarıların bakteriler tarafından fenotipik değişikliklere dönüştürülebilmesi için, bakteriler bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma olayını takiben biyofilm oluşumunda farklılaşma işleminin başlaması, çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılan (QSS) haberleşme sisteminden gelen yanıtlar ile gerçekleşir. Bu sistem sayesinde bakteriler buldukları ortamdaki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Yüzeye tutunmayla başlayan biyofilm oluşum sürecinde her bakteri, ortama düşük molekül ağırlıklarına sahip haberci moleküller salgılar. Birbirleriyle iletişim sağlayan ve yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Gittikçe artan sinyal molekülü konsantrasyonu sayesinde biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmaktadır (77).

Bakteri hücreleri arasında gelişen etkileşim başlangıçta zayıf ve geri dönüşümlü tutunmadır; geri dönüşümlü tutunma sürecini etkileyen çeşitli uzun mesafe etkileşim güçleri, elektrostatik güç ve hidrofobik etkileşimlerdir. Geri dönüşümlü tutunma çok az bir durulama gibi kesici güç akımları ile ortadan kaldırılabılır (78). Biyofilm oluşumundaki bir sonraki çok önemli basamak ise bakterilerin irreversible tutunmasıdır. Bakterilerin flagella, fimbria ve pili gibi yüzey uzantılarının varlığı ve ekzopolisakkarit fibrillerinin üretiminden dolayı yüzeye temasın devam etmesi, itici güçlerin bakteri ile yüzey arasındaki direkt kontakın

engellenmesindeki en önemli sorunu ortadan kaldırdığı görülmektedir (79). Geri dönüşümsüz tutunma dipol-dipol etkileşimi, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içerir. Yüzeyle geri dönüşümsüz tutunmaya olanak sağlayan fibriller bakteri hücresi ile yüzey arasında köprü görevi gören polimerik yapılardır. Geri dönüşümsüz tutunma sürecinde hücrelerin yüzeyle ilişkisinin kesilmesi veya ortadan kaldırılması için fırçalama ve ovalama gibi çok güçlü kuvvetler gereklidir (80).

3.2.4.2. Yapışma

Bakterilerin kuvvetli bir şekilde tutunma işlemi olan yapışma olayında, yüzeyle tutunan bakteriler, hücrelerin birbirine ve yüzeyle tutunmasını sağlayan hücre zarında yer alan proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar (81).

Pseudomonas aeruginosa türü bakterilerden oluşan biyofilmlerin neden olduğu kistik fibrozis olgularında yapışmayı sağlayan virulans faktörü aljinat yapıdadır. Ekzopolisakkarid madde aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlar (81).

3.2.4.3. Toplanma

Yüzeyle tutunan bakterilerin bölünüp çoğalmasıyla oluşan mikrokoloniler biyofilmin en küçük organizasyon birimini oluşturmaktadır (82). Ortamda yer alan planktonik bakterilerin oluşan mikrokolonilerin üzerine yapışmasıyla kolonizasyon sağlanır. Bu periyotta yapışan planktonik bakteriler, hücrelerin yüzeyle

sabitlenmesini ve çevreden gelen bozucu etkilere, karşı koymasını sağlayan polimer EPS üretimi gerçekleştirir (83).

3.2.4.4. Olgun Biyofilm Oluşumu

Büyüyen mikrokoloniler daha kompleks bir yapıya sahip olan mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşerek olgun biyofilmi meydana getirirler (84). Mantar veya kule benzeri yapılar oluşturan mikrokolonilerin aralarında besinlerin biyofilm içerisine ulaştırılmasını ve aynı zamanda biyofilm içerisinde oluşan metabolik atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan bir dolaşım sistemi benzeri görev yapan su kanalları bulunmaktadır (85).

3.2.4.5. Kopma veya Ayrılma Evresi

Fiziksel kuvvetlerin etkisiyle yada biyofilm oluşum prosesinin bir sonucu olarak, tek bir bakteri veya multiple hücrelerin emboli şeklinde biyofilm tabakasından kopması nedeniyle bakteri veya bakteriler bir arada ortama yayılırlar (86). Hücreler bu aşamada biyofilm yapısını terk ederek planktonik formlarına geri dönerler (87). Artan akış kuvveti (88), hücre içerisinde görülen enzimatik bozulma, EPS veya yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi işlemler biyofilm hücrelerinin kopmasında önemli rol oynamaktadır (89). Bunların yanı sıra ortamda var olan besin maddelerinin tükenmesi de hücresel kopuşların önemli etkenleri arasındadır (90).

3.2.5. Biyofilm ve Gen Transferi

Bakterilerin buldukları mevcut ortam, diğer bakterilerle iletişimleri ve kendi içlerindeki yapısal değişimlere bağlı olarak genetik materyallerinde meydana

gelen değişikliklerin çok çeşitli olduğu ve bunların geniş bir perspektif sergiledikleri yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (91).

Ekstrakromozomal DNA (plazmid) değişimi için biyofilmin ideal bir yapı oluşturduğu ortaya konmuş ve biyofilmi oluşturan bakteriler arasında gerçekleşen konjugasyonun, planktonik formdaki bakterilerden çok daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturmaya daha yatkın olan bakterilerin konjugasyona hazır plazmid içeren bakteriler oldukları öne sürülmüştür (92).

Alici ve verici arasında aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabileceği bildirilmiştir. Bu dirence bağlı olarak, biyofilmin antimikrobiyallere karşı gelişen direncin oluşmasında önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (93).

3.2.6. Quorum Sensing Sistem (QSS-Mikrobiyel Populasyon Etkileşimi)

Hücreden hücreye yollanan ve “Quorum Sensing Sistem (QSS)” olarak adlandırılan iletişim sinyalleri aracılığıyla bakteriler biyofilm oluşumunu kontrol etmektedir. Bakteriler patogenezi için buldukları ortama uyum sağlarlar ve buldukları ortamdan gelen uyarıları algılayarak, bu uyarılara cevap geliştirirler. Mikroorganizmalar ortam koşullarında meydana gelen herhangi bir değişim neticesinde yapılarında bir takım değişiklikler meydana getirerek yeni ortam koşullarına adapte olmaya çalışmaktadırlar. Birçok genin kontrolü altında gerçekleşen Quorum Sensing Sistemi bakterinin buldukları ortamdaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yardımcı olan bir sistemdir (94). “Minimum popülasyon birimini algılama” olarak da ifade edilen “Quorum sensing” sistemi sayesinde bir noktada toplanan bakteriler biyofilmin temelini oluştururlar (95).

Mikroorganizmalar çevresel uyarılara bağlı olarak planktonik formda yada bir yüzeye tutunmuş olarak bulunabilirler. Besin kaynaklarındaki yetersizliğe bağlı olarak durağan faza geçiş olayı gelişir ve çoğunlukla bakteriler kendilerini biyofilm içinde korumaya alır (96).

“Quorum sensing” sistemi sayesinde bakteriler davranışlarını koordine ederler ve besin kaynaklarına adaptasyon geliştirirler. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşıabilir ve en önemlisi, infeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtta kaçabilir. “Autoinducer”da olarak adlandırılan sinyal molekülleri “Quorum sensing” sistemi içinde en önemli rolü üstlenir. Gram-negatif bakterilerde sinyal molekülleri asil homoserin lakton (AHL), siklik dipeptidler iken, Gram-pozitif bakterilerde ise küçük peptidlerdir. “Autoinducer-2” ise hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerde sinyal molekülü olarak görev yapar (97).

Pseudomonas aeruginosa'da AHL sinyal molekülüne ek olarak *Pseudomonas* kinolon sinyal molekülü (PQS) bulunur. Yapısal olarak kinolonlara benzemekte olan PQS, AHL'ye bağlı “quorum sensing” sistemini modüle etmektedir (98).

Pseudomonas aeruginosa'da AHL ailesi üyelerinin yer aldığı las ve rhl olmak üzere iki “quorum sensing” sistemi bulunmaktadır (99). Kistik fibrozis olgularının balgam örneklerinde her iki sistemin de aktif oldukları saptanmıştır. Bu olgularda *P.aeruginosa* izolatlarının ortak özellikleri arasında sıklıkla mukoidal yapıda olmaları, aljinat sentezinin aşırı miktarda olması ve neden oldukları infeksiyonların antibiyotik tedavilerine yeterli yanıt vermemesi şeklinde sayılabilir. *P.aeruginosa*'

nın biyofilm içerisinde üremesi hem antibiyotiklerin etkisinden hem de immün yanıtın korunmasını sağlamaktadır (100).

Sinyal molekülleri ile etkileşimin aynı türler arasında veya farklı türler arasında olabildiği gibi farklı cinsler arasında da pozitif veya negatif yönde gerçekleştiği gözlenmiştir (101). Aynı aileye ait sinyal molekülü sentezinin farklı Gram-negatif bakteriler tarafından yapıldığı bilinmektedir. Örnek olarak aynı sinyal moleküllerinin kullanıldığı “quorum sensing” sistemine sahip olmaları nedeniyle kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde enfeksiyona yol açan ve ciddi mortalite nedenlerinden olan *P.aeruginosa* ve *B.cepacia*’nın birbirlerinin virülans faktörlerinin sentezine yardımcı olması verilebilir (102).

Hastane enfeksiyonlarında önemli bir fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa* virülans faktörlerinin sunumunu “quorum sensing” sayesinde gerçekleştirebilir. Biyofilmler kronik enfeksiyonlara zemin hazırlayan önemli bir virülans faktörüdür (103).



Şekil 3. Biyofilm yapısında sinyal moleküllerinin iletimi (104).

3.2.7. Neden Biyofilm

Biyofilm oluşturan bakteri formları ile planktonik formlar arasında ciddi bir gelişme geriliği olmasına rağmen bakterinin biyofilm oluşturmasını gerektiren bir takım durumlar vardır. Bunlar:

3.2.7.1. Savunma

Bir takım fiziksel güçlere karşı (kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi) dayanıklılığı olan biyofilm strese cevap olarak oluşmaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, besin azlığı, fagositoz, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı planktonik formdaki mikroorganizmalardan daha dirençlidir. EPS molekülü bulunduğu bakteriyi elektriksel çekim gibi güç alanlarından uzaklaştırarak savunmada önemli rol oynar ve bakteriyi inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korurlar (69). Mikroorganizmalar bulunduğu ortamdan aldığı sinyaller sayesinde tehlikede olduğunu algılayıp mevcut genleri yardımıyla biyofilm oluşturur ve böylelikle kendilerini koruma altına almış olmaktadır. Bu nedenle biyofilmler kronik seyirli infeksiyonlarda bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olarak bilinmektedir (69).

3.2.7.2. Adhezyon ve Kolonizasyon

Mikroorganizmalar açısından biyofilm oluşturmak, yaşam için gerekli olan ortamda kalabilmenin en bilinen yoludur. Bilindiği gibi vücut, bakterilerin yaşamasını sağlayan ortam olup, bakterilerin biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Bir takım stratejiler bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamaktadır. Bakterilerin adheransı

kendilerine ait yüzey proteinleri vasıtasıyla, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışmaları şeklinde gerçekleşir. Bu matriks ve adhesin proteinleri konakçı ile bakteri arasındaki adheransın oluşmasında anahtar rol oynamaktadırlar (105). Adherans sonrası yerleşen bakteriler bir yandan üreyerek çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşumunu gerçekleştirirler. Biyofilmin bakteri adheransını arttırdığı ancak ilginç olanın ise biyofilm oluşumu ile birlikte bakteri motilite ve adhezyon faktörlerinin ekspresyonunda bir baskılama olmasıdır (106).

3.2.7.3. Yaşanabilir Çevre Geliştirme

Bakteri tarafından kullanılabilir glukozun ortamda olmasının özellikle *Pseudomonas*'lar, *Vibrio cholerae* (*V.cholerae*), *E.coli* ve *Staphylococcus*'ların EPS ekspresyonunu ve dolayısıyla biyofilm oluşumunu belirgin bir şekilde arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Biyofilm oluşumunda bakterinin gen regülasyonunu indükleyen karbon katabolitlerinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu durumun bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesini sağlamak için biyofilm oluşumunun gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir (90)

3.2.7.4. Kominite Oluşturma

Kominite kazançların ortak paylaşımı olarak ifade edilmekte olup, mikroorganizmaların ortama adaptasyonundaki beraberlik bakterilerin biyofilm oluşturmasında sıklıkla görülmektedir. Bakteriler ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler vasıtasıyla biyofilm oluşturabildikleri gibi yine aynı genler vasıtasıyla ortamdaki uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) yardımıyla planktonik

forma geçebilmektedirler. Bakterilerin çevre faktörlerine benzer yanıt vermeleri ve benzer fenotipik değişiklikler göstermeleri kommensal yaşamlarının en önemli göstergesidir (90).

3.2.8. Biyofilm Oluşumunun Klinik Olarak Önemi

Son 30 yıldır biyofilmler ile ilgili yapılan çalışmalar biyofilmlerin ne denli önemli olduğunu anlaşılması açısından kayda değer sonuçlar ortaya koymuştur. Biyofilmler vücut içerisinde başta yüksek ateş olmak üzere ciddi organ hasarları ve hatta ölüme bile neden olabilmektedir. Biyomalzemeler üzerine tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak veya zaman zaman biyofilmden koparak vücutta başka yerlerde de kronik infeksiyonlara neden olurlar (67).

Klinik açıdan bakıldığında canlı dokularda ve vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde biyofilmler oluşabilirler (107). Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında, protez kapak, santral venöz kateter, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim infeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağ artık kanıtlanmıştır (8).

Yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için çoğunlukla bir konağa ihtiyaç duyan patojen mikroorganizmaların tutunması için uygun proteinlere sahip olan canlı doku, aynı zamanda mikroorganizmaların beslenmesi için önemli olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunmayla birlikte uygun yaşam koşullarına sahip olan bakteriler çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler (8).

Doku yüzey kimyasındaki değişimler, antibiyotik tedavisi ve yaşlanma ile birlikte normal bir bakteriyel floranın patojenik hale geçmesi de söz konusu olabilir. Aynı şekilde patojen olmayan (saprofit) mikroorganizmaların normal buldukları ortamdaki farklı bir bölgeye yerleşmeleri aşırı üreme ve buna bağlı olarak zehirli atık üretiminin artmasına yol açarak patojen hale geçmesine sebep olabilir. Yapışkan polimerler üretilip, fimbria gibi yüzey bileşenlerini kullandıklarından kuvvetli bir yapışma özelliğine sahip olan mikroorganizmalar buldukları ortam başta sıvı akışı (örneğin kan) olmak üzere mekanik hareket vb. kendileri için olumsuz olabilecek pekçok fiziksel şarttan korunurlar (108).

Metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler gibi biyomalzemelerden yapay deri, damar, kalp, eklem gibi pekçok protez üretilmektedir. Vücut tarafından kabul edilen biyouyumlu malzemeler aynı zamanda bakteriler içinde uygun birer ortam olabilirler. Örneğin fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler vücut hücrelerinin kaplanması için kullanılır ve bu proteinler sadece vücut hücreleri için değil aynı zamanda bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedirler (108). Patojen mikroorganizmaların biyomalzemeye ulaşabilmeleri iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi, üretim veya implantasyon aşamasında kullanılan biyomalzemenin bakterilerle teması sonucu enfekte olması ve vücuda bu şekilde yerleşmesi şeklinde olur. İkincisi ise, vücut içerisinde bulunan veya ağız, burun gibi vücudun dış ortama açılan kısımlarından vücuda bulaşan mikroorganizmaların vücut sıvıları vasıtasıyla biyomalzemeye ulaşması şeklinde gerçekleşir. Mikroorganizmaların canlı dokularda bağışıklık sistemiyle karşı karşıya gelmemeleri, sentetik biyomalzemelerin mikroorganizmalara sağladıkları en önemli avantajdır. Bunun yanı sıra, mikroorganizmaların sentezlediği hücre dışı

polisakkarit matris için biyomalzemelerde bulunan Al^{+3} , Mg^{+2} gibi bazı metallerin destek malzeme oluşturmalarıdır. Böylece mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarına karşı daha dayanıklı hale gelmesi sağlanır (67).

3.2.9. Biyofilmlerin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Biyofilmlerin neden olduğu infeksiyonların bulunma sıklığı ve modelini belirlemek güçlük arz etsede biyofilmlerin, dental plak, üst solunum yolu infeksiyonları, peritonit, ürogenital infeksiyonlar ve yabancı cisim infeksiyonları gibi pekçok durumla ilgili oldukları söylenebilir. Kronik infeksiyonlardan normal flora oluşumuna kadar pek çok yerde biyofilmler, önemli bir rol oynamaktadırlar. Biyofilm oluşumu; *S.aureus*, *S.epidermidis*, *viridans streptokoklar*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B.cepacia*, *A.baumannii* *V.cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida spp.* gibi birçok mikroorganizmada bildirilmiştir. Herhangi bir yüzeye adherans yeteneğinin biyofilm oluşturan bakterilerde, biyofilm oluşturmayan bakterilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir (109).

Konak savunması başta olmak üzere antibiyotiklerden ve dezenfektanlardan korunmayı sağlayan biyofilmler özellikle biyofilm içerisinde yer alan bakterilerin konak savunmasından korunmasında anahtar rol oynar (110).

Gastroenterik infeksiyonların %30'undan *Aeromonas*'ların neden olduğu biyofilm oluşumları sayesinde gerçekleştiği yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. *Aeromonas* türlerinin konak hücrenin yüzeyine tutunmasında kritik rol oynayan lateral ve polar flagellaları ile biyofilm oluşumu sırasında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Polar flagella yüzme hareketi ve ilk tutunma ile intestinal kolonizasyonda rol oynarken lateral flagella ise, belirgin bir şekilde hücrelere

tutunmada rol oynamaktadır. Bu flagellalar insan bağırsak hücrelerine tutunabilmekte olup, tüm bu bulgular her iki flagellanın *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumu esnasında yüzeylere tutunmasında etkili olduğu sonucunu desteklemektedir (109).

3.2.9.1. İnsanlarda Biyofilmlerin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Biyofilm ile ilişkili birçok insan infeksiyonu mevcuttur. Patojen mikroorganizmalar ve sorumlu oldukları infeksiyonlar Tablo 2'de gösterilmiştir (111).

Tablo 2. İnsanlarda biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar. (111)

| İnfeksiyonun Adı | Biyofilm oluşturan mikroorganizma |
|-------------------------------------|---|
| YBÜ’de gelişen pnömoni | Gram-negatif basiller |
| Cerrahi sütürler | <i>S.epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i> |
| Arteriyovenöz şantlar | <i>S. epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i> |
| Kontakt lensler | <i>P.aeruginosa</i> ve Gram-pozitif koklar |
| Üriner kateterler, sistit | <i>E. coli</i> ve diğer Gram-negatif basiller |
| Peritoneal dializ (CAPD) peritoniti | Çeşitli bakteri ve mantarlar |
| İntrauterin araçlar | <i>Actinomyces israelii</i> ve diğerleri |
| Endotrakeal tüpler | Çeşitli bakteri ve mantarlar |
| Hickman kateterleri | <i>S.epidermidis</i> ve <i>Candida albicans</i> |
| Santral venöz kateterler | <i>S.epidermidis</i> ve diğerleri |
| Mekanik kalp kapakları | <i>S.aureus</i> ve <i>S.epidermidis</i> |
| Vasküler greftler | Gram-pozitif koklar |
| Ortopedik araçlar | <i>S.aureus</i> ve <i>S.epidermidis</i> |
| Penil protezler | <i>S.aureus</i> ve <i>S.epidermidis</i> |
| Dental protezler | Asidojenik Gram-pozitif koklar (Streptokoklar) |
| Periodontit | Gram-negatif anaerobik oral bakteriler |
| Otitis media | <i>H.influenzae</i> |
| İskelet-kas enfeksiyonları | Gram-pozitif koklar (örn. stafilokoklar) |
| Nekrotizan fasiit | Grup A streptokoklar |
| Safra yolu enfeksiyonları | Enterik bakteriler (örn. <i>E. coli</i>) |
| Osteomyelit | Çeşitli bakteri ve mantarlar – sıklıkla mikst |
| Bakteriyal prostatit | <i>E.coli</i> ve diğer Gram-negatif basiller |
| Doğal kapak endokarditi | Viridans streptokoklar |
| Kistik fibroz pnömonisi | <i>P.aeruginosa</i> ve <i>B.cepacia</i> |

3.2.9.2. Tıbbi Cihazlarda Biyofilm Oluşumu

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konulardan biri tıbbi cihazlarda biyofilm oluşumu olup, birçok cihaz üzerinde biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Protetik kalp kapakçıkları, kontakt lensler, intrauterin cihazlar, üriner kateterler ve

santral venöz kateterler en sık biyofilm oluşumu gözlenen cihazlar arasında sayılabilirler (67).

Cerrahi olarak Prostetik kalp kapakçıklarının (PKK) implantasyonundan sonra, doku hasarı meydana gelmekte olup, sütür hattında ve PKK üzerinde fibrin ve platelet akümüasyonu olmaktadır. Sonrasında buraya mikroorganizmaların gelip yapışmasıyla biyofilm oluşumu başlamaktadır (112) . Erken dönemde etken olarak koagülaz negatif *Staphylococcus* izlenirken geç dönemde etken olarak koagülaz negatif *Staphylococcus* 'lar ile birlikte *Streptococcus*, *Enterococcus*, *S.aureus*, Gram negatif kokobasiller veya funguslar izole edilebilmektedir (8) .

Santral venöz kateterle (SVK) ilişkili infeksiyon oranı başka hiçbir tıbbi cihazda bu kadar yüksek olmayıp, %3-5 olarak bildirilmiştir (113). Biyofilm oluşumu SVK'in gerek üzerinde gerekse lümeni içerisinde yaygın bir şekilde gerçekleşmektedir (114). SVK direkt olarak kan akımıyla temas halinde olduğundan, yüzeyi plateletler, plasma, albümin, fibrinojen, fibronektin ve laminin gibi doku proteinleriyle kaplanmakta ve mikroorganizmaların bu doku proteinlerine ve plateletlere yapışmasıyla ve biyofilm oluşumu başlamaktadır (115). Kateterizasyonu takip eden ilk birkaç gün içerisinde kolonizasyon ve biyofilm oluşumu başlar. SVK infeksiyonlarında en sık izole edilen mikroorganizmalar *S.aureus*, koagülaz negatif *Staphylococcus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.faecalis* ve *Candida albicans* (*C.albicans*) olarak sıralanabilir (115).

Biyofilm oluşumunun yaygın olarak görüldüğü cihazlar arasında üriner kateterler, kontakt lensler ve intrauterin cihazlar gelmektedir (116). Hem sert hem de yumuşak kontakt lensler mikroorganizmaların kolaylıkla yapışabildiği cihazlardır (117).

Kontakt lenslerle ilişkili enfeksiyonlarda saptanan mikroorganizmalar arasında *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Serratia spp.*, *E.coli*, *Proteus spp* , ve *Candida* ilk akla gelenlerdir (117).

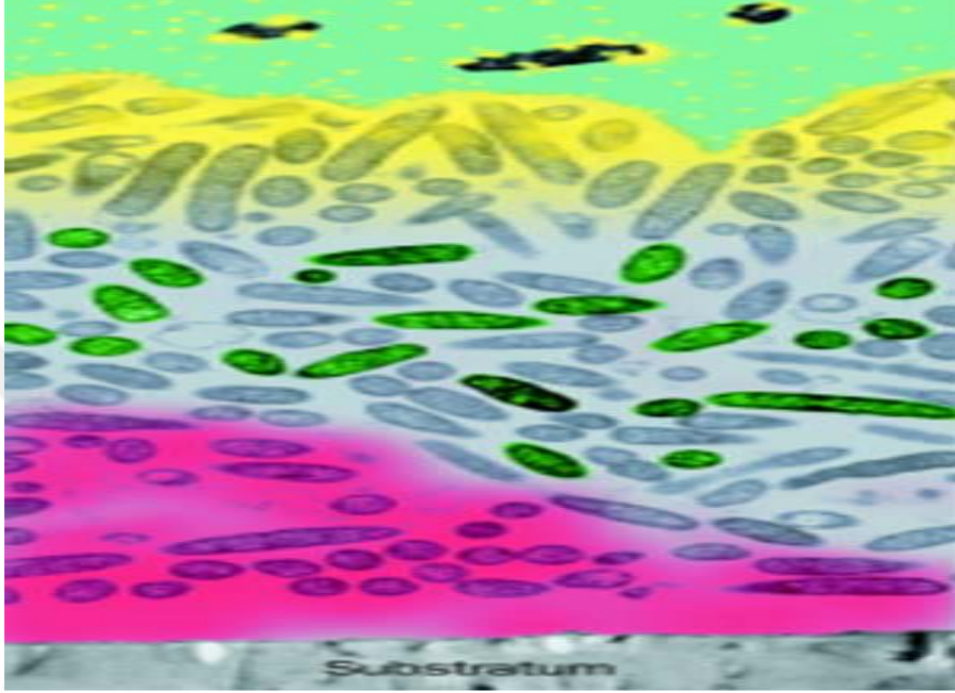
Pelvik enflamatuvar hastalık oluşumunda intrauterin cihazlar, önemli etkenlerdendir. İntrauterin cihazlar birçok mikroorganizma tarafından kolaylıkla kontamine olabilmekte olup, biyofilm oluşumu pek çok yayında gösterilmiştir (117).

3.2.10. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç İlişkisi

Bakterilerin %99'unun biyofilm içinde bulunduğu ve insanlardaki bakteriyel enfeksiyonların en az %65'inden biyofilm oluşumunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Konak cevabından kurtulup antibiyotik tedavisine sıklıkla direnç göstermeleri, biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliğidir. Laboratuvar koşullarında (in-vitro) yapılan testlerde biyofilmi oluşturan bakterilerin, serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MİK) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna direnç gösterdikleri bulunmuştur (118).

Vücut içerisinde (in-vivo) yer alan serbest bakteriler antibiyotikler ile yok edilerek enfeksiyon riski azaltılabilirken, antibiyotik tedavisi kesildiği andan itibaren biyofilm oluşumunun gözlendiği rapor edilmiştir. Antimikrobiyallere karşı direnç, mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarıyla oldukça artar. Tek başına bulunan bir mikroorganizma, herhangi bir antimikrobiyal ile kolayca inhibe edilebilmesine rağmen, aynı mikroorganizma biyofilm mimarisinde yer aldığı zaman aynı antimikrobiyal ile inhibe etmek oldukça zorlaşır (119).

Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilm içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfektan ve germisid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermektedir. Direnç gösterme mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir (105).



Şekil 4. Biyofilimde antibakteriyellere karşı gelişen direnç (118).

Yavaş Penetrasyon : Sarı ile gösterilen kısımlarda antibiyotik alt tabakalara ilerleyemez.
Dayanıklı Fenotip : Yeşil ile gösterilen kısımlarda bakteriler antibiyotiğe dirençlidir.
Değişken Ortam : Pembe ile gösterilen kısımlarda metabolitler antibiyotiklerin etkisini azaltır.

3.2.10.1. Antimikrobiyal Ajanların Geç Penetrasyonu

Biyofilm matriksinden difüzyonla geçebilme antimikrobiyal ajanların hedef hücrede etki edebilmesi için öncelikli şarttır. Biyofilm matriksini oluşturan hücre dışı polimerik maddeler bir bariyer görevi görerek antimikrobiyal moleküllerin yayılım hızını yavaşlatır veya matriks ajanlarıyla ilişkisini keser (120).

3.2.10.2. Biyofilmi Oluşturan Mikroorganizmaların Çoğalma Hızlarının Değişmesi

Biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların planktonik fazdaki mikroorganizmalara göre daha yavaş büyümesi ve bunun sonucunda antimikrobiyal ajanların bu mikroorganizmalara alımının yavaşlaması biyofilm oluşturan mikroorganizmalardaki antimikrobiyal ajanlara karşı oluşan direnç için önerilen bir diğer mekanizmadır (121).

3.2.10.3. Biyofilm Oluşumuna Bağlı Meydana Gelen Fizyolojik Değişimler

Besin kıtlığı veya oluşan toksik metabolik maddelerin konsantrasyonlarının artması biyofilm gelişimi üzerine oldukça etkilidir ve bu durum biyofilmin derin tabakalarında şiddetli şekilde izlenebilir. Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalardan en az bir kısmı besin kıtlığı yaşamakta ve bu onların üreme fazında bir yavaşlamaya neden olmaktadır (122).

Effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi antibiyotik direnç mekanizmaları biyofilm içindeki bakterilerin direncinde rol oynamazlar. Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara direncinden sorumlu olan 3 ana mekanizma yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (123).

Antimikrobiyal ajanların biyofilme penetre olamaması bu mekanizmalardan ilkidir. Biyofilmlerin ayırıcı karakterlerinden biri olan ekzopolisakkarit matriks üretimi antimikrobiallerin biyofilmi oluşturan bakterilere diffüzyonunu engeller. Antimikrobiallerin ekzopolisakkarit matriks ile reaksiyonu veya biyofilm matriks komponentleri tarafından adsorpsiyonu biyofilm içine antimikrobiyal ajanın

taşınımını sınırlandırabilir (124). *P.aeruginosa* biyofilminin piperasilinin difüzyonunu engellediği, *S.epidermidis* biyofilminin ise rifampisin ve vankomisin difüzyonuna izin verdiği ve bu antibiyotiklerin etkin şekilde biyofilme penetre olabildiği gösterilmiştir. Biyofilm kalınlığı ve antibiyotiklere direnç arasında lineer bir korelasyon vardır. Bu da ekzopolisakkarid matriksin antimikrobiyal ajanların difüzyonuna karşı tam bir engel oluşturmadığını ve farklı mekanizmaların da biyofilmdeki bakterilerin antimikrobiyal direncine katkı sağladığını göstermektedir (125).

Biyofilmde yer alan mikroorganizmaların yavaş büyüme fazına girmeleri, biyofilmlerin antimikrobiyal direncinde etkili olan diğer bir mekanizmadır. Bakteriler tarafından ihtiyaç duyulan besin maddelerinin ortamda bulunmaması durumunda bakterilerin üremeleri yavaşlar ve aktif üreme fazının yavaşladığı veya üremenin olmadığı forma geçerler (67).

Antibiyotiklerin bakterisidal etkilerini göstermeleri için gereksinim duydukları aktif üreme periyodunun sonlanması ve bunun sonucunda bakterilerin sayısının azalması ile ortaya çıkan süreç, antibiyotiklerin biyofilme sınırlı etki göstermesine neden olmaktadır. Örneğin penisilin ve sefalosporinlerin bakterileri öldürme oranı üreme oranı ile orantılı olup, aktif üremeyen bakteriler üzerine bu antimikrobiyallerin etkisi yoktur. Benzer şekilde aminoglikozidler ve fluorokinolonlar dâhil farklı sınıfa ait antimikrobiyaller bölünmeyen hücreleri öldürebilmekle birlikte hızlı bölünen hücrelere çok daha etkilidirler (126).

Biyofilmdeki değişmiş kimyasal ortam ve persiste hücrelerin varlığı biyofilmlerin antimikrobiyal direncinde üçüncü mekanizmayı oluşturur. Üremeyi

sınırlandıran kimyasal yapılar biyofilm yapısındaki antimikrobiyal potansi değiştirebilmektedir. Örneğin oksijen konsantrasyonu tek başına biyofilmdeki aminoglikozidlerin etkinliğini sınırlandırabilir. Biyofilmdeki pH değişimleri de benzer şekilde antibiyotik etkinliği üzerine olumsuz etki göstermektedir. Biyofilmlerdeki bakteriler sadece antimikrobiyallere değil aynı zamanda klorin ve glutaraldehid gibi kimyasal dezenfektanlara da direnç göstermektedir (126).

Persiste mikroorganizma popülasyonu oldukça korunmuş spor benzeri bir yapı özelliği göstermekte olup, biyofilmdeki varlığı geniş antibiyotik direncinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun süreli antibiyotik tedavisi sonrasında biyofilmdeki bakteri popülasyonunun büyük bir kısmının ölmesine rağmen küçük bir bakteri popülasyonu etkilenmeden kalması persiste mikroorganizmaların varlığı ile açıklanabilir. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücreler ile açıklanmaktadır (126).

Bakteriyel popülasyonun canlılığını devam ettirmesinden sorumlu olduğu düşünülen persiste hücrelerin ve persiste hücrelerdeki fizyolojik değişikliklerin biyofilmlerin canlılıklarını sürdürmesinde anahtar rol oynadığına inanılmaktadır. Genel olarak, biyofilmden uzaklaştırılan bakteriler aynı türün primer planktonik hücreleri kadar duyarlıdır (127).

3.2.11. Biyofilm Oluşumunu Engelleme Stratejileri

Biyofilmler, inert veya canlı bir yüzeye yapışmış olan, basitçe yıkamakla dağıtılamayacak şekilde geri dönüşümsüz (irreversible) olan ve mikroorganizmaların kendileri tarafından ürettikleri polimerik polisakkarit matris içinde oluşturdukları karmaşık bir düzendir (128). Bu oluşumda besin ve oksijen

ihtiyacı azalmakta, atıklar su kanallarıyla atılmakta ve antibiyotiklere direnç sağlanmaktadır (128).

Polisakkarit matriks biyofilm oluşturan bakterilerin, antimikrobiyal ajanların içeriye invazyonuna engel olarak direnç göstermesinde en önemli faktördür. Bu engelleme olayının matriksin sadece kendisiyle reaksiyona giren antimikrobiyal ajanların geçişiyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır (124). Tıbbi cihazlarda, biyofilm oluşumunu engelleyecek mevcut çok fazla seçenek bulunmamaktadır. Biyofilm ile mücadelede özellikle endüstri sahasında, mekanik temizlik ve oksidatif biyocidler kullanılmaktadır. Mekanik temizlik biyofilmi ortamdaki temizlemeye, oksidatif biyocidler ise biyofilm matriksi eritip içindeki sesil mikroorganizmaları öldürmeye yöneliktir (66).

Tıbbi cihazların kontaminasyonunun engellenmesi, mikroorganizmaların bu cihazlara yapışmasının önlenmesi, biyofilm matriksinden penetre olabilecek antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi tıbbi cihazlardaki biyofilmle mücadele konusunda uygulanabilecek bazı stratejiler arasında sayılabilir. Topikal antimikrobiyal ajanların kullanılması, kateter uzunluğunun azaltılması ve lümen içinin antimikrobiyal ajanlarla kaplanması SVK'ler üzerinde biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılan bazı yöntemler arasında sayılabilir (129).

Biyofilmler mikroorganizmalar ve bunlar tarafından salgılanan ekstrasellüler polimerik bir matriksden oluştuğundan, tedavide bu matriksin eritilerek elemine edilmesinin veya maksimum penetrasyon sağlayabilecek moleküllerin etkili olabileceği düşünülmektedir (130)].

Genç biyofilmler veya biyofilm oluşumunun erken safhasında yapılan antimikrobiyal uygulamaların daha etkin olduğu bilinmektedir. Yani bu aşamada

biyofilmler antimikrobiyal ajanlara daha duyarlıdır. Bu nedene erken biyofilm oluşumunu saptayacak non-invaziv yöntemlerin geliştirilmesi, biyofilmle ilişkili hastalıklarla mücadelede tedavinin etkinliğini arttıracaktır. (130).

3.2.12. Biyofilm Tanı Yöntemleri

Biyofilm infeksiyonlarının görülme oranında meydana gelen artış biyofilm oluşumunun kontrolüne ve engellenmesine yönelik yapılan çalışmaların hız kazanmasına neden olmuştur. Biyofilm oluşumunun engellenebilmesi için öncelikli olarak direnç mekanizmalarının anlaşılması ve biyofilm infeksiyonlarına yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi gerekmektedir. Bunun yapılabilmesi için biyofilm oluşumunu belirleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu yöntemlerin doğru uygulanması gerekmektedir. Teknolojinin gelişimiyle birlikte, deneysel biofilm çalışmalarında kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Günümüzde biyofilm oluşumunun belirlenmesinde deney hayvanlarında biyofilm oluşturulmasına dayalı çok sayıda in-vivo yöntemden ve farklı pek çok in-vitro yöntemden faydalanılmaktadır. Günümüzde in-vivo, in-vitro biyofilm oluşumunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarında, ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da floresan mikroskop kullanılarak direkt sayım, canlı hücre sayım yöntemleri, metabolik aktif boya maddeleri, radyokimyasallar sıklıkla kullanılmaktadır. Metabolik aktif boya maddeleri kullanılarak yapılan biyofilm varlığının tesbiti ile ilgili çalışmalar çoğunlukla kongo kırmızılı agar yöntemi (KKA), standart tüp (ST) yöntemi ve mikropleyt (MP) yöntemiyle yapılmaktadır. Standart tüp (ST) yöntemi ve mikroplate (MP) yöntemi, farklı iki boyar madde olan kristal viyole boyası ve safranin boyası kullanılarak yapılmaktadır (131; 132; 133).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden soyutlanan 150 Gram Negatif Non-fermantatif bakteri suşunda biyofilm oluşumu ve antibiyotik duyarlılık testleri yönünden incelenmeye alınmışlardır.

4.1. GEREÇ

4.1.1. Besiyerleri

- a. Kanlı Agar Besiyeri (Oxoid/İngiltere).
- b. Eosin Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri (Oxoid/İngiltere).
- c. Çikolatamsı Agar Besiyeri (Oxoid/İngiltere).
- d. Tree Sugar Iron (TSİ) (Üç şekerli demirli agar) Besiyeri.
- e. Simmons Citrate Besiyeri (Oxoid/İngiltere).
- f. Crytensen Üre Besiyeri (Oxoid/İngiltere).
- g. İndol Besiyeri.
- h. Cation Adjusted Mueller Hinton Broth Agar (CAMHB, Oxoid, İngiltere).
- i. Mueller-Hinton agar (Oxoid/İngiltere).

4.1.2. Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Malzemeler

4.1.2.1. Kongo Red Agar (KKA) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin

Saptanmasında:

- a. BHI broth
- b. Kongo kırmızısı
- c. Agar
- d. Sükroz
- e. Distile Su

4.1.2.2. Standart Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanmasında:

- a. Safranin
- b. Kristal Violet

4.1.2.3. Mikroplate (MP) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Saptanmasında

- a. Safranin
- b. Kristal Violet
- c. 96 kuyucuklu Steril Mikrotitre Plak

4.1.3. Antibiyotik Diskleri

P.aeruginosa, *A.baumannii*, *B.cepacia* ve *S.maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılığı için seftazidim (30µg), piperasilin (100µg), amikasin (30µg), imipenem (10µg), diskleri kullanıldı. Bu antibiyotik diskleri Oxoid firmasından temin edilmiştir.

4.1.4. Diğer malzemeler

1. Distile su

2. Petri kutuları

Kanlı, EMB, çikolatamsı agar besiyerinin dökülmesi ve antibiyogram duyarlılık testlerinin yapımında için 150mm çapındaki plaklar kullanılmıştır.

3. Tüpler

İlaç dilüsyonu ve bakteri dilüsyonu hazırlamak amacıyla 160×16mm boyutlarında cam tüpler kullanılmıştır.

4. Otomatik pipetler

100 ve 1000µl' lik pipetler ve pipet uçları kullanılmıştır.

5. Lam ve Lamel

Besiyerlerinden alınan kolonilerin Gram boyamasında kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ına gönderilen değişik örnekler (Kan, balgam/trakeal aspirat, idrar, yara, abse, akıntı örnekleri) incelenmeye alınmıştır.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan, periton sıvısı vb. steril vücut sıvıları örnekleri aerop, anaerop veya pediatrik BacT/Alert kan kültür şişelerine alınarak otomatize kan kültür cihazında inkübe edilmiştir. Cihazda üreme gözlenen şişelerden kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine pasajları yapılmıştır. Balgam, idrar, yara ve diğer örnekler direkt kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 35°C' de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde üreme gözlenen kolonilerden Gram boyama yapılarak Gram negatif basil olduğu belirlenen bakteriler için daha ileri identifikasyon aşamalarına geçilmiştir. İncelenmeye alınacak koloniler TSİ besiyeri, Simmons Citrate besiyeri, Crytensen Üre besiyeri ve indol besiyerlerine pasajları yapılmıştır.

Tree Sugar Iron besiyerinde yalnız dipte asit (sarı) yatıkta kırmızı (alkali) görünümü olanlar yalnız glukoz fermantasyonu, dipte ve yatıkta asit (sarı) görünümü olanlar glukoz + laktoz veya glukoz + sükroz ya da glukoz +laktoz + sükroz fermantasyonu yapmış kabul edilmiştir.

Simmons Citrate besiyerinde incelenecek bakteri kolonisinden besiyerinin yüzeyine az miktarda ekim yapılmıştır. 35°C' de 24-48 saat bekletilmiştir. Sitrata kullanarak üreyen bakteriler Prusya mavisi renk oluştururlar.

Crystensen üre besiyerinde incelenecek bakteri kolonisinden besiyerine ekim yapılmıştır. 35°C’ de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Üreyi hidroliz eden bakteriler besiyerinin rengini kırmızıya dönüştürmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

İncelenecek bakteri kolonisinden indol besiyerine ekim yapılmış ve 18-24 saat, 35°C’de inkübe edilmiştir. Kovacs ayırıcı tüp kenarından akıtılarak besiyerinin üzerinde tabakalandırılmıştır. Birkaç saniye içerisinde besiyeri ile ayıraç arasında parlak kırmızı bir halkanın oluşması olumlu sonuç olarak kabul edilmiştir.

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanamayan suşlar Biomerieux (Fransa) identifikasyon kitleri ile tanımlanmıştır.

4.2.1. Biyofilm Oluşumunun Saptanması:

Nonfermantatif Gram-negatif Bakteri suşların fenotipik olarak biyofilm oluşumunun belirlenmesi, kongo kırmızılı agar metodu (KKA), standart tüp (ST) yöntemi ve mikropleyt (MP) yöntemiyle ile sağlanmıştır.

4.2.1.1. Kongo Kırmızılı Agar (KKA) Yöntemi

Bir litre besiyeri için; 50 gr sukroz içerisine 37 gr beyin kalp infuzyon agar eklenmiş ve 950 ml distile suda çözdürülmüştür. Daha sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 0.8 gr kongo kırmızısı, 50 ml distile suda çözülerek hazırlanmış ve 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 55 °C' ye kadar soğutulmuş olan besiyeri içerisine steril edilmiş olan 50 ml kongo kırmızısı eklenerek kongo kırmızılı besiyeri hazırlanmıştır.

Hazırlanan besiyeri 9 mm çapında steril petrilere dağıtılmıştır. Non-fermantatif Gram negatif bakteri suşları tek koloni yöntemi ile plaklara ekilmiş ve ekimler ve 37°C' de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra parlak siyah kolonilerin varlığı biyofilm (+) olarak, pembe renkli koloni varlığı ise biyofilm (-) olarak değerlendirilmiştir (134).

4.2.1.2. Standart Tüp (ST) Yöntemi İle Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

Christensen yöntemi olarak da bilinen modifiye tüp aderans yönteminde Brain Heart Infusion Broth içerisinde nonfermantatif Gram negatif bakterilerin inokulasyonu yapılmış ve 37 °C de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüp içerikleri boşaltılmış ve fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanmıştır. İki set halinde yapılan çalışmada her tüpe 3 ml olacak şekilde eşit hacimde safranin veya kristal viyole konularak yavaşça karışması sağlanmıştır.

Bir süre beklenildikten sonra tüp içerisindeki boya döküldü ve boşaltılan tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.

Tüplerin iç çeperinde renkli tabaka varlığı biyofilm pozitif olarak kabul edilmiş ve rengin koyuluğu ve kalınlığına göre suşların biyofilm oluşturma kapasitesi çok güçlü, güçlü ve zayıf olarak derecelendirilerek değerlendirme yapılmıştır. Renk değişiminin oluşmaması ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir. Ayrıca besiyerinin havayla temas ettiği kısımda boya kalıntısı olabildiği gibi bu durum da negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (135).

4.2.1.3. Mikropleyt (MP) Yöntemiyle Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Kantitatif olarak biyofilm oluşumlarının belirlenmesinde, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.maltophilia* ve *B.cepacia* suşları stok kültürden alınarak aktifleştirilmek üzere, %0.25 glukoz içeren beyin kalp infüzyon buyyonu içinde bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda taze olarak hazırlanmış ve önceden ısıtılmış % 0.25 glukozlu beyin-kalp infüzyon buyyonu ile 1:20 oranında sulandırılmıştır.

Sonrasında steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplak’ın her bir kuyucuğuna 200 µl konularak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol sadece sıvı besiyeri ile doldurulmuştur. İnkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltılmış ve kuyucuklar fosfat tamponlu su (PBS) ile 3 kez yıkanmıştır. İki grup halinde yapılan çalışmada ters çevrilerek kurutulmuş olan mikroplaklardan ilk gruba 200’er µl % 0,1’lik kristal viyole konulmuş iken, ikinci gruba ise yine % 0,1’lik hazırlanan safranin solüsyonundan 200’er µl konulmuştur. Her iki mikroplate 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boyama süresi sonrasında her iki grup yeniden 3 kez PBS ile yıkanmış ve kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.

Sonrasında kristal viyole ile boyanan ilk grup plakların her kuyucuğuna 200 µl (80:20) etanol-aseton karışımı aktarılmış ve. mikroplateler spektrofotometre cihazında 590 nm'de okutulmuştur. % 0,1'lik safranin ile boyanan ikinci grup mikroplate'in kuyucuklarına % 50'lik Asetik Asit solüsyonundan 200'er µl. eklenmiş ve spektrofotometre cihazında 470 nm. dalga boyunda okutulmuştur. Optik yoğunlukları (OD) bulunmuş ve sonuçlar, kontrol için kullanılan mikroplate kuyucuklarının spektrofotometre cihazında okutulması ile elde edilen değerlere göre 1 pozitif, (+), 2 pozitif (++), 3 pozitif (+++) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin in vitro koşullarda değişmeye oldukça müsait olmasından dolayı hataları minimize etmek ve bilgilerin güvenilirliğinin sağlamak için her bir test de iki kez yapılmıştır (132)..

4.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Uygun besiyerine ekim yapıp yeterli inkübasyon süreleri sonunda izole edilen ve tür düzeyinde tanımlanan bakterilerin rutin antibiyotik duyarlılıklarına bakılmıştır. Duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müler-Hinton agar kullanılmıştır.

4.2.2.1. Disk Difüzyon Testinin Yapılışı

Kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden steril eküvyon yardımı ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 Mc Farland bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine yaygın ekim yapılmıştır. Plakların kurumamasından sonra üzerlerine antibiyotik emdirilmiş diskler yerleştirilmiş ve 35°C' de 18-24 saat inkübasyonu takiben antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları

ölçülmüştür. CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçlar duyarlı ve dirençli olarak yorumlanmıştır.



5. BULGULAR

Bu çalışma Kasım 2017-Mart 2018 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 150 adet Nonfermantatif Gram negatif bakteri suşunda biyofilm oluşumu ve antibiyotiklere karşı antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Çalışmaya alınan mikroorganizmalar idrar, yara, balgam, kan, periton sıvısı gibi klinik örneklerden izole edilmiştir. Bakterilerin soyutlandığı klinik örneklerin dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların soyutlandığı klinik örneklerin dağılımı, sayıları ve %'leri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya alınan bakterilerin soyutlandığı klinik örneklerin dağılımı.

| KLİNİK ÖRNEK | n | % |
|-------------------------------|------------|------------|
| Yara | 81 | 54 |
| İdrar | 29 | 19,33 |
| Steril Vücut Sıvıları | 12 | 8 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 16 | 10,67 |
| Kan | 12 | 8 |
| TOPLAM | 150 | 100 |

Çalışmamızda, non-fermentatif Gram negatif basillerin soyutlandığı örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı Tablo 4’ te verilmiştir.

Tablo 4. Non-fermentatif Gram negatif basillerin soyutlandığı örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı.

| KLİNİK ADI | MİKROORGANİZMA ADI | | | | TOPLAM |
|--|---------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> n | <i>A. baumannii</i> n | <i>B. cepacia</i> n | <i>S. maltophilia</i> n | |
| Plastik Cerrahi Kliniği | 12 | 41 | - | 3 | 55 |
| Üroloji Kliniği | 4 | - | - | - | 4 |
| Genel Cerrahi Kliniği | 3 | - | - | - | 3 |
| Gastroenteroloji Kliniği | 4 | 2 | - | - | 6 |
| Çocuk (Yeni Doğan) Yoğun Bakım Ünitesi | - | 12 | - | 1 | 14 |
| Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği | 2 | 5 | - | - | 7 |
| Kardiyoloji Kliniği | - | 7 | - | - | 7 |
| Jinekoloji Kliniği | - | 1 | - | - | 1 |
| Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği | - | 1 | - | - | 1 |
| Nöroloji Kliniği | 1 | 1 | - | - | 2 |
| Nöroşirurji Kliniği | 2 | 6 | - | - | 8 |
| Onkoloji Kliniği | - | 1 | - | - | 1 |
| Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi | - | 7 | - | - | 7 |
| Dâhili Yoğun Bakım Ünitesi | 2 | - | - | - | 2 |
| İç Hastalıkları Kliniği | 3 | - | - | - | 3 |
| Nefroloji Kliniği | 6 | - | - | - | 6 |
| Obstetrik Kliniği | 1 | - | - | - | 1 |
| Yanık Tedavi Merkezi | 1 | 7 | - | - | 8 |
| Çocuk (Büyük) Kliniği | - | 2 | - | - | 2 |
| Çocuk (Süt) Kliniği | - | 3 | - | - | 3 |
| Göğüs Hastalıkları. Kliniği | 1 | 5 | - | - | 6 |
| Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği | - | 1 | - | - | 1 |
| Romatoloji Kliniği | - | 2 | - | - | 2 |
| TOPLAM | 42 | 104 | - | 4 | 150 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların türleri, sayıları ve oranları Tablo 5’ de gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların türleri, sayıları ve oranları.

| MİKROORGANİZMA ADI | n | % |
|-------------------------------------|------------|------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 42 | 28 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 104 | 69,33 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 4 | 2,67 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0 | 0 |
| TOPLAM | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kullanılan yöntemlere göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif sayıları ve oranları Tablo 6’ da gösterilmiştir.

Tablo 6. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların biyofilm varlığının tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

| TEST YÖNTEMİ | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | |
|---|-------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | n | % | n | % |
| Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi | 71 | 47,33 | 79 | 52,67 |
| Mikropleyt (Kristal Viole) Yöntemi | 61 | 40,66 | 89 | 59,34 |
| Mikropleyt (Safranin) Yöntemi | 83 | 55,33 | 67 | 44,67 |
| Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemi | 57 | 38 | 93 | 62 |
| Standart Tüp (Safranin) Yöntemi | 65 | 43,33 | 85 | 56,67 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kullanılan yöntemlere göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif sayılarının türlere göre dağılımı Tablo 7’ de gösterilmiştir.

Tablo 7. Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların biyofilm varlığının tespitinde kullanılan yöntemlerin bakteri türlerine göre karşılaştırılması.

| TEST YÖNTEMİ | <i>P.aeruginosa</i> | | <i>A.baumannii</i> | | <i>S. maltophilia</i> | | <i>B.cepacia</i> | |
|---|---------------------|----|--------------------|----|-----------------------|----|------------------|----|
| | BP | BN | BP | BN | BP | BN | BP | BN |
| Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi | 25 | 17 | 44 | 60 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Mikropleyt (Kristal Viole) Yöntemi | 20 | 22 | 39 | 65 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Mikropleyt (Safranin) Yöntemi | 28 | 14 | 54 | 50 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemi | 18 | 24 | 38 | 66 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| Standart Tüp (Safranin) Yöntemi | 17 | 25 | 48 | 58 | 0 | 0 | 0 | 4 |

BP: Biyofilm Pozitif, **BN:** Biyofilm Negatif.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kullanılan test yöntemlerine göre biyofilm pozitifliklerinin karşılaştırılması Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Mikroorganizmaların kullanılan test yöntemlerine göre biyofilm pozitifliklerinin karşılaştırılması.

| TEST YÖNTEMİ | Pozitif (+++) | Pozitif (++) | Pozitif (+) | Negatif (-) |
|---|---------------|--------------|-------------|-------------|
| Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi | 13 | 12 | 46 | 79 |
| Mikropleyt (Kristal Viole) Yöntemi | 16 | 14 | 30 | 90 |
| Mikropleyt (Safranin) Yöntemi | 19 | 10 | 54 | 67 |
| Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemi | 8 | 12 | 37 | 93 |
| Standart Tüp (Safranin) Yöntemi | 11 | 15 | 39 | 85 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viole boyası ve safranin boyası kullanılarak yapılan MP yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif sayıları Tablo 9’ da gösterilmiştir.

Tablo 9. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının Mikropleyt yöntemiyle biyofilm test sonuçları.

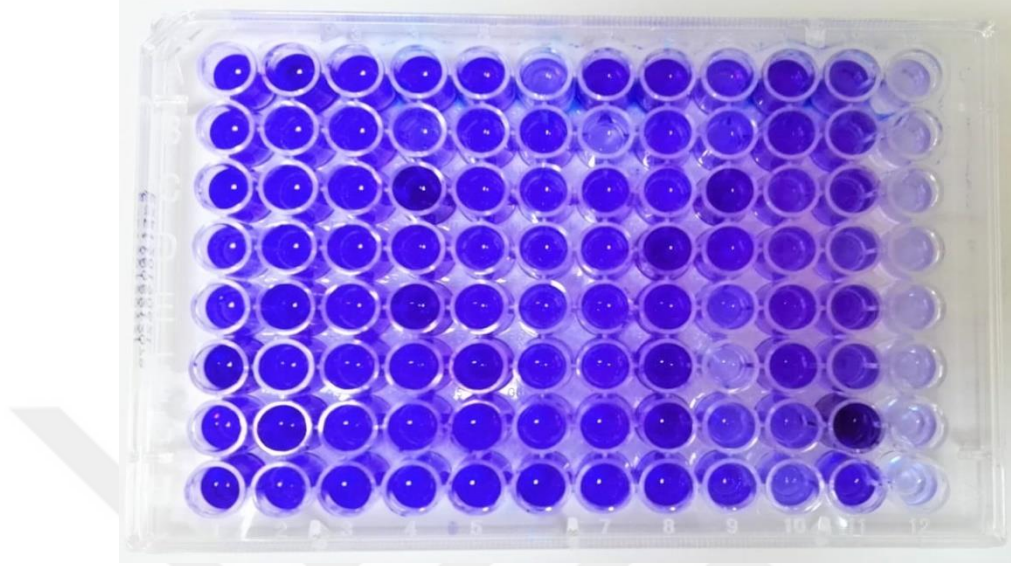
| MİKROPLEYT YÖNTEMİ | BİYOFİLM | | | |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Kristal Viole | | Safranin | |
| | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 20 | 22 | 28 | 14 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 39 | 65 | 54 | 50 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 2 | 2 | 1 | 3 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOPLAM | 61 | 89 | 83 | 67 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viole boyası kullanılarak yapılan MP yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif laboratuvar örneklerine göre soyutlanan mikroorganizmaların dağılımı Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10. Mikropleyt (Kristal Viole) yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı.

| ÖRNEĞİN TÜRÜ | MİKROPLEYT (KRİSTAL VİOLE) YÖNTEMİ | | | | TOPLAM Biyofilm Pozitif | |
|-------------------------------|--|------------|------------------|------------|----------------------------|------------|
| | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Yara | 38 | 46,91 | 43 | 53,09 | 81 | 100 |
| İdrar | 14 | 48,27 | 15 | 41,73 | 29 | 100 |
| Steril Vücut Sıvıları | 0 | 0 | 12 | 100 | 12 | 100 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 5 | 31,25 | 11 | 68,75 | 16 | 100 |
| Kan | 4 | 33,3 | 8 | 66,7 | 12 | 100 |
| Toplam | 61 | 100 | 89 | 100 | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viole boyası kullanılarak yapılan MP yöntemine göre biyofilm oluşumları Şekil 5’de gösterilmiştir.



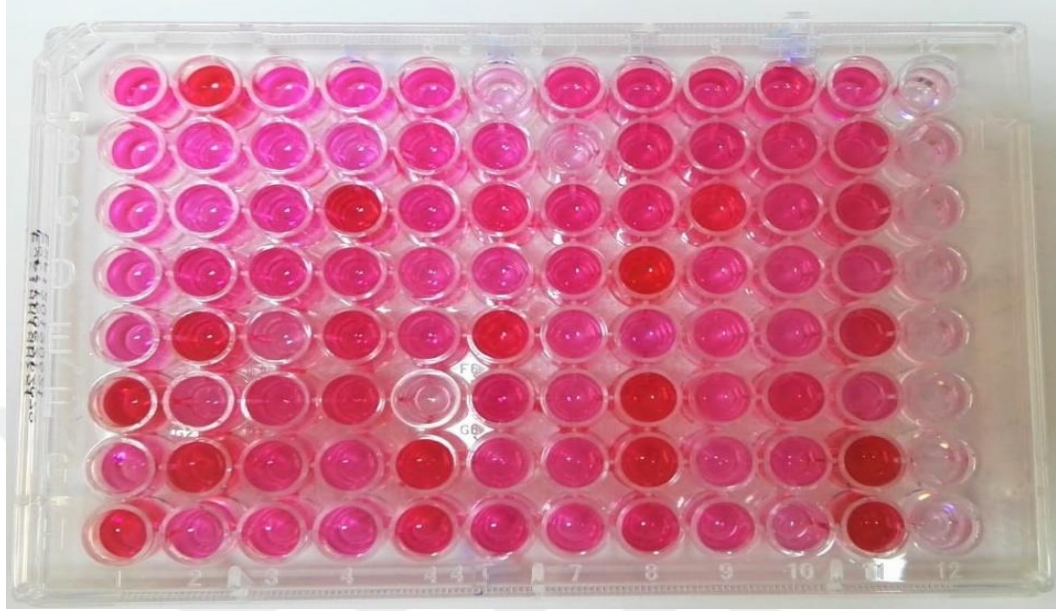
Şekil 5. Mikropleyt (Kristal Viole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların safranin boyası kullanılarak yapılan MP yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif laboratuvar örneklerine göre soyutlanan mikroorganizmaların dağılımı Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Mikropleyt (Safranin) yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı.

| ÖRNEĞİN TÜRÜ | MİKROPLEYT (SAFRANİN) YÖNTEMİ | | | | TOPLAM Biyofilm Pozitif | |
|------------------------|-------------------------------|-------|------------------|-------|-------------------------|-----|
| | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Yara | 51 | 62,96 | 30 | 37,04 | 81 | 100 |
| İdrar | 19 | 65,51 | 10 | 34,49 | 29 | 100 |
| Steril Vücut Sıvıları | 0 | 0 | 12 | 100 | 12 | 100 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 7 | 43,75 | 9 | 56,25 | 16 | 100 |
| Kan | 6 | 50 | 6 | 50 | 12 | 100 |
| TOPLAM | 83 | 100 | 67 | 100 | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların safranin boyası kullanılarak yapılan MP yöntemine göre biyofilm oluşumları Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Mikropleyt (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viole boyası ve safranin boyası kullanılarak yapılan ST yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif sayıları Tablo 12’ de gösterilmiştir.

Tablo 12. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının ST yöntemiyle biyofilm test sonuçları.

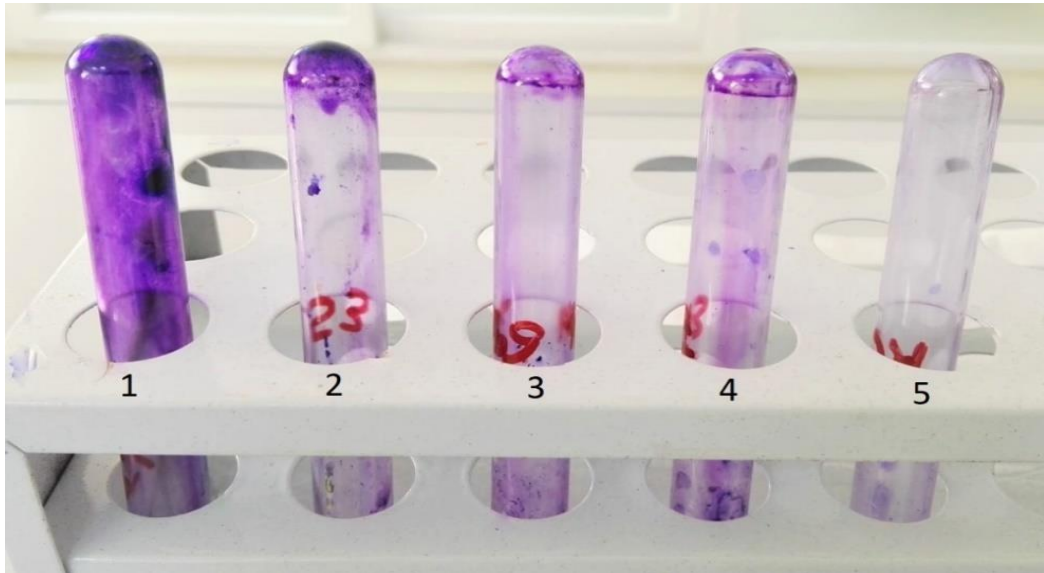
| Standart Tüp Yöntemi | Biyofilm | | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Kristal Viole | | Safranin | |
| | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 | 24 | 17 | 25 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 38 | 66 | 48 | 56 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 1 | 3 | 0 | 4 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOPLAM | 57 | 93 | 65 | 85 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viole boyası kullanılarak yapılan ST yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif mikroorganizmaların soyutlandığı laboratuvar örneklerine göre dağılımı Tablo 13' te gösterilmiştir.

Tablo 13. Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı.

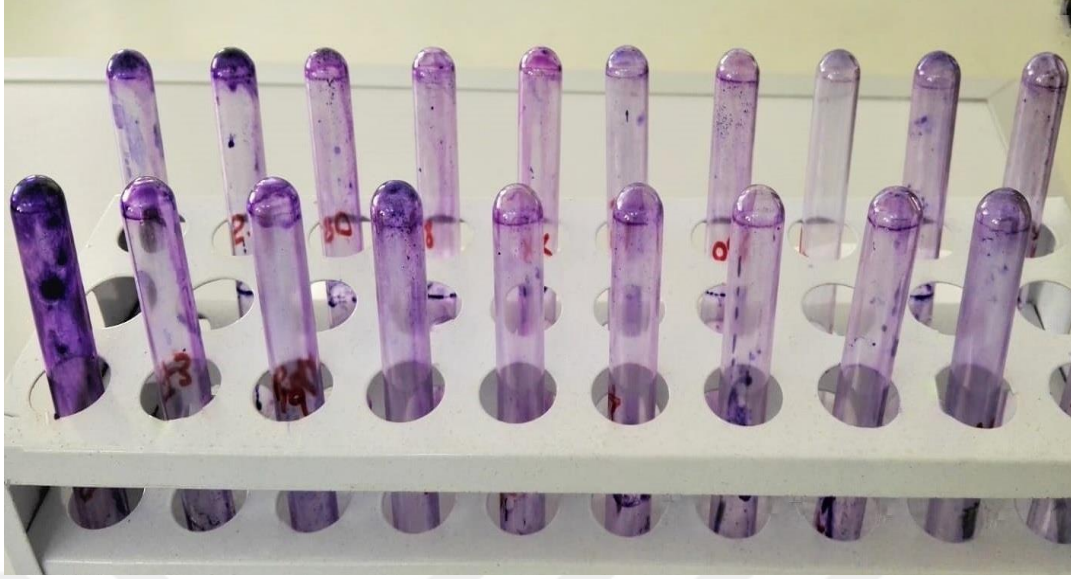
| Örneğin Türü | Standart Tüp (Kristal Viole) Yöntemi | | | | TOPLAM | |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------|------------------|------------|------------|------------|
| | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Yara | 41 | 50,61 | 40 | 49,39 | 81 | 100 |
| İdrar | 11 | 37,93 | 18 | 62,07 | 29 | 100 |
| Steril Vücut Sıvıları | 0 | 0 | 12 | 100 | 12 | 100 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 3 | 18,75 | 13 | 82,25 | 16 | 100 |
| Kan | 2 | 16,66 | 10 | 83,34 | 12 | 100 |
| TOPLAM | 57 | 100 | 93 | 100 | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların kristal viyole boyası kullanılarak yapılan ST yöntemine göre biyofilm oluşumları Şekil 7 ve 8'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Standat Tüp (Kristal Viyole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu.

1: Biyofilm (+++) pozitif örnek. **2:** Biyofilm (++) pozitif örnek. **3, 4:** Biyofilm (+) pozitif örnekler. **5:** Biyofilm negatif örnek.



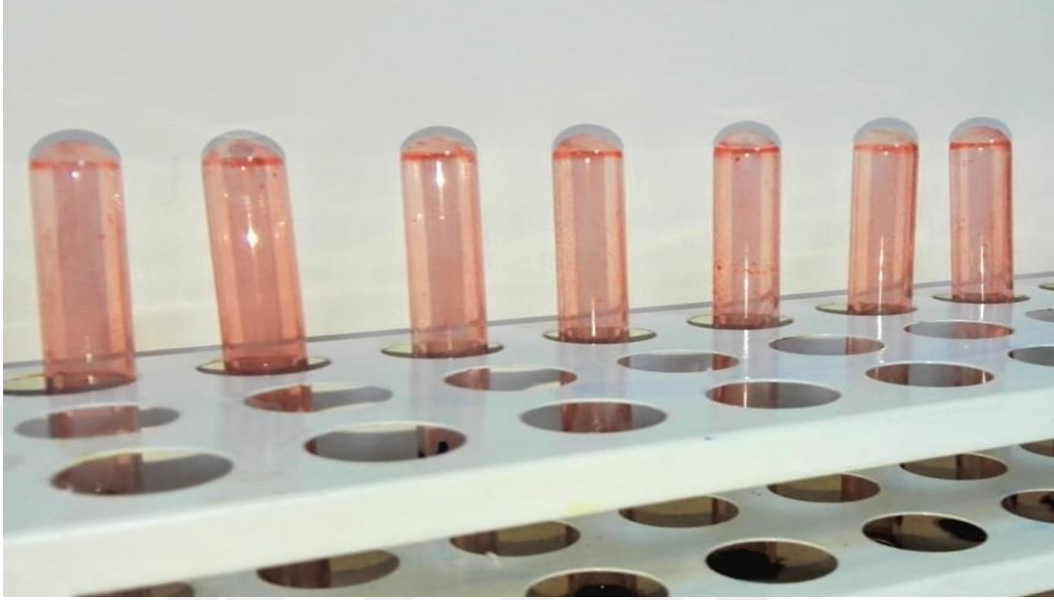
Şekil 8. Standart Tüp (Kristal Viyole) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumunda pozitif örnekler.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların safranin boyası kullanılarak yapılan ST yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif mikroorganizmaların soyutlandığı laboratuvar örneklerine göre dağılımı Tablo 14’ de gösterilmiştir.

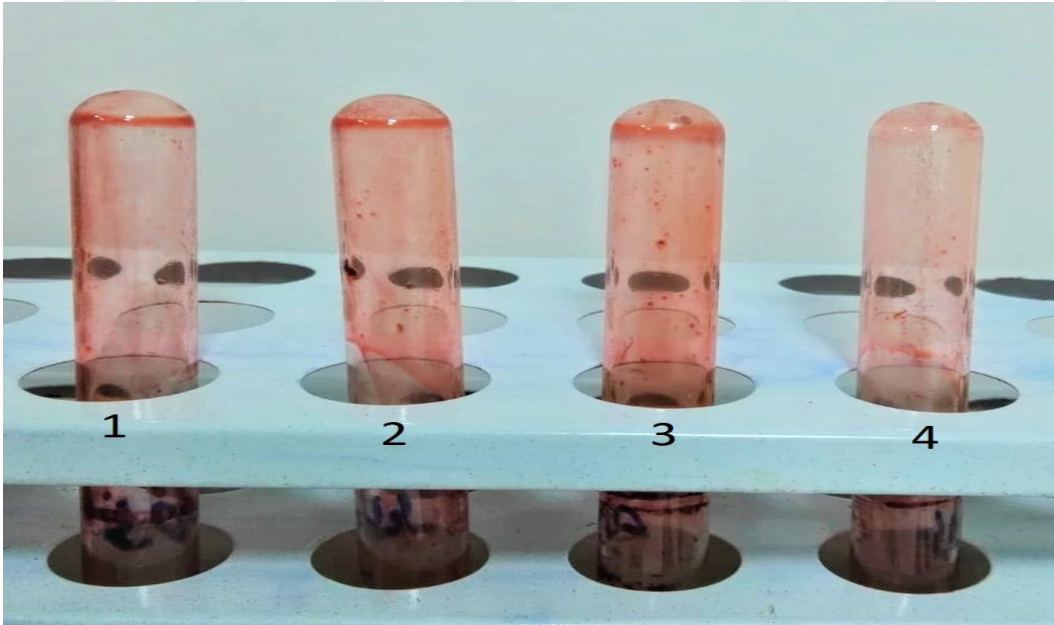
Tablo 14. Standart Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı.

| Örneğin Türü | Standart Tüp (Safranin) Yöntemi | | | | TOPLAM | |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------|------------|------------|------------|
| | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Yara | 54 | 66,67 | 27 | 33,33 | 81 | 100 |
| İdrar | 8 | 27,58 | 21 | 72,42 | 29 | 100 |
| Steril Vücut Sıvıları | 0 | 0 | 12 | 100 | 12 | 100 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 2 | 12,5 | 14 | 87,5 | 16 | 100 |
| Kan | 1 | 8,33 | 11 | 91,67 | 12 | 100 |
| TOPLAM | 65 | 100 | 85 | 100 | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların safranin boyası kullanılarak yapılan ST yöntemine göre biyofilm oluşumları Şekil 9 ve 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Standart Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumunda pozitif örnekler.



Şekil 10. Standat Tüp (Safranin) Yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların biyofilm oluşumu.

1, 2, 3: Biyofilm pozitif örnekler. **4:** Biyofilm negatif örnek.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif örnek sayıları Tablo 16' da gösterilmiştir.

Tablo 15. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının Kongo Kırmızılı Agar yöntemiyle biyofilm test sonuçları.

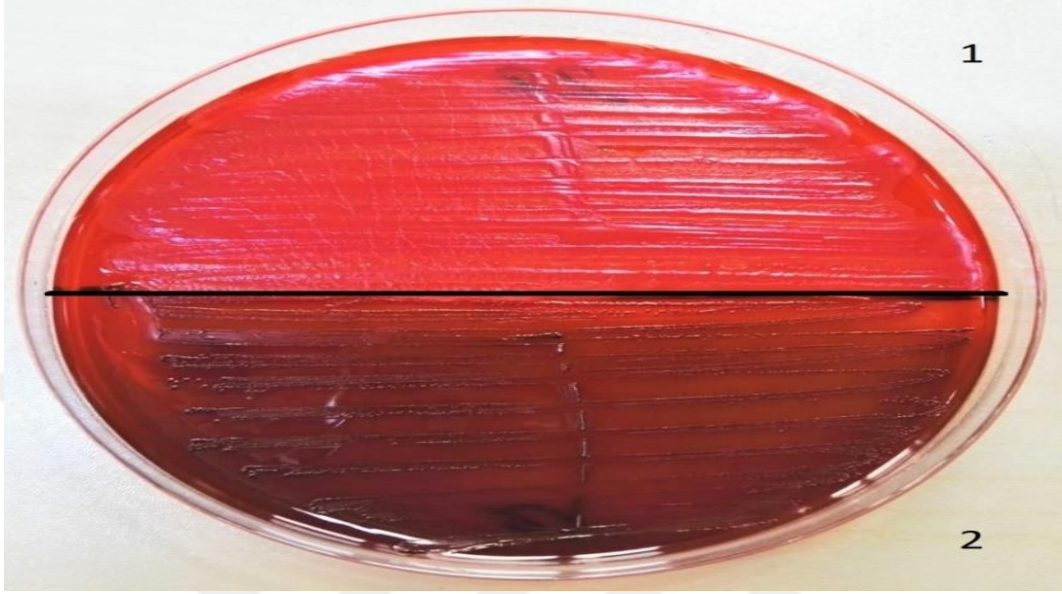
| YÖNTEM | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | Toplam | |
|-----------------------------------|------------------|------|------------------|------|--------|-----|
| | n | % | n | % | n | % |
| Kongo Kırmızılı Agar (KKA) | 71 | 47,3 | 79 | 52,7 | 150 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların KKA yöntemine göre biyofilm pozitif olanlarının türlere göre sayıları Tablo 17' de gösterilmiştir.

Tablo 16. Klinik örneklerden izole edilen Non-fermentatif Gram negatif bakteri suşlarının KKA yöntemiyle biyofilm test sonuçları.

| KONGO KIRMIZILI AGAR (KKA) YÖNTEMİ | BİYOFİLM | | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Kristal Viole | | Safranin | |
| | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif | Biyofilm Pozitif | Biyofilm Negatif |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 25 | 35,2 | 17 | 21,51 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 44 | 61,9 | 60 | 75,94 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 2 | 2,9 | 2 | 2,55 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOPLAM | 71 | 100 | 79 | 100 |

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların Kongo Kırmızılı Agar yöntemine göre biyofilm oluşumu Şekil 11 ve 12’ de gösterilmiştir.



Şekil 11. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemine göre biyofilm pozitifliği ve biyofilm negatifliği. **1:** Biyofilm pozitif. **2:** Biyofilm negatif.



Şekil 12. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemine göre Biyofilm oluşumu.

Çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmaların Kongo Kırmızılı Agar yöntemine göre biyofilm pozitif ve biyofilm negatif olanlarının soyutlandığı laboratuvar örneklerine göre dağılımı Tablo 17’ de gösterilmiştir.

Tablo 17. Kongo Kırmızılı Agar Test yöntemine göre soyutlanan mikroorganizmaların laboratuvar örneklerine göre dağılımı.

| ÖRNEĞİN TÜRÜ | KONGO KIRMIZILI AGAR (KKA) YÖNTEMİ | | | | TOPLAM | |
|------------------------|---------------------------------------|------------|------------------|------------|------------|------------|
| | Biyofilm Pozitif | | Biyofilm Negatif | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Yara | 47 | 58 | 34 | 42 | 81 | 100 |
| İdrar | 16 | 55 | 13 | 45 | 29 | 100 |
| Steril Vücut Sıvıları | 0 | 0 | 12 | 100 | 12 | 100 |
| Solunum Yolu Örnekleri | 4 | 25 | 12 | 75 | 16 | 100 |
| Kan | 4 | 33,3 | 8 | 66,7 | 12 | 100 |
| TOPLAM | 71 | 100 | 79 | 100 | 150 | 100 |

Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 18’ de gösterilmiştir.

Tablo 18. Biyofilm pozitif olan suşların disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| ANTİBİYOTİK ADI | BİYOFİLM POZİTİF | | | |
|-----------------------------------|------------------|-------|----------|-------|
| | DUYARLI | | DİRENÇLİ | |
| | n | % | n | % |
| Kolistin (CT) | 36 | 43,37 | 47 | 56,63 |
| Sefoperazon-sulbaktam (SCF) | 37 | 44,57 | 46 | 55,43 |
| İmipenem (İPM) | 15 | 18,07 | 68 | 81,93 |
| Ciprofloksasin (CİP) | 17 | 20,48 | 66 | 79,52 |
| Piperasilin-Tazobactam (TZP) | 20 | 24,09 | 63 | 75,91 |
| Amoksisilin- klavunat (AMC) | 8 | 9,63 | 75 | 90,37 |
| Trimetoprim-sülfometoksazol (SXT) | 10 | 12,04 | 73 | 87,96 |
| Amikasin (AK) | 17 | 20,48 | 66 | 79,52 |
| Seftazidim (CAZ) | 22 | 26,50 | 61 | 73,50 |

Çalışmada kullanılan *A.baumannii* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. Biyofilm pozitif olan *A.baumannii* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| ANTİBİYOTİK ADI | BİYOFİLM POZİTİF | | | |
|--|------------------|-------|----------|-------|
| | DUYARLI | | DİRENÇLİ | |
| | n | % | n | % |
| Kolistin (CT) | 19 | 35,18 | 35 | 64,82 |
| Sefoperazon-sulbaktam (SCF) | 19 | 35,18 | 35 | 64,82 |
| İmipenem (İPM) | 8 | 14,81 | 46 | 85,19 |
| Ciprofloksasin (CİP) | 11 | 20,37 | 43 | 79,63 |
| Piperasilin-Tazobactam (TZP) | 12 | 22,22 | 42 | 77,78 |
| Amoksisilin- klavunat (AMC) | 6 | 11,11 | 48 | 88,89 |
| Trimetoprim-sülfometoksazol (SXT) | 7 | 12,96 | 47 | 87,04 |
| Amikasin (AK) | 9 | 16,66 | 45 | 83,34 |
| Seftazidim (CAZ) | 12 | 22,22 | 42 | 77,78 |

Çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Biyofilm pozitif olan *P.aeruginosa* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| ANTİBİYOTİK ADI | BİYOFİLM POZİTİF | | | |
|--|------------------|-------|----------|-------|
| | DUYARLI | | DİRENÇLİ | |
| | n | % | n | % |
| Kolistin (CT) | 16 | 57,14 | 12 | 42,85 |
| Sefoperazon-sulbaktam (SCF) | 15 | 53,57 | 13 | 46,43 |
| İmipenem (İPM) | 7 | 25 | 21 | 75 |
| Ciprofloksasin (CİP) | 6 | 21,42 | 22 | 78,58 |
| Piperasilin-Tazobactam (TZP) | 9 | 32,14 | 19 | 67,86 |
| Amoksisilin- klavunat (AMC) | 2 | 7,14 | 26 | 92,86 |
| Trimetoprim-sülfometoksazol (SXT) | 4 | 14,28 | 24 | 85,72 |
| Amikasin (AK) | 8 | 28,57 | 20 | 71,43 |
| Seftazidim (CAZ) | 11 | 39,28 | 17 | 60,72 |

Çalışmada kullanılan *B.cepacia* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21. Biyofilm pozitif olan *B.cepacia* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

| ANTİBİYOTİK ADI | BİYOFİLM POZİTİF | | | |
|-------------------------------------|------------------|----|----------|-----|
| | DUYARLI | | DİRENÇLİ | |
| | n | % | n | % |
| Kolistin (CT) | 2 | 50 | 2 | 50 |
| Sefoperazon-sulbaktam (SCF) | 3 | 75 | 1 | 25 |
| İmipenem (İPM) | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Ciprofloksasin (CİP) | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Piperasilin-Tazobactam (TZP) | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Amoksisilin- klavunat (AMC) | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Trimetoprim-sülfometoksazol | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Amikasin (AK) | 0 | 0 | 4 | 100 |
| Seftazidim (CAZ) | 0 | 0 | 4 | 100 |

6. TARTIŞMA

Günümüzde tıp dünyasında meydana gelen gelişmeler, bizlerin yaşam süresi ve kalitesini artırırken diğer taraftan uygulanan girişimsel işlemler, yoğun antimikrobiyal kullanımı ve antimikrobialların bilinçsiz ve aynı zamanda gereksiz kullanımları, dirençli bakterilerin oluşmasına ve hastane infeksiyonlarının artmasına neden olmaktadır. Non-fermentatif Gram negatif bakteriler başta hastane infeksiyonları olmak üzere toplum kökenli infeksiyonların önde gelen etkenleri arasında yer almaktadır. Bununla birlikte bakteriler biyofilm oluşturarak hem immun sistemden hem de antimikrobiyal ajanlardan korunurlar. Bakteri hücre duvarlarındaki dış membran yapısı nedeniyle Gram pozitif bakterilere nazaran antibiyotiklere daha dirençli olan non fermentatif Gram negatif bakteri türlerinin biyofilm oluşturmaları, genetik maddenin aktarılması ve antimikrobialların seçici baskısı nedeniyle non fermentatif Gram negatif bakterilerin çoklu direnç özelliği kazandığı bilinmektedir (136)

Biyofilmler, değişen mikro çevre koşullarına göre bakterilerin üremelerini durdurmaları ile oluşmaktadır. Bakterilerin yüzeye tutunmaları, yüzeyde çoğalma ve buldukları üreme fazı biyofilm oluşumunda önemlidir. Mikroorganizmaların mevcut genetik yapısı ile biyofilm oluşumunu düzenleyebileceği gibi, ortamda yer alan diğer patojen mikroorganizmalardan aktarılan genler nedeniyle de biyofilm oluşturma yeteneği kazanabilirler. Üremenin yavaşlamasına neden olan farklı fizyolojik mikro çevrelerde, bakterilerin bu şekilde antibiyotiklerden korunması sağlanabilmektedir. Mikroçevredeki antibiyotik varlığı, bakterilerin biyofilm

oluşturarak antibiyotik etkisinden korunmasına neden olmaktadır (137; 138; 139; 140; 141).

İnsan sağlığı üzerinde önemli etkilere sahip olan biyofilmlerin sadece Amerika Bileşik Devletleri'ndeki infeksiyonların % 80'inden fazlasına neden olduğu tahmin edilmektedir (142). Bakterilerin yaklaşık %99'unun biyofilm oluşturarak yaşamını devam ettirdiği ve sadece %1'inin serbest veya planktonik olarak bulunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda özellikle Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinin yaptığı yayınlarda, tüm insan bakteriyel enfeksiyöz işlevlerinin biyofilmleri içerdiği tahmin edilmektedir (143).

Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakteriler ya da mayalardan oluşan biyofilmler, kullanılan araca ve hastada kalma süresine bağlı olarak tek bir tür ya da farklı türlerin bir araya gelmesinden oluşabilir. Erken dönemde genellikle asemptomatik olan biyofilm infeksiyonları, konakçı direncinin düşmesiyle biyofilmden kopup ayrılan planktonik mikroorganizmaların neden olduğu akut infeksiyona yol açabilir. Sürekli bir infeksiyon odağı olan tıbbi cihazlar üzerinde gelişen biyofilmler, infeksiyonun hematojen yolla yayılımı açısından da her zaman için bir risk kaynağı sayılmaktadır (144).

Biyofilm gelişiminin moleküler mekanizması günümüzde, genetik ve moleküler tekniklerin mikroskobik teknikler ile kombinasyonu sonucu daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Mikroorganizmaların bir yüzeye bağlanması ve akabinde biyofilm oluşturması, biyofilm antijenlerine karşı üretilen antikorların biyofilm içindeki bakterilere ulaşmasına engel olarak onları korumakta ve bunun yerine çevre dokulara zarar vermektedir (67). Antibiyotik tedavi uygulamaları biyofilmleri eradike etmede yetersiz kalmakta ve sadece planktonik hücreleri öldürerek

enfeksiyonların semptomlarını baskılamaktadır (145). Dolayısıyla bu durumda her antibiyotik tedavisinden sonra tekrarlayan semptomların ortaya çıktığı persiste enfeksiyonlar görülmektedir (67). Oldukça korunmuş spor benzeri bir yapı özelliği gösteren persiste hücre subpopulasyonu geniş antibiyotik direncinden sorumlu tutulmaktadır. Biyofilmdeki bakteri populasyonu üzerine uygulanan uzun süreli antibiyotik tedavisi sonrasında mikroorganizmaların büyük bir kısmı ölmesine rağmen küçük bir bakteri populasyonu etkilenmeden kalmaktadır. Çok ince biyofilmlerde bile bakterilerin antibiyotiklere düşük duyarlılık geliştirmeleri persiste hücreler ile açıklanmaktadır (126).

Non-fermantatif Gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumu ve biyofilm ortamında gelişen antibiyotik direncininin araştırıldığı çalışmamızda, Kasım 2017-Mart 2018 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen idrar, yara, balgam, kan, periton sıvısı gibi klinik örneklerden izole edilen 150 adet non fermentatif Gram negatif bakteri suşu değerlendirilmeye alınmıştır.

Bhargava ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada; irin, idrar, kan vb. 1945 klinik örnekten izole edilen NFGN bakteriler sırasıyla, irin eksudatları ve vücut sıvılarında %41.66, idrar örneklerinde %33.05, kan örneklerinde %15.83, trakeal aspirat örneklerinde %7.77 ve boğaz swap örneklerinde %1.66 oranlarında tespit edilmiştir. İzolatların 205'inde (%56.94) *P.aeruginosa* ve 75'inde (%20.83) *A.baumannii* etkenleri identefiye edilmiştir (146). Can F. ve ark. (2006) tarafından Türkiye'de farklı hastanelerden izole edilen 20 *A. baumannii* suşunun biyofilm oluşumu kantitatif yöntemle incelenmiş ve izolatların 16'sında biyofilm oluşumu gözlenmiştir (147). Sechi L. ve ark.(2004) tarafından yapılan çalışmada, kan

kültürlerinden izole edilen 17 suşun 9'unda biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (148). Wang ve ark.(2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise; 273 *A.baumannii* izolatında mikropleyt test yöntemi kullanılarak biyofilm oluşumu araştırılmış ve izolatların 71'i(%26.0) biyofilm pozitif olarak gözlenirken 202 (%74.0) izolatta biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir (149).

Sunulan çalışmada izole edilen 150 adet (%100) non-fermantatif Gram negatif bakteri türünün 81'i (%54) yara örneklerinden, 29'u (%19,33) idrar örneklerinden, 12'si (%8) steril vücut sıvısı örneklerinden, 16'sı (%10,67) solunum yolu örneklerinden ve 12'sinin (%8) kan örneklerinden olup, izole edilen 150 adet (%100) non-fermantatif Gram negatif bakteri türünün 42'si (%28) *P.aeruginosa*, 104'ü (%69,33) *A.baumannii*, 4'ü (%2,67) *B.cepacia* ve 0' ı (%0) *S.malthophilia* olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi non fermentatif Gram negatif bakterilerin izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda farklılık göstermektedir. Non-fermantatif Gram negatif bakterilerin yaralardan bulaşma riski diğer bulaşma yollarına göre daha fazladır. Non-fermantatif Gram negatif bakterilerin soyutlandığı örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımına bakıldığında, plastik cerrahi kliniğinde, diğer kliniklere kıyasla daha yüksek oranda non-fermantatif Gram negatif bakteri tespit edilmiştir. Bu tespit, yaralardan bulaşma riskinin yüksek olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Teknolojinin gelişimiyle birlikte, deneysel biofilm çalışmalarında kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Günümüzde in-vivo, in-vitro biofilm çalışmalarında, ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da floresan mikroskop kullanılarak direkt sayım, canlı hücre sayım yöntemleri, metabolik aktif boya maddeleri, radyokimyasallar sıklıkla kullanılmaktadır. metabolik aktif boya

maddeleri kullanılarak yapılan biyofilm varlığının tesbiti ile ilgili çalışmalar çoğunlukla kongo kırmızılı agar yöntemi (KKA), standart tüp (ST) yöntemi ve mikropleyt (MP) yöntemiyle yapılmaktadır. Standart tüp (ST) yöntemi ve mikropleyt (MP) yöntemi, farklı iki boyar madde olan kristal viyole boyar maddesi ve safranin boyar maddesi kullanılarak yapılmaktadır. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan çalışma 24. ve 48. saatler sonunda, 540 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutularak değerlendirilmekte iken, safranin boyar maddesi kullanılarak yapılan çalışma yine 24. ve 48. saatler sonunda fakat 470 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutularak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda kongo kırmızılı agar (KKA) yöntemi, standart tüp (ST) yöntemi ve mikropleyt (MP) yöntemi kullanılmış olup, standart tüp (ST) yöntemi ve mikroplate (MP) yönteminde kristal viyole ve safranin boyar maddeleri kullanılmıştır. Kristal viyole için 24 saat sonunda 540 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutularak değerlendirme yapılırken, safranin için ise 24 saat sonunda 470 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutularak değerlendirilme yapılmıştır.

Çelik B. (2010), doktora tezinde klinik örneklerden izole ettiği 104 *Pseudomonas* izolatında, kristal viyole ve safranin kullanarak spektrofotometrik yöntemle biyofilm varlığını araştırmış olup, kristal viyole boyası kullanarak yaptığı araştırmada 24 saat sonunda %48 oranında, 48 saat sonunda %40 oranında biyofilm varlığı tespit etmiştir. Safranin kullanarak yaptığı araştırmada 24 saat sonunda %62 oranında, 48 saat sonunda %48 oranında biyofilm varlığı tespit etmiştir (150). Ünal D. (2011), tarafından yapılan 10 *Pseudomonas* izolatında biyofilm varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada ise; kristal viyole boyar maddesi için 24 saatlik değerlendirmede %70 oranında, 48 saatlik değerlendirmede %60 oranında biyofilm

varlığı tespit edilmiştir. Safranin boyar madde ile yapılan çalışmada ise, 24 saatlik değerlendirmede %100 oranında, 48 saatlik değerlendirmede ise %80 oranında biyofilm varlığı tespit edilmiştir (151). Yıldırım U. (2006), yaptığı çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole ettiği 148 *P.aeruginosa*'da, kristal viyole boyası ve safranin boyası kullanarak biyofilm varlığını araştırmış ve kristal viyole boyası kullanılarak yaptığı çalışmada izolatların %45'inde, safranin kullanarak yaptığı çalışmada ise izolatların %58.4'ünde biyofilm varlığı tespit edilmiştir (152). Moskowitz ve ark. (2005), kistik fibrozisli hastalarda izole ettikleri 96 *Pseudomonas*'ın %73'ünde biyofilm varlığı tespit etmişlerdir (153). Çoban ve ark. (2009), kistik fibrozisli hastalardan izole ettikleri 60 *P.aeruginosa*'da biyofilm varlığını araştırmış ve 20 *P.aeruginosa*'da biyofilm varlığı tespit etmişlerdir (154). Yassein ve ark. (1995), klinik örneklerden izole ettikleri 50 *P.aeruginosa* suşunun 20'sinde biyofilm varlığı tespit etmişlerdir (155). Delissalde ve ark. (2004), 162 klinik örnekten izole ettikleri *P.aeruginosa* bakterilerinde biyofilm varlığını araştırmış ve 24 saatlik inkübasyon sonunda %18 oranında biyofilm varlığı tespit etmişlerdir (156). Rordriguez-Bano ve ark. (2008), yaptığı çalışmada 92 adet *A.baumannii* izolatının mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılmıştır ve çalışmada, 56 (%63) izolatın biyofilm oluşturduğu, 33 izolatın (%36) ise biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir (157).

Sunulan çalışmada ise; 150 non fermentatif Gram negatif bakteri izolatında mikropleyt yöntemiyle kristal viyole boyası kullanarak yaptığımız çalışmamızda 24 saat sonunda %40,66 oranında biyofilm varlığı tespit ettik. Safranin boyası kullanarak yaptığımız çalışmamızda ise 24 saat sonunda %55,33 oranında biyofilm varlığı tespit ettik. Çalışma sonuçlarımız konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalar ile

paralellik göstermekte olup, farklılık gösteren sonuçlar biyofilm oluşum sürecinin çok dinamik bir süreç olmasından, ısı, sıcaklık, pH, ortamdaki besin konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerin yanı sıra, temelde biyofilm oluşumu ana hatlarıyla benzer bir süreç olmasına rağmen, içerdiği türler ve suşlar arasında oluşum basamakları açısından önemli farklılıklar içeriyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yassien ve ark. (1995), vasküler katater kesitlerinden izole edilen 50 adet *P.aeruginosa'nın* ST yöntemi ile biyofilm oluşumunun araştırıldığı çalışmada; 20'sinin %40 oranında biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir (155). Sezgin M. F. (2012), tarafından izole edilen 152 *A.baumannii* izolatının ST yöntemi ile 83'ünde %54.6 oranında biyofilm negatif ve 69'unda %45.4 oranında biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. MP yönteminde ise absorbans ölçümlerine göre izolatların 75'inde %49.3 oranında biyofilm negatif, 77'sinde %51,7 biyofilm oluşumu pozitif belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmadaki yöntemler arasında uyum %89.5 olarak tespit edilmiştir (158). Rao ve ark. (2008) yılında yaptığı bir çalışmada, 55 tane *A. baumannii* izolatının kalitatif olarak ST yöntemi ile biyofilm üretme özelliği ve kantitatif olarak da MP yöntemi ile biyofilm düzeyleri ölçülmüş ve sonuç olarak, ST yöntemi ile 34 izolatın (%62), MP yöntemi ile ise 34 izolatın (%62) güçlü biyofilm, 14 izolatın ise zayıf biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir (159). Abdi-Ali ve ark. 2014 yılında yaptığı ve 75 adet *A. baumannii* izolatının MP ve ST ile biyofilm oluşumunun araştırıldığı çalışmada ST yöntemi ile %80 izolatta biyofilm oluşumu tespit edilirken, MP yöntemi ile %75 izolatta biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (160). Solmaz S. (2015) yaptığı çalışmada; balgam, yara ve kateter örneklerinden izole edilen 60 *A. baumannii* izolatının biyofilm oluşturma özellikleri

MP yöntemi ile 24 saatlik inkübasyon sonunda, kristal viyole kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçta çalışmaya dahil edilen 60 izolatın 10'unda (%16,6) zayıf biyofilm, 19'unda (%31,6) orta kuvvetli biyofilm, 31'inde (%51,6) kuvvetli biyofilm oluştuğu saptanmıştır (161).

Sunduğumuz çalışmada ise kristal viole boyası kullanılarak yapılan ST yönteminde 150 non-fermentatif Gram negatif bakteri izolatından 57'sinde (%38) biyofilm pozitif bulunurken 93'ünde (% 62) biyofilm oluşumu negatif bulunmuş, safranin boyası kullanılarak yapılan ST yönteminde ise 150 non-fermentatif Gram negatif bakteri izolatından 65'inde (%43,33) biyofilm pozitif bulunurken 85'inde (%56,67) biyofilm oluşumu negatif bulunmuştur. Aynı şekilde kristal viole boyası kullanılarak yapılan MP yönteminde 150 non-fermentatif Gram negatif bakteri izolatından 61'inde (% 40,66) biyofilm pozitif bulunurken 89'unda (%59,34) biyofilm oluşumu negatif bulunmuş, safranin boyası kullanılarak yapılan MP yönteminde ise 150 non-fermentatif Gram negatif bakteri izolatından 83'ünde (%55,33) biyofilm pozitif bulunurken 67'sinde (%44,67) biyofilm oluşumu negatif bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada MP yöntemi ile ST yöntemi ve bu iki yöntemde kullanılan iki farklı boyar madde ile yapılan çalışma sonucumuz, hem kendi arasında hemde yapılan benzer diğer çalışmalarla paralellik arz etmektedir.

Babapour ve ark. (2016) yaptığı çalışmada, 156 *A.baumannii* izolatının %10.26'sı KKA biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, ST, MP ve modifiye MP yöntemleri ile biyofilm pozitif oluşturan bakteri yüzdesi sırasıyla %48.72, %66.66 ve %73.72 olarak tespit edilmiştir (162). Çalışmamızda biyofilm oluşumu ayrıca KKA yöntemi ile de değerlendirilmiş olup, 150 non-fermentatif Gram negatif bakteri izolatından 71'i (%47,33) biyofilm pozitif, 79'u (%52,67) biyofilm negatif

olarak bulunmuştur. KKA yöntemi ile biyofilm negatif ve biyofilm pozitif oluşturan mikroorganizma türleri içerisinde en yüksek oran, %61,9 ile *A.baumannii*'de tespit edilmiştir. *S.maltophilia*'da ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Biyofilm oluşturan 71 adet (% 100) non-fermantatif Gram negatif bakteri türünün 25'i (%35,2) *P.aeruginosa*, 44'ü (%61,9) *A.baumannii*, 2'si (%2,9) *B.cepacia* ve 0'ı (%0) *S.malthophilia* olarak belirlenmiştir. Laboratuvar örneklerinden izole edilen 150 adet non-fermantatif Gram negatif bakteri suşunun KKA yöntemi ile biyofilm test sonuçlarına göre; en yüksek biyofilm oluşumu 81 yara örneğinin 47'sinde (%58) belirlenmiş olup, steril vücut sıvıları örneklerinde ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Literatürde bu konuyla ilgili yapılan çalışmaların sonuçları arasında bir uyum yoktur. Bu durum biyofilm oluşum sürecinin çok dinamik bir süreç olmasından, ısı, pH, ortamdaki besin konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenebilmesinden kaynaklandığı gibi, biyofilm oluşumunun temelde ana hatlarıyla benzer bir süreç olmasına rağmen, içerdiği türler ve suşlar arasında oluşum basamakları açısından önemli farklılıklar içeriyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde antimikrobiyal ilaçlara karşı oluşan ve gittikçe artan direnç sorunu bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşılmasına neden olmaktadır. Artık günümüzde en geniş spektrumlu betalaktam olan karbapenemlere karşı bile direnç gelişmektedir. ESBL ve İBL enzimlerine dayanıklı olmaları, bakteriyel membranlara hızla nüfuz edebilmeleri, etki spektrumlarının oldukça fazla olması nedeniyle çoklu direnç gösteren GN bakterilerin infeksiyonlarının tedavisinde ilk sırada kullanılan antibiyotikler karbapenemlerdir. Karbapenemlerin bu önemli özellikleri onların ampirik tedavide

yaygın olarak kullanılmasına ve nihayetinde de bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasına neden olmuştur. Artan direnç beraberinde bu bakterilerden kaynaklanan ve hayati tehlikelere neden olabilecek enfeksiyonlarının kontrol edilebilmesi zorluğuna ve tedavilerinde güçlüklerle karşılaşılmasına hatta bazen imkânsızlaşmasına neden olmaktadır. Her ülke ve merkeze göre değişiklik gösteren direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası enzimlerin yanında, her merkez için değişmeyen bir gerçek şu ki, direnç oranlarının gün geçtikçe artmakta olduğudur. Geçtiğimiz on yıl boyunca, non-fermentatif Gram-negatif bakteriler, hastalıkları veya tıbbi tedavileri nedeniyle immün sistemi baskılanmış olan hastaların artan popülasyonunda önemli fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmıştır. Bu bakteriler ortamda yaygın olarak bulunurlar ve çoklu, intrinsik veya edinilmiş ilaç direnci için bir eğilime sahiptir. Günümüzde neden oldukları enfeksiyonlar, tedavi ve enfeksiyon kontrolü açısından önemli sorunlar ortaya çıkarırken, yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı yaygın olarak görülen bakteriyel direncin ortaya çıkması, bu ajanların klinik yaşam süreleriyle ilgili endişeleri arttırmaktadır (12).

Pseudomonas ve *Acinetobacter* türü bakteriler için; dünyadaki imipenem direnç oranlarına bakıldığında giderek artan miktarlarda antibiyotik direnci olduğu görülmektedir *Pseudomonas* için % 6 ile % 70 arasında değişen oranlarda imipenem direnci görülürken bu oran *Acinetobacter*'lerde % 13 ile % 58 arasında değişmekte olup, birbirine yakın olarak seyretmektedir (12). Ülkemizde *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilerde imipenem direnci oranı bölgesel olarak farklılık göstermekte olup, *Pseudomonas*'larda yaklaşık %4 ile %85, *Acinetobacter*'lerde ise %8 ile %70 arasında değişmektedir (163; 164). Şahin E.

(2012) tarafından yapılan çalışmada ise imipenem direnci *P. aeruginosa* için %32,7'iken *A.baumannii*' için ise %70.8 olarak bulunmuştur (165).

Çalışmamızda imipenem direnci *P.aeruginosa* için %75, *B.cepacia* için %100 iken *A.baumannii* için ise bu oran %85,19 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki imipenem direnci yüzdeler oranlarına bakıldığında, *A. Baumannii* ve *P.aeruginosa* için bulunan değerlerin diğer çalışmalardaki yüzdeler oranlardan daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda biyofilm pozitif olan suşlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına bakıldığında; kolistin direnci (n=36) %43,37 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler arasındaki bu farklılıklar, çalışmaların farklı zamanlarda ve farklı yerlerde yapılması, numunelerin soyutlandığı kliniklerin farklı olması ve bakterilerin gün geçtikçe daha dirençli olması gibi nedenlerden dolayı olabileceğini düşündürmektedir. Direnç oranları yer ve kullanım süreleri durumuna bağlı olarak da değişebileceğinden gün geçtikçe direnç oranının artması doğal bir sonuçtur. Direnç düzeyleri coğrafik bölgelere göre değişmektedir. Örneğin 1997-2000 arasında *P. aeruginosa*' da gentamisin direnci Kuzey Amerika'da %15.8 iken Avrupa'da %28.3 ve Latin Amerika'da %38.2'dir (166).

Schaber ve ark. planktonik form ile biyofilm formun antibiyotiklere karşı duyarlıklarını araştırdıkları bir çalışmada; polikarbonat membran üzerinde klinikten izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşumunu sağlamış ve *P.aeruginosa* infeksiyonlarında sıklıkla kullanılan imipenem (karbopenem betalaktam), gentamisin (aminoglikozid) ve piperasilin-tazobaktam (betalaktamaz inhibitörü) antibiyotiklerini kullanmışlardır. Sonuçta biyofilm formunun planktonik forma göre yaklaşık 10 kat daha dirençli hale geldiğini göstermişlerdir

(137). Bhargava ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada izole edilen non-fermentatif Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık testi, CLSI kriterlerine göre Mueller Hinton Agar kullanılarak Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık profili, Amikacin, Piperacillin ve Co-trimoxazole'ye karşı belirli derecede dirençli iken; Imipenem, Cefipime-Sulbactam ve Ceftazidime-Sulbactam'a karşı daha yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (146) Şahin E. (2012), tarafından toplum kökenli non-fermantatif Gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumunun belirlenmesi ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılığının tespitine yönelik yapılan çalışmada; balgam, idrar ve yaralardan izole edilen 20'si *Pseudomonas aeruginosa*, 20'si *Acinetobacter baumannii* olan 40 non-fermentatif Gram negatif bakteri test edilmiştir. En etkili antibiyotik veya antibiyotiklerden biri olan kolistine iki bakteri grubunda da yedişer (% 35) suşta direnç saptanmış ve *P.aeruginosa* suşlarına gentamisin, seftazidim ve amikasin; *A.baumannii* suşlarına tigesiklin, gentamisin ve amikasin diğer antibiyotiklerden daha etkili olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşumu yalnız bir suşta saptandığı için antibiyotik direnci ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişkisi belirlenememiştir. Söz konusu çalışmada, non-fermentatif Gram negatif bakterilerde kolistin duyarlılığı yüksek bulunurken, biyofilm oranı beklenildiği kadar yüksek bulunmamıştır ve bu nedenle bu bakterilerin direnç mekanizmasıyla biyofilm oluşumu arasında bir bağlantı tespit edilememiştir. Bu sonuca çalışmadaki suş sayısının az olmasının etkisi olduğu ve daha fazla suşla sonuçların daha farklı çıkabileceği düşünülmüştür (165).

Çalışmamızda, biyofilm pozitif olan *A. baumannii* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına bakıldığında; *A.*

baumanii suşları en fazla %35,18 (n=19) ile Kolistin (CT) ve sefoperazon-sulbaktam (SCF)'a duyarlılık gösterirken, %88,89 (n=48) ile amoksisilin-klavunat (AMC)'a en fazla direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Rao ve ark. (2008) tarafından, *A.baumannii* izolatlarındaki biyofilm ve antibiyotik direnci arasındaki korelasyonu irdelemek için yapılan bir çalışmada, biyofilm pozitif olan *A.baumannii* izolatları, 13 antibiyotik ile test edilmiş olup; imipeneme karşı %100 direnç, cephotaxime %89, amikasin %80 ve ciprofloksasin %73 direnç göstermiştir. Cefoperazone ve norfloksacin, izolatların çoğuna karşı daha etkili bulunmuştur. Biyofilm oluşturan izolatların tamamı hemen hemen tüm antibiyotiklere direnç göstermiştir. Ayrıca, bu çalışma ile mikroplate yöntemi, biyofilm tespiti için daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur (167). Badave ve ark. (2015) tarafından *A.baumannii*'nin klinik izolatları arasında biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki korelasyonun incelendiği çalışmalarında; farklı klinik örneklerden izole edilen toplam 72 *A.baumannii* izolatının antimikrobiyal duyarlılık testi, 6 antibiyotik kullanılarak Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmış ve biyofilm oluşumu, MP ile incelenmiştir. 72 izolatın 45'i (%62.5) biyofilm pozitif olup, ampicillin-sulbactam direnci en az tespit edilmiştir. İzolatların %36.1'i imipeneme dirençli, %66.6'sı seftazidime, %72.2'si ciprofloksasine, %80.5'i amikasine ve %84,7'si piperasilline dirençli bulunmuştur. Biyofilm pozitif izolatların, ampicillin-sulbaktam, amikasin, siprofloksasin ve seftazidime, imipenem ve piperasilline göre daha fazla direnç gösterdiği tespit edilmiştir. 65 (%90.3) izolatın tamamı, çoklu ilaç direnci göstermiştir. Söz konusu çalışma ile *A. baumannii*'de biyofilm oluşumu ve çoklu ilaç direnci arasında pozitif bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır (168). Hussain ve ark. (2017), kateterize

ve kateterize olmayan hastalarda Gram negatif organizmaların biyofilm oluşumunu karşılaştırmak ve ayrıca antibiyotik duyarlılık modellerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada. kateterize hastalardan izole edilen 25 mikroorganizmanın 18'i (%72) biyofilm oluştururken, kateterize edilmemiş hastalardan izole edilen 25 mikroorganizmanın 4'ü (%16) biyofilm oluşturduğu bulunmuştur. Tüm biyofilm üreten mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık yüzdesinin, biyofilm oluşturmayan mikroorganizmalardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (169). Babapour ve ark. (2016) tarafından, *A.baumannii* klinik izolatlarında biyofilm oluşumunu tespit etmek; farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını göstermek; biyofilm ve çoklu ilaç direnci arasında olası bir bağlantıyı araştırmak üzere yapılan bir başka çalışmada da; Tahran'daki üç hastaneden alınan klinik örneklerden, 156 örnekte *A. baumannii* tespit edilmiş olup, antibiyotik duyarlılık testinde izolatların, polimiksin B dışında çoğu antibiyotiğe karşı oldukça dirençli olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların en az %92'si çoklu ilaca direnç göstermiştir (162). Bhargava ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada, patojen olarak izole edilmiş NFGN bakterilerin antibakteriyel duyarlılık testinde; *P. aeruginosa*'nın %82'si Imipenem'e , %79'u sefepime'ye, %69'u seftazidim-sulbaktam'a, %34'ü amikasine, %46'sı piperasillin ve %41'i ko-trimoksazole için duyarlı olarak tespit edilmiştir (146).

Çalışmamızda, biyofilm pozitif olan *Pseudomonas* suşlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre; *Pseudomonas* suşları en fazla %5,14 (n=16) ile kolistine ve %53,57 (n=15) ile sefoperazon-sulbaktama duyarlılık gösterirken, %92,86 (n=26) ile amoksisilin-klavunata en fazla direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak hastane infeksiyonlarına neden olan etkenlerin başında gelen non-fermentatif Gram negatif bakteriler, önemli bir virulans faktörü olan biyofilm oluşturarak hem konak savunmasından hem de antimikrobiyal ajanlardan korunurlar. Günümüzde yoğun antibiyotik kullanımı veya antibiyotiklerin gereksiz kullanımları dirençli bakterilerin oluşmasına neden olmaktadır. Özellikle sorunlu bölge infeksiyonlarında, biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin antimikrobiyellerle tedavisinde yaşanan güçlükler pek çok çalışmada gösterilmiştir. Son yıllarda antimikrobiyallerin bilinçsiz kullanımı infeksiyonların tedavi seçimlerinde yenilikler yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. İdeal tedavi stratejisinin biyofilm matriksindeki ekstrasellüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterebilecek ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek nitelikte antimikrobiyal ajanlar içermesi gerekmektedir.

Biyofilmler, her ne kadar belirli koşullar altında sağlığımızı tehdit ediyor olsa da, özellikle nitrojen ve fosforun uzaklaştırılmasında ve endüstriyel atıkların detoksifikasyonunda %100'e yakın başarılar elde ettikleri unutulmamalıdır. Bu biyofilmlerin hepsinin zararlı olmadığı ve tüm biyofilmlerle mücadelenin gerekli olup, olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Bu ve buna benzer birçok sorunun cevap bulması için biyofilm konusu hakkında birçok araştırma yapılması gerekmektedir. Biyofilm yapısının ve biyofilm oluşum mekanizmalarının daha iyi anlaşılması mikroorganizmaların olası potansiyel tedavi hedeflerini de ortaya çıkartacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Uzun Ö. Hastane infeksiyonları: Tanımlar. Doğanay M, Ünal S. Hastane İnfeksiyonları. 1. Baskı, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 35.
2. Jones, H.C., Roth, I.L, Saunders, W.M., "Electron microscopic study of a slime layer.", J Bacteriol; 99:316-25 (1969).
3. Zararsız H. Hastane infeksiyonu etkeni Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 1998.
4. Bilgehan A, Kayabaş Ü. Yoğun bakım birimlerinde infeksiyon sorunu. Klimik Dergisi, 2001;14 (2): 83-87.
5. Pfaller MA, Korten V, Jones RN, Doern Gary. Multicenter evaluation of the antimicrobial activity for seven broad-spectrum beta-lactams in Turkey using the E-test method. The Turkish Antimicrobial Resistance Study Group, Diagn Microbiol Infect Dis, 1999; 3.
6. Bergogne-Berezin E, Decre D, Joly-Guillou ML. Opportunistic nosocomial multiply resistant bacterial infections-their treatment and prevention. J Antimicrob Chemother 1993;32 (suppl.A):39-47.
7. Arnow PM, Flaherty JP. Nonfermentative gram negative bacilli In: Mayhall CG (ed). Hospital Epidemiology and Infection Control. Baltimore: Williams and Wilkins 1996:366-87.
8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews., 15:167-193, 2002.
9. Bilgehan H. Fermentasyon yapmayan gram olumsuz bakteriler " H. Bilgehan (ed): Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları " kitabı, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 2000: 422.
10. Petersen K, Cannegieter SC, van der Reijden TJ, van Strijen B, You DM, Babel BS, et al. Diversity and clinical impact of Acinetobacter baumannii colonization and infection at a military medical center. J Clin Microbiol 2011; 49: 159-66.
11. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Lippincott Williams and Wilkins. Sixth Edition, 2006: 309-375.
12. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents (2007;29:33-41).
13. Bahar H, Esen N. Acinetobacter ve Non-fermantatif basiller. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2006: 1618-1627.

14. Erdem B. Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Ustaçelebi Ş ed. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; 551-558.
15. Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2003;7 (3): 111-117.
16. Koneman E, Stephan DA, William MJ, Schreckenberger PC, Winn CW Jr. The nonfermentative Gram-negative bacilli. Konoman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia, Lippincott 2006: 303-391. .
17. Baron E., Finegold S., Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. Mosby Co, St Louis, 1986: :422-424.
18. Denton M., Wilcox M.H.: Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. J. Antimicrob. Chemother, 1997: 40:468-474.
19. Akova M. *Pseudomonas aeruginosa* infeksiyonları. Flora 1997;1: 61-65.
20. Sardelic S., Pallecchi L., Punda-Polic V., Rossolini G.M.: Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. Emer. Infect. Dis., 9: 1022, 2003.
21. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA ve ark. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. BMC Microbiol. 2007 Apr 18;7: 33.
22. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect. 2000 (14):1721-31.
23. Li F. K., Chan, K. W., Chan, T. M., Lai, K. N., "Burkholderia urinary tract infection after renal transplantation", Transpl. Infect. Dis., 5(1):59-61 (2000).
24. Quinn, JP., "Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens", Clin. Infect. Dis., 27(1): 117-124 (1998).
25. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, H., Hotta, I., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M., "Proposal of *Burkholderia* gen. nov; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (P.
26. Govan, J. R. W., Hughes, J. E., and Vandamme, P., "Burkholderia cepacia: medical, taxonomic and ecological issues", J. Med. Microbiol., 45:395-407 (1996).
27. LiPuma, J. J., "Burkholderia cepacia epidemiology and pathogenesis: implications for infection control", Curr. Opin. Pulm. Med., 4:337-441 (1998).
28. Govan JRW, Deretic V., "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*", Microbiol Rev., 60:539-574 (1996).

29. LiPuma JJ., “Burkholderia cepacia: management issues and new insights” , Clin. Chest. Med., 19:473-486 (1998).
30. Govan, J. R. W., Balandreau, J., and Vandamme, P., “Burkholderia cepacia friend and foe” , ASM News, 66:124-125 (2000).
31. LiPuma, J. J., Dasen, S. E., Nielson, D. W., Stern, R. C., and Stull, T. L., “Person-to-person transmission of Pseudomonas cepacia between patients with cystic fibrosis” , Lancet, 336:1094-1096 (1990).
32. Magalhaes, M., Doherty, C., Govan, J. R. W., Vandamme, P., “Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients” , J. Hosp. Infect., 54:120-123 (2003) .
33. Dulger D, Berktaş M. Stenotrophomonas maltophilia suşlarının klinik önemi. Van Tıp Derg. 2007; 14(3): 90-5.
34. Miles Denton ,Kevin G. Kerr.Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with Stenotrophomonas maltophilia. Clinical Microbiology Reviews. Jan. 1998, p. 57–80.
35. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi 2000,193-194.
36. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotrophomonas maltophilia. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 57-80.
37. Lange, Warren Levinson. Review of Medical Microbiology and Immunology 11. Edition 2010.
38. Topçu A.Willke, Söyletir Güner, Doğanay Mehmet; Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar, Nobel Tıp Kitabevi; 2008,2187-2194.
39. Kerr, J. R. 1996. Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by Stenotrophomonas maltophilia. J. Med. Microbiol. 45: 380–382.
40. Forbes A., Sahm D.F., Bailey A.S.W.& Scott’s Diagnostic Microbiology 11.Edition , Betty Mosby. 2002. .
41. Washington Winn,Jr. , Stephen Allen, William Janda, Elmer Koneman, Gary Procop. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6. Edition.2006 Lippincott Williams & Wilkins.332.
42. Looney W.J., Narita M., Mühlemann K. “Stenotrophomonas maltophilia: an emerging opportunist human pathogen”. Lancet Infect Dis 2009; 9: 312–23.
43. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, et al. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen Stenotrophomonas maltophilia. J Biological Chem 2002; 277: 11042–49.

44. de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz ACGS, Martinez MB, Giron JA. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg Infect Diseases* 2002; 8: 918–23.
45. Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* 2003; 5: 625–36.
46. Di Bonaventura G., Spedicato I., D'Antonio D., Robuffo I. and Piccolomini R. “Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*”, jan. 2004, .
47. Kerr, K. G., J. Anson, P. M. Hawkey. 1994. Adherence of clinical and environmental strains of *Xanthomonas maltophilia* to plastic material, abstr. B-339. In Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Socie.
48. Graff GR, Burns JL. Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis. *Chest* 2002; 121: 1754–60.
49. Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cystic Fibrosis* 2004; 3: 67–91.
50. Metan G, Hayran M, Hascelik G, Uzun O. Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 527–31.
51. Micozzi A, Venditti M, Monaco M, et al. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 705–11.
52. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 634-40.
53. Alonso A, Martinez JL. Cloning and Characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 3079-86.
54. Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH. (Eds.). *Manuel of Clinical Micro*.
55. Berezin BE, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148- 65.
56. Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol*. .
57. Munoz-Price L, Weinstein R. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med* 2008; 358: 1271-81.

58. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, ed(s). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2000; 5th ed. 2339-2344.
59. Ayan M, Durmaz R, Aktas E, Durmaz B. Bacteriological, clinical, and epidemiological characteristics of hospital acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a teaching hospital. *J Hosp Infect* 2003; 54: 39–45.
60. D'Agata EMC, Thayer V, Schaffner W. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: The importance of cross-transmission. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 588- 591.
61. Dy ME, Nord JA, LaBombardi VJ, Kislak JW. The emergence of resistant strains of *Acinetobacter baumannii*: clinical and infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 565- 67.
62. Rijnarts, H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.B., "Bacterial adhesion under static and dynamic conditions", *Appl Environ Microbiol*; 59:3255-3265 (1993).
63. Brock, T.D. (2003). *Great Events in Microbiology: Significant Events of the Last 125 Years*. [www.scientifichistory.com\(eri_im tarihi: 08.04.2003\)](http://www.scientifichistory.com(eri_im tarihi: 08.04.2003)).
64. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995, *Microbial biofilms*, *Annu Rev Microbiol*, 49:711-745.
65. Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC. Physiological ecology in biofilm systems, p. 341-394. In W. G. Characklis and K. C. Marshall (ed.), *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York, N.Y. 1990.
66. Donlan, R.M., "Biofilms: Microbial life on surfaces" , *Emerg Infect Dis*; 8:881- 890 (2002).
67. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." , *Science*; 284: 5427–5433 (1999).
68. Zhang LH. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci* 2003; 8: 238-244. .
69. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4): 999-1007.
70. Padera RF. 2006. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol* 15: 264– 270.
71. Sakarya, S., "Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü", *Klimik Dergisi*, 18 (1):3-8 (2005).
72. Sinde, E., Carballo, J., 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439-447.

73. Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol.* 11:30-36.
74. Dunsmore, D.G., Twomey, W.; Whittlestone, G.; Morgan, H.W. (1981). Design and performance of systems for cleaning products contact surfaces of food equipment. *J.Food Prot.* 44:220-240.
75. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD, "The role of biofilms in otolaryngologic infections", *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*; 12:185-190 (2004).
76. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *Plos Biol* 2007; 5:e307.
77. Hepdeniz Ö. K., Seçkin Ö. "Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm A Dynamics Microbial Life: Oral Biofilm" *Sdü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi / Cilt 8 Sayı 3 / 2017.*
78. Butler, S.L., Doherty, C. J. J., Hughes, E., Nelson, J. W., and Govan, J.R.W., " *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments resent a potential hazard" , *J. Clin. Microbiol.*, 33:1001-1004 (1995). .
79. Bevivino A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V. Carusi, M. Del Gallo, and P. Visca., "Phenotypic comparison between rhizosphere and clinic al isolates of *Burkholderia cepacia* " , *Microbiology*, 140:1069-1077 (1994). .
80. Gillis, M., Van Van, T., Bardin, R., Goor, M., Hebbbar, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., and Fernandez, M. P., "Polyhasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and oroposition of Burkhold.
81. Kiska, D. L., Kerr, A., Jones, M.C., Caracciolo, J.A., Eskridge, B., Jordan, M., Miller, S., Hughes, D., King, N., and Gilligan P., "Accuracy of four commercial system for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative, nonfermenting b.
82. Larsen, G. Y., Stull, T. L., and Burns, J.L., "Marked phenotyping variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patie nt with cystic fibrosis" , *J. Clin. Microbiol.*, 31:788-792 (1993). .
83. Left, L.G., Kernan, R. M., McArthur, J. V ., and Shimkets, L.J., "Identification of aquatic *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* by hybridization with species-specific rRNA gene probes" , *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1634-1636 (1995). .
84. Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
85. Poulsen LV. (1999). Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-326. Qian, Z., Sagers, R. D., & Piti, W. G. (1997). The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. *Annals of Biomedical En.*
86. Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K., Govan, J. R. W., "Ocurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of Burk.

87. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
88. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
89. 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.
90. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
91. Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T. B., De Vos, P., Henry, D., and Speert, D. P., "Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV)", *J. Clin. Microbiol.*
92. Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Ho ste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P., and Vandamme, P., "Burkholderia cepacia genomovar VI, a new member of the Burkholderia cepacia complex isolated from cystic fibrosis patients", *Int. J. .*
93. Koluman, A., 2006. Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi. <http://www.vetgida.ankara.edu.tr/bilimsel>, Erişim Tarihi: 16.05.2008.
94. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diases. *J Infection* 2003; 46:207-14.
95. Fuqua WC. Quorum-sensing in bacteria: LuxR-LuxI family of cell dencity responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176:269-75.
96. Lynch SA, Robertson TG. Bacterial and fungal biofilm infections. *Ann Rev Med* 2008; 59:415-28.
97. Redfield R. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *TRENDS Microbiol* 2002; 10:365-70.
98. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:56-60.
99. Whitehead N, Barnard A, Slater H, Simpson N. Quorumsensingin gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25:365-404.
100. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003; 5:1213-9.
101. McDowell P, Affas Z, Reynolds C. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1997; 24:895-904.

102. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O. N-acylhomoserine lactone mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 2001; 147:3249-62.
103. Doğan Y, Bayrakal V, Bahar H, Baskın H. Relation of quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* strains in presence of gentamicin. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37:134-7.
104. Arnold JW, Silvers S, 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79: 1215-1221.
105. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 585-617.
106. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001;413(6858): 860-4.
107. Jefferson KK., "What drives bacteria to produce a biofilm " , *FEMS Microbial Lett*; 236: 163-73 (2004).
108. Jefferson KK., Pier DP., Goldman DA., and Pier GB , "The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (Ica R) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*." , *J.Bacteriol* 186: 2449-56.
109. Kirov ,S.M. Castrisios A. Abd Shaw J.G. , "Aeromonas Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces", *American Society for microbiol.* 72:1939-45(2003).
110. Fux, C.A., Consterton, J.W., Steward, P.S., Stoodley, P., "Survival strategies of infectious biofilms", *Trends Microbiol*;13:34-40 (2005).
111. Öztürk B, Bakteri yüzey slime yapısındaki moleküllerin, bakteri aderansı ve antibiyotik direncine etkisi, *Uzmanlık Tezi*, Aydın 2006.
112. Douglas JL, Cobbs CG. Prosthetic valve endocarditis, p. 375-396. In D. Kaye (ed.), *Infective endocarditis*, 2nd ed. Raven Press Ltd., New York, N.Y, 1992.
113. Maki DG. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management, p. 155-212. In A. L. Bisno and F. A. Waldvogel (ed.), *Infections associated with indwelling medical devices*, 2nd ed. American Society.
114. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie W, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J. Infect. Dis.* 168:400-407, 1993.
115. Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 351:893-898, 1998.

116. Stickler DJ, King J, Nettleton J, Winters C. The structure of urinary catheter encrusting bacterial biofilms. *Cells Mater.* 3:315-319, 1993.
117. Stapleton F, Dart J. Pseudomonas keratitis associated with biofilm formation on a disposable soft contact lens. *Br. J. Ophthalmol.* 79:864-865, 1995.
118. Stewart, P.S., Costerton, J.W., "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms", *Lancet* ;358:135-8 (2001).
119. Durack DT, Beeson PB. "Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation" *Br J Exp Pathol.* 1972 Feb;53(1):44-9.
120. Enleberg, N.C., "Molecular methods: Applications for clinical infectious diseases" , *Ann. Amer. Med .*, 490-502 (1994). .
121. Van Belkum, A., "DNA fingerprinting of medically important microorganisma by use of PCR" , *Clin. Microb. Rev.*, 7:174-184 (1994). .
122. Bingen, E.H., Denamur, E. And Elion, J., "Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks" , *Clin. Microbiol. Rev.*, 7:311-327 (1994).
123. Mah, T.C., O'toole, G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol*, 9, 34-39.
124. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2517-2522, 1996.
125. Melchior, M.B., Fink-Gremmels, Gaastra, W., "Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture.", *J Vet Med B*, 53, 326-332 (2006).
126. Stewart, PS., "Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms", *Int J Med Microbiol*, 292, 107- 113 (2002).
127. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new techonology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37, 1771-1776.
128. Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 414-417, 2005.
129. Maki DG, Band JD. A comparative study of polyantibiotic and iodophor ointments in prevention of vascular catheter-related infection. *Am. J. Med.* 70:739-744, 1981.
130. Johansen C, Falholt P, Gram L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3724-3728, 1997. .

131. Öztürk İ, Yurtman AN, Eraç B, Gül-Yurtsever S, Ermertcan Ş, Hoşgör-Limoncu M. In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(8):483-6.
132. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and partial recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;1.
133. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:417247. <https://doi.org/10.1155/2012/417247>.
134. Freeman J, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J ClinPathol* 1989;42:872-4.
135. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1.
136. Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:133-161.
137. Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC ve ark. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(Pt 6):738- 48.
138. Sufya N, Allison DG, Gilbert P. Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol*. 2003;95(6):1261- 7.
139. Roberts ME. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*. 2005 Jan;151(Pt 1):75- 80.
140. Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jun;69(6):3327- 3.
141. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001 Dec;183(23):6746- 5.
142. Çiftçi, İ., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F., Altındış, M., “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35: 98 – 102 (2005).
143. Ramadan, H.H., “Kronik Rinosinüzit ve Bakteriye Biyofilmler”, *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 1(3): 13-59(2006).

144. Altun, H.U., Şener, B., “Biyofilm İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci”, Hacettepe Tıp Dergisi, 39: 82-88 (2008).
145. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine Vet Microbiol. 2007 Mar 31;121(1-2):1-17. Epub 2007 Jan 9.
146. Bhargava D., Kar S. and Saha M. Prevalence of Non-Fermentative Gram Negative Bacilli Infection in Tertiary Care Hospital in Birgunj, Nepal. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. ISSN: 2319-7706 Volume 4 Number 7 (2015) pp. 301-307).
147. Can F., Kurt-Azap Ö., Demirbilek M., Karabay G., Ergin F., Arslan H., “Kan Kültürlerinden İzole Edilen Acinetobacter Baumannı Suşlarında Biyofilm Oluşumu* Biofilm Formation By Acinetobacter Baumannı Strains Isolated In Hemocultures” Başkent Üniversitesi.
148. Sechi L, Karadenizli A, Deriu A, et al. PER-1 beta-lactamase production in Acinetobacter baumannii is related to cell adhesion. Med Sci Monit 2004; 10: 180-4.
149. Wang Y.C. et al. “Biofilm formation is not associated with worse outcome in Acinetobacter baumannii bacteraemic pneumonia”, <https://www.nature.com/srep/> (2018).
150. Çelik B. 2010; Doğadan Ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas Bakterilerinin Değişik Fenotipik Özelliklerinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması(Doktora Tezi-Ankara).
151. Ünal D. 2011; Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas, klebsiella, staphylococcus ve candida Cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması (Yüksek Lisans Tezi-Ankara).
152. Yıldırım, U., “Çeşitli Vücut Örneklerinden Soyutlanan Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Biyofilm Oluşturma ve Alginat Üretme Yeteneklerinin Araştırılması”, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D., D.
153. Moskowitz, S.M., Jessica, M.F., Emerson, J.M., Emerson, J.C., Gibson, R.L., Burns, J.L., “Use of Pseudomonas Biofilm Susceptibilities to Assign Simulated Antibiotic regimens For Cystic Fibrosis Airway Infection”, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 8.
154. Çoban, A.Y., Çiftçi, A., Onuk, E.E., Erturan, Z., Çaycı, T.Y., Durupınar, B., “Kistik Fibrozlu Hastalardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Bu Özelliğin Genotip ve Antibiyotik Duyarlılığı.
155. Yassein, M., Khardori, N., Ahmedy, A., Toama, M., “Modulation of Biofilms of Pseudomonas aeruginosa by Quinolones”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39 (10): 2262 – 2268 (1995).

156. Delissalde, F., Amabile-Cuevas, C.F.,” Comparison of Antibiotic Susceptibility and Plasmid Content, Between Biofilm Producing and Non-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24 (4): 405 – 408 (.
157. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:276-278. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x. .
158. Sezgin M. F. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonunda araştırılması (Uzmanlık Tezi 2012 Samsun).
159. Rao Rs, Prashanth K, Karthika Ru, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 2008;26(4):333. doi:10.4103/0255-0857.43566.
160. Abdi-Ali A, Hendiani S, Mohammadi P, Gharavi S. Assessment of biofilm formation and resistance to imipenem and ciprofloxacin among clinical 100 isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(1):1-5. doi:10.5812/jjm.8606. .
161. Solmaz S. “ *Acinetobacter* İle İlişkili Kateter Enfeksiyonlarında Antibiyotik Kilit Tedavi Modelinin Değerlendirilmesi Ve Biyofilm İlişkili Genlerin Araştırılması” Uzmanlık Tezi Ankara Mart 2015 .
162. Babapour E., Haddadi A., Mirnejad R., Angaji S-A., Amirmozafari N. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Ebrahim Babapour et al./Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(6): 528.
163. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E: Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen *Karbapeneme Dirençli Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında *Metallobetalaktamaz Üretimini Araştırılması*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004, 34:248-252.
164. Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç A E, Önde U, Acar N: *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. *Türk Mik Cem Kongre Kitapçığı* 2002:280.
165. Şahin E., Yürüken Z., Göçmen J.S. *Pam Tıp Derg* 2012;5(1):15-19 Toplumda kazanılmış çoklu ilaç dirençli nonfermentatif gram negatif bakterilerde duyarlılık sonuçları.
166. French GL: Antimicrobial resistance in hospital flora and nosocomial infections. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Edited by CG M. Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins; 2004: 1613-1638.
167. Rao R.S., Karthika R.U., Singh S.P., Shashikala P., Kanungo R., Jayachandran S., Prashanth K. Correlation Between Biofilm Production and Multiple Drug Resistance In Imipenem Resistant Clinical Isolates Of *Acinetobacter Baumannii*. *Indian Journal of Medical*.

168. Badave G.K., and Dhananjay K. Biofilm Producing Multidrug Resistant Acinetobacter Baumannii: An Emerging Challenge. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015 Jan, Vol-9(1): DC08-DC10). .

169. Hussain J.H., Sharma A., Jaggi T., Mishra B., Thakur A., Dogra V., Loomba P.S. Epidemiology of biofilm formation by Gram-negative bacilli in patients with urinary tract infection in a tertiary care hospital. International Journal of Health & Allied Scienc.



8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Sivas Divriği' de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2006 yılında mezun oldum. 2006-2008 yılları arasında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Yüksek lisans yaptım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.