

GİRİŞ

Toprak, su, bitki, hayvan ve insanlardan izole edilebilen *Pseudomonas aeruginosa*, nonfermentatif, oksidaz testi pozitif, hareketli gram negatif basildir. *P.aeruginosa* önemli bir fırsatçı patojendir. Konağın savunma mekanizması zayıfladığı zaman akciğer enfeksiyonları, yara ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Nosokomiyal patojenlerin başta gelenlerindedir. Hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Nosokomiyal pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, yara yeri enfeksiyonları ve bakteriyemilerin en sık sebeplerindedir. Çok düşük oranlarda sağlıklı kişilerin deri, burun mukozası, boğaz ve dışkılarında kolonizasyon gözlenebilir (1,2,3).

Patojenik ve nonpatojenik suşlar arasındaki temel farklılık, patojenik suşların virulans faktörleri üretebilme kapasiteleridir. *P.aeruginosa*'nın, adezinler, çeşitli pigmentler, eksoenzim S, eksotoksin A olmak üzere hücre dışı enzimleri, elastaz, proteaz gibi elastolitik aktivite gösteren enzimleri ve daha birçok iyi bilinen virulans faktörlerine son zamanlarda biofilm oluşturabilme yeteneği ve alginat üretim yeteneği gibi yenileri eklenmiştir (4,5).

Biofilm; mikroplar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ve gen transkripsiyonlarına bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve 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 adapte olabilme yeteneği kazanmalarının keşfiyle beraber tıbbi önemleri daha da artmıştır. Biofilmlerin halen günümüzde doğal kapak endokarditi, osteomyelit, kronik bakteriyel prostatit, orta kulak enfeksiyonları, tıbbi implant enfeksiyonları ve özellikle kistik fibrozis hastalarında gözlenen kronik akciğer enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Oluşan biofilmin, genetik olarak planktonik özdeşlerine göre 10-

1000 kat daha dirençli olması ve tedavi sonrası relaps oranının yüksek olması, biofilm oluşturan bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların önemini bir kat daha arttırmaktadır (2,3).

Biofilm yapısının büyük bir kısmı hidrate şekildedir. Biofilm bakterilerinin salgıladığı ekstraselüler substans madde (EPS) ise toplam organik karbonun %50-90'ını içermektedir. Alginat, EPS polisakkaritlerinin majör komponenti olup, β -1,4-glikozit bağları ile birbirine bağlanmış olan D-mannuronat ve L-glukuronat'ın kısmen O-asetillenmiş lineer kopolimeridir. Alginat üretimi ile birlikte bakterinin etrafında vizköz bir jel oluşur. Biofilm oluşturan suşlarda alginat aşırı üretiminin bakteriye sağladığı avantajlar konusunda kesin bilgiler olmamakla beraber ortak görüş; alginatın bakteri adezyonunu kolaylaştırdığı, enflamasyon alanında bakteriyi serbest radikallerden ve makrofajlardan koruduğu yönündedir.

Bu çalışmada, çeşitli vücut örneklerinden soyutlanan *P.aeruginosa* suşlarının, farklı sürelerde biofilm oluşturma ve alginat üretme yeteneklerinin, farklı yöntemler kullanılarak araştırılması, bu yeteneklerin antibakteriyel madde varlığındaki değişimlerinin ortaya konması, biofilm oluşturma ve alginat üretiminin antibakteriyel madde direncine katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Pseudomonodaceae ailesindeki *Pseudomonas* cinsinde, suda ve toprakta yaşayan, gram negatif, nonfermantatif, aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türler yer almaktadır. Bu türler arasında en sıklıkla izole edilen insan patojeni *P.aeruginosa*'dır (1).

P.aeruginosa toprak, su, bitkiler, hayvanlar ve insanlardan izole edilebilir. Besin maddelerine karşı olan gereksinimlerinin en alt düzeyde olması, damıtılmış su ve kimyasal dezenfektanlarda dahi varlığını sürdürebilmesi, ısı gibi değişik çevre koşullarına olan uyumu *P. aeruginosa*'nın çevresel başarısını ve başarılı bir fırsatçı patojen olmasını açıklamaktadır (1,2,3). *P.aeruginosa* nemli ortamları sever. Vücutta özellikle nemli olan perineum, aksilla ve kulak gibi ortamlarda bulunur. Hastane ortamında da solunum araçları, kataterler, temizlik çözeltileri, lavabolar, hasta yatakları, çarşafklar gibi nemli ortamlarda sıklıkla bulunur. Hastane dışında ise yüzme havuzları, saunalar ve kontakt lens solüsyonlarından sıklıkla izole edilir. *P.aeruginosa* insan normal florasının bir üyesi olarak bulunabilir ve sağlıklı insanlarda çok nadir hastalık oluşturur. Fırsatçı bir patojen olan *P.aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının başlıca etkenlerindedir (1-7).

GÖRÜNÜM VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Pseudomonodaceae ailesindeki bakteriler morfolojik olarak, gram negatif, spor oluşturmeyen, düz veya hafif kıvrımlı ince çomak şeklindedirler. Genellikle 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3,0 µm boyundadırlar. Bu standartlara uymayan birkaç istisna vardır. *Pseudomonas*lar geleneksel olarak kısa çomaklar şeklinde bulunurken, bazıları çok kısa, *P.putida* ve *P.syringea* gibi bazı türler de çok uzun olabilir. *Pseudomonas*lar bir uçta tek kirpik veya daha nadir olarak bir uçta birden fazla kirpikle hareketlidirler. *P.aeruginosa*'da bir uçta tek kirpik bulunur. *Burkholderia mallei* ise kirpiksiz ve hareketsizdir (1,2,4).

ÜREME VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

P.aeruginosa zorunlu aerop bir bakteridir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık kullanılan adi besiyerlerinde kolaylıkla ürediklerinden izolasyonları oldukça basittir. Optimal üreme ısısı 37 °C olmasına rağmen 42 °C 'de de üreyebilir. %5 koyun kanlı agarda kolonileri basık, uçları tüylenmiş gibi veya R koloni şeklinde olan beta hemolitik koloniler yapar. Kültürlerinde tatlımsı meyve ya da trimetilamin kokusuna benzer özel aromatik koku oluşturur. Bu özellik 2-aminoasetofenon'a bağlıdır. Mc Conkey agarda mavi-yeşil koloniler oluşturur (1-4,7).

P.aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken maltoz ve laktozu etkilemez. Oksidaz, L-arginin dihidrolaz ve sitratı pozitifdir. L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilazı negatifdir. H₂S yapmaz, nitrattan gaz yapar, katalazı pozitifdir. *P.aeruginosa* kökenlerinin çoğu mavi-yeşil bir ekstrasellüler pigment olan piyosiyanın salgılayarak, üredikleri ortamları bu renklere boyarlar. Bu pigment yalnız aerop ortamda oluşur ve uzun dalga boylu Ultraviole ışığında (wood lambası ile) fluoresan verir. Piyosiyanın'ı başka hiçbir bakteri oluşturamadığından, görülmesinin önemli tanısal değeri vardır. *P.aeruginosa*'nın bazı kökenleri, piyoverdin –fluorescein-(yeşil), piyorubin (kırmızı), piyomelanin (kahverengi) olmak üzere başka pigmentler de oluşturabilir (1,2,7).

ANTIJENİK YAPI

Epidemiyolojik amaçlar için *P.aeruginosa*'nın çeşitli suşlarını gruplara ayırmada lipopolisakkarit (LPS) yapısında, somatik (O) antijenleri kullanılır. Uzun süre kaynatma ve otoklavlama yöntemiyle hazırlanan ölü bakteri süspansiyonlarının antijen olarak tavşanlara verilmesi ile hazırlanan özgün antiserumlar kullanılarak, lam aglutinasyon yöntemiyle tiplendirmeler yapılmıştır. İki yaygın serotiplendirme şemasından biri Fisher-Devlin-Gnabasik sistemidir ve 7 tipi vardır. Diğer uluslararası antijen tiplendirme sistemi (IATS)'dir ve toplam 17 farklı tip gösterir (1,2). *Pseudomonas*larda ayrıca H antijenleri, ısıya duyarlı antijenler ve pilus antijenleri de saptanmıştır (1,2,3).

VİRULANS VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ

Patojen mikroorganizmalar, hücrel ve/veya hümoral konak bariyer sistemini aşarak, bir başka türde çoğalma veya canlılığını sürdürebilme kapasitesine sahip canlılar olarak tanımlanabilir. *P.aeruginosa* esas olarak fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. Patojenik ve nonpatojenik suşlar arasındaki temel farklılık, patojenik suşların virulans faktörleri üretebilme kapasiteleridir. *P.aeruginosa* çeşitli virulans faktörlerine sahiptir.

Adezinler

P.aeruginosa'nın konak hücrelerine yapışabilme özelliği, konağın akciğerlerinde, yanmış veya yaralanmış dokularında kolonize olarak hastalık oluşturabilmeleri için çok önemlidir. *P.aeruginosa*'nın pilusları ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları (nonpilus adezinler) olmak üzere iki protein adezini vardır (1-3,5). Bunlar yüzeye yapışmadan sorumludurlar. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda, yapışmayı etkileyen mutasyonların virulansı azalttığı gösterilmiştir. *P.aeruginosa* pilusları *N.gonorrhoeae* ve *V.cholerae* Tcp pilusuna benzeyen tip 4 pilustur (1,2). *P.aeruginosa* pilusları asialo GM1'e bağlanmayı tercih eder. *Pseudomonas* tarafından üretilen nöraminidaz, GM1'den sialik asit kalıntılarını yok ederek, pilusların yapışması için uygun ortam yaratır. *P.aeruginosa* pilusları epitel hücreye tutunmayı sağlar, müsene tutunmaz. Non pilus adezinlerin bir bölümü, hem epitele hem de müsene tutunmayı, diğerleri ise yalnızca müsene tutunmayı sağlar.

Pigment üretimi

Piyosyanin çözünebilir fenazin türevi bir pigmenttir ve klinik kökenlerin yarısından fazlası tarafından üretilir. Piyosyanin'in in-vitro koşullarda epitel dokuya zarar verdiği gösterilmiştir. Piyosyanin, NADH bağımlı oksijenin süperoksida veya hidrojen peroksida dönüşümünü katalize eder ve böylece özellikle oksijenden zengin akciğer gibi organlarda ciddi doku harabiyetinde önemli rol oynar. Diğer bir hücre dışı pigment olan piyoverdinin virulansla ilgili herhangi bir rolü yoktur (1,2,7). Piyosyanin ve piyoverdin'in siderefor

fonksiyonları da vardır. *P.aeruginosa* çoğalabilmek için demire gereksinim duyar ve transferrin, ferritin gibi vücut proteinleri ile demir için yarışır. Kısıtlı demir içeren ortamlarda, piyosyanin ve piyoverdin demir iyonları ile şelasyon yapar ve membran içindeki reseptör proteinlere bağlanarak demirin hücre içine alınmasını sağlar (5).

Ekzoenzim S

Ekzoenzim S, diğer protein ekzotoksinler gibi bir adenozindifosfat ribozil transferazdır. Saf ekzoenzim S fareler için toksiktir ve doku kültürlerinde hücrelere sitopatik etki gösterir. Deneysel yanık oluşturulmuş fare modelinde, ekzoenzim S'i kodlayan genin bozulmasıyla LD₅₀'nin 30'dan 105'e çıktığı gözlenmiştir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında ekzoenzim S, kanda bakterinin kendisinden önce tespit edilebilir (1,2,3,5).

Ekzotoksin A

Ekzotoksin A, 613 aminoasitten oluşan tek bir polipeptid zincirdir. Difteri toksiniyle tamamen aynı mekanizmaya sahip bir eksotoksindir. Sentezi demir tarafından düzenlenir, demir düzeyinin düştüğü durumlarda eksotoksin A üretimi en üst düzeydedir. Ekzotoksin A'nın lokal doku hasarında ve bakteriyel invazyonda rolü vardır (1,2,3,5,8).

Lipopolisakkarit

P.aeruginosa lipopolisakkaridi lipit A, organizmanın biyolojik etkisini düzenler, endotoksin oluşumunu sağlayarak sepsise neden olur. *Pseudomonas* lipopolisakkaritleri biyolojik olarak diğer gram negatif bakteri LPS den daha zayıftır (1,2,3).

Elastolitik Aktivite

Elastin akciğerlerdeki proteinin yaklaşık %30'unu oluşturan ve bu organa elastikiyet kazandıran bir proteindir. *Pseudomonas aeruginosa* LasA (staphylolysin veya LasA proteaz) ve LasB (elastaz) isimli iki elastolitik proteazın uyumlu çalışması ile elastolitik aktivite gösterir. Her iki enzim de çinko bağımlı metalloendopeptidazdır. Lokal doku hasarı ve bunun sonucunda inflamatuvar reaksiyona sebep olarak, organizmanın yayılmasına yardımcı olurlar. Bu aktiviteye Ekzoenzim S'in protein sentez inhibisyonunun da katkısı vardır (1,2,3,5,9).

Fosfolipaz C

En önemli fonksiyonu, akciğer enfeksiyonu sırasında, majör akciğer surfaktanı olan fosfotidil kolinin enzimatik parçalanmasıdır. *Pseudomonas*ların akciğer epitellerine adezyonunu kolaylaştırır ve sitotoksik aktivite göstererek lokal doku hasarına sebep olur (3,5,10).

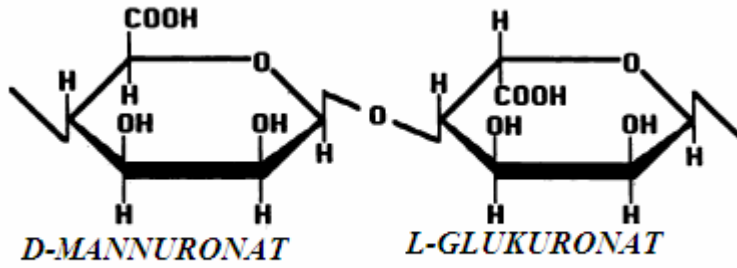
Sitotoksin

Çoğu ökaryotik hücreye toksiktir. Lökositlere sitopatik etkisi sebebiyle lökosidin olarak adlandırılır. Hücre membranlarına etki eder, polimorf nüveli lokositlerin fonksiyonunu bozar, deney hayvanlarında damar hasarına neden olur (1,2).

Alginat Üretimi

P.aeruginosa'ya ait özgün virulans faktörlerinden bir tanesi de alginattır. Hücre dışı mukoid bir madde olan alginat, β -1,4-glikozit bağları ile birbirine bağlanmış olan D-mannuronat ve L-glukuronat'ın kısmen O-asetillenmiş lineer kopolimeridir (Şekil-1). Alginat üretimi ile birlikte bakterinin etrafında vizköz bir jel oluşur. Alginat üreten bakterilerin oluşturduğu koloniler, alginat üretmeyen kolonilerden parlak (mukoid) görüntüleri ile kolaylıkla ayırt edilir (11-14). *In-vivo* ortamda alginat üretme kabiliyetinde olan bakteriler zengin *in-vitro* ortamlarda bu yeteneklerini hızla kaybedebilirler. Akciğerlerde bakteriyi saran alginat tabakası ve bakteri mikrokolonileri bir adezin görevi görebilir ve olasılıkla

bakterinin fagositozla yutulmasını engeller. Alginatın, bakterinin enfeksiyon oluşturmadaki bir diğer rolü ise konağın savunma sisteminden kaçmaya yardım etmesidir. Dolayısıyla alginatın virulans özellikleri saldırı ve savunma amaçlı olmak üzere iki yönlüdür (3,11-13,15-18).



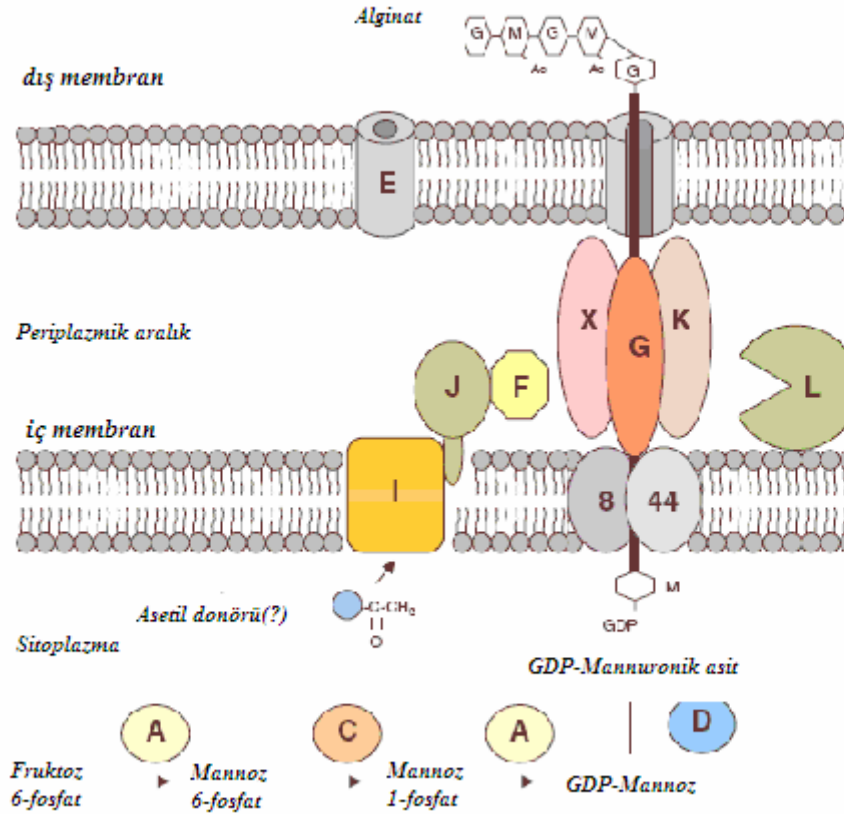
Şekil-1 Alginat yapısı (kaynak18'den düzenlenmiştir)

Alginat Sentezi

Alginat öncülü guanosine difosfat (GDP)-mannuronik asittir. GDP-mannuronik asit sentezi için algA, algC ve algD genlerinin kodladığı enzimlere ihtiyaç duyulur. AlgC geninin kodladığı fosfomannomutaz (PMM) ve fosfoglukomutaz (PGM), alginat biyosentezi boyunca mannoz 6-fosfatın mannoz 1-fosfata dönüşümünü, geri dönüşümlü olarak katalizler. PMM/PGM'nin kristalizasyon çalışmaları sonucunda bu enzimlerin kalp şeklinde dört domainden oluştuğu ve aktif bölgelerinde Mg^{2++} içerdikleri gösterilmiştir. PMM ve PGM lipopolisakkarit ve alginat sentezleri sırasında substrat olarak glukoz ve mannozu kullanabilir. AlgD geninin kodladığı GDP-mannoz dehidrogenaz, alginat üreten mukoid suşlarda, GDP-mannozun GDP-mannuronik aside dönüşümünü katalizleyen hız kısıtlayıcı enzimdir (11,19).

GDP-mannuronik asit sentezlendikten sonra polimerize olur ve alg8 ve alg44 gen ürünlerinin kombine kullanımıyla iç membrana taşınır.

Polimerizasyondan sonra mannuronat rezidülerinin bir kısmı C₅-epimeraz (algG) vasıtasıyla glukuronata epimerize olur. Yapı modeline göre algG periplazmik aralık içerisinde direkt olarak algK ile etkileşime girerek, büyümekte olan alginat polimerlerini alginat liyazın yıkımından korur. Alginat liyazın görevi tam olarak anlaşılammakla beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar, mukoid suşlarda polimerizasyon sırasında kısa oligomerler temin ettiği ve alginatı hızla yıkabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (19,20,21). Epimerizasyondan sonra mannuronat kalıntılarının bir kısmı algF, algJ ve algL gen ürünleriyle O₂ ve/veya O₃ pozisyonlarına asetillenir (Şekil-2). Bu reaksiyon sırasında asetil vericisinin ne olduğu halen bilinmemektedir. O-asetilasyon sonrasında kopolimer, dış membran proteini algE boyunca hücre dışına taşınır (11,22,23).



Şekil-2 Alginat sentezi (kaynak 11'den düzenlenmiştir).

Biofilm

Elektron mikroskopisinin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasından önce, bakterilerin sıvıların içerisinde serbest bir şekilde tek olarak bulunduğu, yani planktonik yapıda olduğu düşünülmekteyken, yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren yapılan çalışmalarla bunun tam aksi ortaya konarak, mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmek için katı yüzeylere gereksinim duyduğu ispatlanmış ve ıslak yüzeylerde oluşan mukoid yapıdaki bakterilerin fenotipik olarak planktonik yapıdaki bakterilerden farklı olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıktan yola çıkarak bu mukoid yapılara, canlı tabakalar anlamına gelen '*biofilm*' denilmiştir (24-28).

Bu dönemden sonra çeşitli araştırmacılar biofilmi farklı şekillerde tanımlamışlardır:

Donlan ve ark. göre (28) biofilm, mikrobiyal hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskopik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 µm yükseklikte, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, yapıdır.

Watnick ve Kolter (29) biofilmi, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin, salgıladıkları mukoz yapı içerisinde bir araya gelerek oluşturdukları '*mikroplar şehri*' olarak tanımlamışlardır.

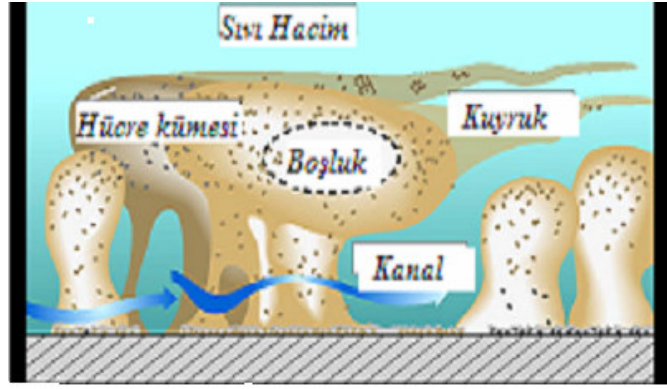
Biofilm Yapısı

Biofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glukozaminoglykanlar, GAG), çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerin oluşturduğu bir tabakadır. Matriks içinde kan pıhtısı, kristaller, toprak, metal artıkları bulunabilir bu yüzden biofilmin rengi bulunduğu yere göre değişir. Biofilmin temel birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türde bakteri hücrelerinden oluşabilir. EPS toplam organik karbonun %50-90'ını barındırarak ana maddeyi oluşturur. EPS kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik gösterse de öncelikli olarak

polisakkaritten oluşur ve polisakkaritlerden bir kısmı doğal bir kısmı da anyonik yapıdadır (25,28-30). Uronik asitlerin (D-glucuronic, D-galacturonic ve mannuronic) ve ketal bağlantılı piruvatların bu yapıya anyonik özellikler kattığı bildirilmiştir (31). Biofilm gram pozitif bakterilerden oluşmuşsa EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur (32). EPS polisakkarit dışında nükleik asit, protein ve diğer substansları da içermektedir.

Biofilm Oluşumu

Biofilm üç boyutlu olarak EPS ile çevrelenmiş su kanalları ve çok katlı bakteri tabakalarından oluşmuştur (30-33). Biofilmin bu üç boyutlu oluşumu ilkel dolaşım sistemine benzer. Mikrokoloniler arasına yayılmış bu su kanalları oksijen ve besin gibi yaşamsal substansları taşımakla beraber, metabolik atıkların uzaklaştırılma işleminde de rol alır (Şekil-3). Biofilmlerde fiziksel ve biyolojik yapı çoklu intrinsek ve ekstrinsek faktörler ile düzenlenir. Fiziksel yapı daha çok EPS ile ilişkilidir. EPS jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilir ve bu fazlara geçişte protein, Ca iyonları, polisakkaritler rol alır (30-32). Biofilm içerisinde bakteriler, oksijen kullanımı ve antibakteriyel direnç açısından tabakalı bir yerleşim gösterir. Tabakalı yapının altında kalan hücreler diğerlerine nazaran daha stabildir. EPS yapısının %93'ü sudur, bu yapıda hidrofilik ve hidrofobik kısımlar aynı anda bulunur. Konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküllerin biofilm oluşumuna katılmasıyla, canlı sistemlerde zaman içerisinde eritrosit ve fibrin katılımı ile besince daha zengin ve daha kararlı biofilm oluşumu görülür (34,35).



Şekil-3 Biofilm mimarisi (35 numaralı kaynaktan düzenlenmiştir).

Biofilmin Önemi

Biofilm oluşumu tüm doğal ortamlar için genel bir davranıştır. Vücudumuzda, endüstriyel su sistemlerinde, gıda maddeleri üretim ekipmanlarında ve tıbbi cihazlarda biofilm oluşabilir (36,37). Biofilm oluşumu kimi zaman insan sağlığı açısından faydalı olabilirken, çoğu zaman da zararlıdır.

İnsan sağlığı açısından faydalı biofilmler

İçme ve kullanma sularının kalitesi biofilmlerdeki mikrobiyal metabolizma ile sağlanır. Biofilmlerdeki bakteriler sudaki toksik bileşenlerin pek çoğunu parçalar ve böylece su kirliliğini azaltır. Bu davranış, atık su arıtma amacıyla endüstriyel boyutta kullanılmaktadır (38).

Vücut içerisinde bazı dokular üzerinde kolonize olabilen mikroorganizmalar vücudumuzu patojenlere karşı korurlar. Örneğin mide-barsak kanalı laktik asit bakterileri tarafından kolonize olmuştur. Oluşan bu biofilm vücudumuzun doğal mikroflorası olup, bu bölgede patojenlerin kolonizasyonunu engeller (39).

İnsan sağlığı açısından zararlı biofilmler

İnsan sağlığına zararlı biofilmler; canlı doku yüzeyinde oluşan biofilmler, vücuda implante edilen biomalzemelerin yüzeyinde oluşan biofilmler ve vücut dışında oluşan biofilmler olarak sınıflandırılır.

Canlı dokularda oluşan biofilmler, patojen mikroorganizmaların canlı dokuya tutunması veya normal flora elemanlarının patojen hale geçmesi şeklinde görülür. Doku veya organ işlevlerini yerine getirmek üzere insan vücuduna implante edilen cihazların uzun süre kullanımını etkileyen nedenlerin başında, biomalzemeden kaynaklanabilecek enfeksiyon olasılığı ve doku hücrelerinin biomalzeme ile bütünleşememesi gelmektedir. Bu enfeksiyonların nedeni, bakterilerin malzeme yüzeyine kolaylıkla uyum sağlayıp üremeleri ve kolonize olmalarıdır (40).

Klinik araştırmalar mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda birkaç suşun hâkim olduğunu göstermiştir. Staphylococcus epidermidis ve Staphylococcus aureus biomalzeme yüzeyinde en çok karşılaşılan bakterilerdir. Bunun yanı sıra P.aeruginosa, Escherichia coli, Proteus mirabilis, beta hemolitik streptokoklar, enterekoklar ve Candida albicans örnek verilebilir (35,41).

Biofilmler su ve petrol dağıtım sistemlerinde, soğutma sistemlerinde, filtrasyon sistemlerinde, gemi yüzeyinde ve doğadaki pek çok yüzeyde bulunabilir. Vücut içerisindeki biofilmler zengin besin kaynaklarına sahiptirler fakat dış ortamda gelişen biofilmler genelde besin değeri bakımından fakir koşullarla karşı karşıya kalırlar (42).

Biofilm oluşum basamakları

Mikrobiyal biofilm oluşumu, tıpkı spor oluşumu gibi, bakteriyel yaşam döngüsünün bir parçasıdır (26). Diğer gelişim süreçleri gibi biofilm oluşumu da, birbirinden farklı ve iyi düzenlenmiş basamaklara ihtiyaç duymaktadır. Belirgin moleküler mekanizmalar, organizmadan organizmaya farklılık gösterse de,

biofilm oluşum basamakları geniş yelpazede birbirine benzemektedir. Bu basamaklar;

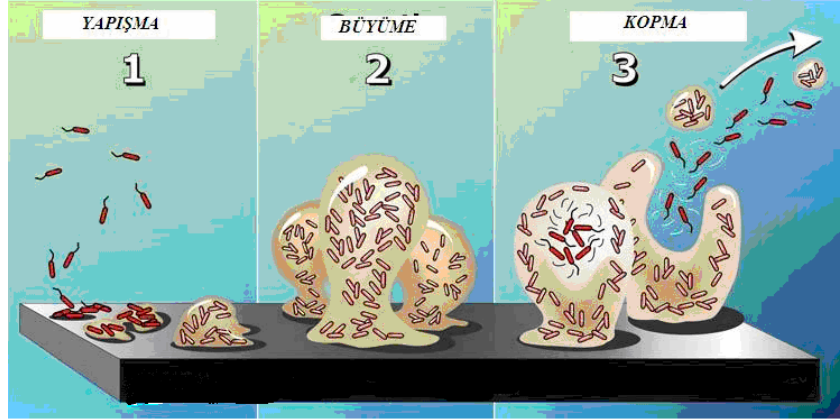
- 1- Tutunma yuzyeyinin oluşumu
- 2- Öncü bakterinin tutunması
- 3- Mukoz yapı oluşumu
- 4- İkincil kolonizasyon
- 5- Olgun biofilm'dir (29,37).

Biofilm oluşumu dinamik bir süreçtir. Ortamda mevcut olan organik ve inorganik moleküller yuzyeye diffuzyonla veya tirbulan akışla taşınırlar ve yuzyeyde birikirler. Yuzyeye absorblanan bu maddelerden özellikle organik olanlar malzeme yuzyeyine bakterilerin yapışmasını kolaylaştırır. Bir biomalzemenin implantasyonundan sonra ilk olay tükürük, mukus, serum veya kan gibi biomalzemeyi çevreleyen farklı vücut sıvılarındaki çeşitli moleküllerin yuzyey üzerinde birikerek hazırlayıcı film oluşurmalarıdır. Biomalzemeler yuzyey özelliklerine göre farklı maddeler absorblayacaklarından, aynı bölgeye implante edilen değişik biomalzemeler üzerinde oluşacak hazırlayıcı filmlerde farklı olacaktır. Bu aşamadan sonra implantasyonun yapıldığı bölgedeki doku hücreleri ve mikroorganizmalar arasında yuzyeye tutunma yarışı başlar. Bu yarış doku hücreleri tarafından kazanılırsa, malzeme doku ile bütünleşir ve dolayısıyla implantın uzun süreli kullanımı mümkün olur. Tersi durumda, yani yarış mikroorganizmalar tarafından kazanıldığında ise enfeksiyon gelişir. İnsan vücudunda albümin, fibronektin, kollagen gibi proteinler, reseptör görevi görerek bakteri yapışmasında çok etkindirler (28,40).

Biofilm gelişmesinde ikinci basamak, sıvı ya da hava içerisinde aktif ya da pasif difüzyonla taşınan bakterilerin hazırlayıcı film tabakaya yapışmalarıdır. Aktif taşınım bakterilerin flagella ve pili gibi hücre uzantıları vasıtasıyla veya bazı bakterilerin amipsi hareketleriyle gerçekleşir. Tutunma, yuzyeyin ve bakterilerin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu tutunma işleminde Van-der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve hidrojen bağları olmak üzere üç temel

fizikokimyasal kuvvet rol oynar. Yapılan çalışmalarda çoğu hücrenin negatif yük taşıdığı ve bunun da sıvı akışı ile şarj olunan yüzeye yapışmayı kolaylaştırdığı bulunmuştur. Fimbria ve pilus gibi yapılar sahip oldukları hidrofobik aminoasit kalıntıları sayesinde hidrofobisiteyi arttırarak yapışmayı kolaylaştırır (42-44).

Bakteriler yüzeye tutunduktan sonra, hazırlayıcı film tabaka ile bakteri arasında protein-reseptör etkileşimleri ile zamana bağlı olarak spesifik geri dönüşümsüz yapışma gerçekleşir. Bakterilerin ürettiği başta glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz gibi polisakkaritler de yüzeye bağlanarak hücre kümeleşmesine ve mikrokolonilerin oluşmasına yardımcı olur. Sıcaklık, besi ortamı, katyon dengesi gibi çevresel koşullar da uygunsa bakteri üremesiyle birlikte EPS üretimi gerçekleşir (şekil-4). Organik maddeler, ölü hücreler ve minerallerin de katılımıyla biofilm yapısı oluşur (42-45).



Şekil-4 Biofilm oluşum basamakları (<http://www.erc.montana.edu>, internet sitesinden).

Biofilm Genetiği

Genetik adaptasyon; hayatı devam ettirme ve uyumun vazgeçilmez bir unsurudur ve genlerde birbirini takip eden mutasyon ve rekombinasyonlar ile yeni genetik materyal kazanarak veya mevcut olan materyalin düzenlenmesi ile sağlanabilir. Bakteriyel gen ekspresyonundaki esneklik, hızlı değişen çevresel koşullarda yaşama izin verir ve bakteri özellikli adaptasyon sağlayarak neredeyse dünya üzerinde her yerde yaşayabilme özelliklerine kavuşur. Birçok patojen ve kommensal bakteri, çevresel yaşam ve canlı hücre arasında geçiş gösterebilme yeteneğindedir ve besin elde edebilmek için en az primer ve sekonder immun defans kadar hızlı hareket ederek uyum göstermek zorundadır. Bu uyumun en güzel örneklerinden birisi, sistematize gen ekspresyonu vasıtasıyla bazı sesil bakterilerin ekzopolimer üretebilme yeteneği kazanarak biofilm oluşturmalarıdır (34,46).

Bakteriyel biofilmlerin önemli ve her zaman var olan etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmakla beraber, son yıllarda ilgi özellikle bakteriyel biofilm oluşumu arkasındaki düzenleyici mekanizmalar ve kemoteropatik ajanların özgül etki bölgelerinin gösterilmesine kaymıştır. Biofilm gelişimi ve gen regülasyonu arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik birçok direkt hedef gen, proteomik ve genomik temelli çalışmalar yapılmış fakat biofilm içi gen ekspresyonu heterojenite gösterdiği ve birçok etken tarafından regüle edildiği için çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (47-50). Biofilm detaylarının düzenlenme süreci dinamik ve siklik bir süreçtir. Çevresel şartlar biofilm formasyonu için gerekli genlerin ekspresyonunu tetikler.

Biofilm yapısı ve regülasyon basamaklarını açıklamaya yönelik yapılan moleküler çalışmalar sonucunda, biofilm oluşumunda rol aldığı düşünülen birçok gen tanımlanmıştır (46).

Biofilm oluşumunun, planktonik özdeşlerine göre bakteriye sağladığı avantajlar birkaç başlık altında incelenebilir:

1-Savunma

Biofilmler tükürüğün yıkama fonksiyonu ve kan akımı gibi fiziksel güçlere ve fagositoza dirençlidirler. Fagositoz için biofilm üzerine saldırı, aslında çevre dokuya biofilmin kendisinden daha fazla zarar verir. Biofilmler, genetik eşdeğerleri olan planktonik bakterileri öldürmek için gerekli antimikrobiyel dozun 10-1000 katını tolere edebilir (35). Yaşayan canlılarda biofilmi eradike edebilmek olağanüstü zordur. Doğal kalp kapağı endokarditi, dental hastalıklar, orta kulak iltihapları, medikal alet ilişkili hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları biofilmlerle ilişkili hastalıklardır. Biofilmlerin bu antimikrobiyel direnci, birkaç biofilme özgü özellikten kaynaklanır (51,52,53) (Şekil-5). Bunlar;

1-1. Kısıtlı Antimikrobiyel Penetrasyon

Biofilmi çevreleyen EPS etkin bariyer oluşturarak, kimyasal reaktiflerin, biosidlerin, fagosite edici ajanların penetrasyonunu kısıtlar.

Biofilm direncindeki diffüzyon kısıtlanmasının rolünü araştıran birçok çalışmalarının verileri çelişkilidir. Genel görüş birliği, *P.aeruginosa* biofilmlerinin aminoglikozidlerin penetrasyonunu geciktirirken ciprofloksasin, ofloksasin gibi kinolon grubu antibiyotiklerin penetrasyonunu geciktirmediği yönündedir (54-56). Diğer taraftan genel olarak anlaşılmıştır ki, penetrasyon kısıtlaması başlangıçta biofilm direncine neden olsa da, uzun dönem kullanımda bu pek mümkün olmamaktadır; çünkü ilaç moleküllerinin etkinliği, polisakkarit matrikste reaktif bölgelere bağlanmasına bağlıdır. Bu aktif bölgeler doymaya devam ettikçe, antibiyotiğin öldürme işlemi devam eder. Başka bir deyişle, doz artımı yapılarak biofilm penetrasyon kısıtlamasının önüne geçmek mümkün olabilmektedir (57).

1-II. Büyüme Hızı ve Metabolik Aktivitedeki Fizyolojik Farklılık

Biofilm içindeki bakteriyel yoğunluklar farklılık gösterir, sonuç olarak perilerdeki bakteriler besinlere ve oksijene iç taraftaki bakterilere oranla daha rahat ulaşabilmektedir. Besin ve oksijen alımındaki bu farklılık, bakteri içindeki metabolik aktivitede de farklılık yaratır bu da populasyon içindeki heterojeniteyi sağlamaktadır. Birçok antibiyotik primer olarak metabolik aktif hücrelere saldırdığından dolayı biofilm popülasyonundaki bu heterojenite antibiyotik duyarlılığında da farklılıklar yaratabilmektedir. Bu durum, yavaş üreyen bakterilerin biofilm duyarlılığını azaltmaktadır (58,59).

Fleurosan proplar ve reportör genler kullanılarak yapılan çalışmalar, büyüme hızındaki bu farklılığın biofilm direncine katkıda bulunduğunu, fakat biofilm-planktonik hücre arasındaki direnç farklılığını açıklayamayacağını göstermiştir. Az büyüyen ve hiç büyümeyen bakteriler artmış biofilm rezistansına sebep olur fakat bu durum bir direnç mekanizması değildir (60,61,62).

Oksijen azlığı bazı antibiyotiklerin, antibakteriyel etkinliğini azalttığından dolayı, oksijene ulaşabilirlik biofilmdeki antibakteriyel dirençle ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa* biofilmlerinin katı anaerobik şartlarda, anaerobik biofilm oluşturacak gen ürünleri sergilediklerini göstermiştir. Bu durum, oksijen alım kısıtlanmasının fizyolojik ve fenotipik değişiklikler oluşturarak antibiyotik direncini arttırdığının kanıtıdır. Çeşitli antibiyotiklerle yapılan direnç çalışmalarında oksijen kısıtlı olan bölgelerde antibiyotik etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (63-65).

1-III. Biofilme Özgül Fenotip

Bakteriler yüzeye tutunduktan sonra birçok fizyolojik ve metabolik değişiklikler gösterirler. Örneğin AlgC eksopolisakkarit alginat sentezi için gerekli bir gen dir ve yapışmadan onbeş dakika sonra up-regüle olur (66). Benzer şekilde yapışmadan sonra *P.aeruginosa*'daki flagella sentezini inhibe eden alternatif sigma faktörü de eksprese olur, bu da yapışmadan sonra flagellaya gerek olmadığını gösterir (67). *Pseudomonas putida*'da yapılan çalışmalarda,

yapışmadan altı saat sonra flageller biosentetik genler flhN ve flgG down-regüle olmuş, pili biosentez genleri pilC, pilR ve pilK up-regüle olmuştur (68).

Biofilm gelişim regülasyonundaki en belirgin değişiklikler, oksidatif hasara direnç, eksopolisakkarit üretimi ve metabolizmada kullanılan proteinlerde gözlenmiştir (64).

Aminoasit metabolizması ve TCA döngüsünde görevli proteinler, biofilm gelişiminin olgun evrelerinde up-regüle olurlar, bu da biofilmin karbon metabolizmasında gideceği değişiklikleri gösterir. Bununla beraber antibiyotik duyarlılığını etkileyen genler de up-regüle olur, örneğin *P.aeruginosa* biofilmlerinde hücre dışı membran lipopolisakkarit yapısına etki ederek, aminoglikozid duyarlılığının azalmasına sebep olan tolA geni, yapışmadan sonra up-regüle olur (69).

Biofilm bakterileri, planktonik bakterilerle karşılaştırıldıklarında farklı gen ve protein sentezlerler. Biofilme özgül fenotipin induksiyonu, antimikrobiyellere direnç gelişiminde kritik rol oynayan mekanizmaların açığa çıkmasına yol açar.

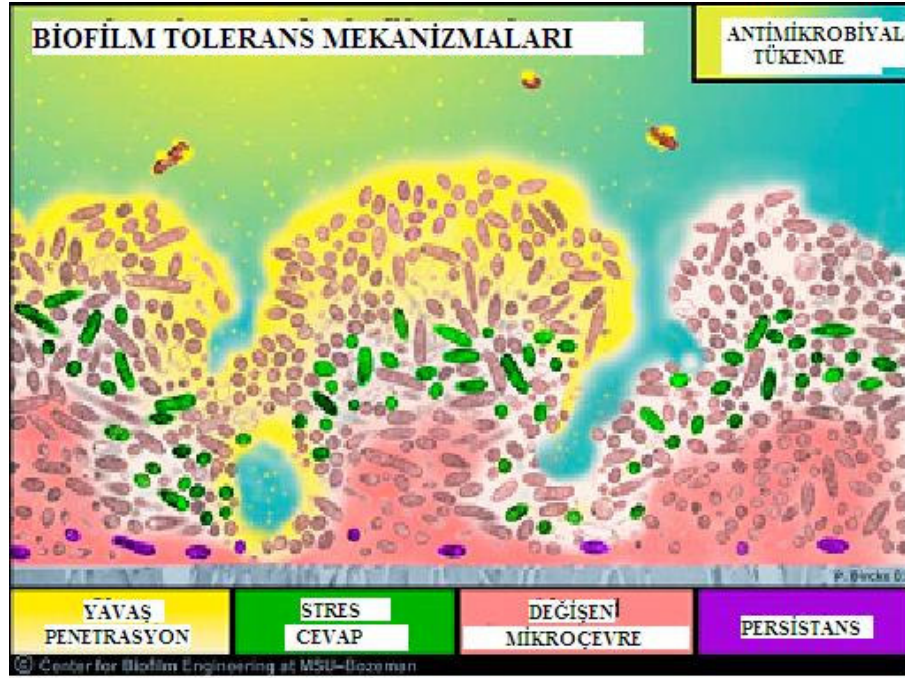
1- IV. İnatçı Fenotipik Varyantlar

Yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa* biofilm hücrelerinin büyük kısmının antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarıyla etkin olarak öldürüldüğünü fakat dozun ileri derecede arttırılmasının bile sağ kalan bakterileri öldürmeye yetmediği gösterilmiştir. Bu durum, biofilm hücrelerinin 'inatçı varyant' olarak isimlendirilen küçük bir kısmının, biofilm topluluğu içerisindeki artmış dirençten sorumlu olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (62,70).

1-V. Quorum Sensing

Quorum sensing, biofilm içi bakterilerin birbirleriyle haberleşerek virulans faktörleri üretim özelliklerinin düzenlenmesini sağlayan bir 'çoğunluğu algılama' yeteneğidir. Acyl-Homoserine-Lactone (AHL) sistemi bir grup Gram negatif bakteride, otoindükleyici-2 sistemi Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde,

peptid bağlantılı sistem ise Gram pozitif bakterilerde hücre-hücre arası iletişimde kullanılmaktadır. P.aeruginosa quorum sensing sistemiyle ekstraselüler virulans faktörleri, stasyonel faz sigma faktörü ve biofilm farklılaşmasını kontrol edebilir. Bununla beraber antibiyotik direncinde quorum sensing'in rolü tam olarak belli değildir.



Şekil-5 Biofilm direnç mekanizmaları. (<http://www.erc.montana.edu>, internet sitesinden)

2-Kolonizasyon

Biofilm formasyonu, bakterilerin hedef bölgelerinde kalabilme mekanizmalarıdır.

Vücut besinden zengin, su dengesi, oksijen eldesi ve ısı bakımından göreceli olarak durağandır. Vücut, bakterilerin yaşayabilmesi için bu denli uygun bir ortam olduğu için, bakteriler biofilm formuna dönüşüp o bölgede kalabilmek için temel

olarak güdülenir. MSCRAMM_S olarak ifade edilen bakteriyel yüzey proteinleri (clumping faktör A-B, fibronektin binding faktör A-B, kollagen binding protein), fibronektin, fibrinojen, vitronektin ve elastin gibi vücut ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanırlar (71).

Biofilm formasyonu bir kez oluştuktan sonra, birçok adezin ve motilite faktörlerinin üretimi baskılanır. Pili ve flagella gibi adezinlerin ana rollerinin başlangıç bağlanma olduğu düşünülmektedir. Baştanbaşa bakıldığı zaman bakteri adezinleri etkileyici bir sırayla üretilir ve bağlanma gerçekleşir (34,46).

Biofilm formasyonlarında karbon katabolizmasına sebep olan gen regülasyonları kritik rol oynar. EPS üretimi ve biofilm gelişimi glukoz ve diğer kolay kullanılabilen karbon kaynaklarının bolluğunda artar. Ne zaman besin kaynağı tükenmeye başlarsa bakteri koparak planktonik faza geçer ve daha uygun bölge arayışı içerisine girer. Olasılıkla, besin azalması daha iyi bir ortam bulunması için bakteriyi tetiklemektedir. Glukoz basit bir şekilde substrat rolü oynayarak EPS sentezini arttırabilir fakat sıklıkla karmaşık mekanizmalarla, EPS sentezini transkripsiyonel seviyedeki regülasyonlarla arttırır (32,35,46).

3-Toplu Yaşam ve Avantajları

Biofilm bakterileri ve çok hücreli organizmalar arasında birçok benzerlik vardır. Biofilm bakterileri kendi çevrelerini hissedebilirler ve bu onlara kendi metabolik aktivitelerini buna göre ayarlama olanağı sağlar. Bu bakteriler buldukları ortamda elde edilebilir maddeleri maksimum oranda kullanırlar ve böylece tehlikeli şartlardan kendilerini koruyabilirler. Bakteriler biofilm içerisinde çoğaldıkça, biofilm içi gen ekspresyon değişiklikleri meydana gelerek fenotipik heterojenite sağlanır, bu da biofilm içinde tıpkı çok hücreli organizmalarda gözlenen hücresel farklılaşma gibi özelleşmeyi ve iş bölümünü sağlar. Daha ileri giderek biofilmler quorum sensing sistemi içerisinde oto-inducing sinyalleri kullanarak tıpkı çok hücreli organizmalarda gözlenen programlanmış hücre ölümüne benzer bir süreç gösterebilirler (72,73). Bütün bu benzerliklere rağmen çok hücreli organizmalar ve biofilm bakterileri arasında temel farklılıklar vardır.

Bakteriler çevresel özelliklere ve şartlara uyum gösterip değişikliklere tepki verebilirken, bu değişiklikler kalıcı değildir. bakteriyel hücreler farklılaşma göstermektense, değişen çevre şartlarına uyum sağlayıp, sağ kalımlarını arttırabilmek için gen ekspresyon uyumlarını yaparlar (74).

4-Gen Transferi

Biofilmler ekstrakromozomal DNA (plazmid) değişimi için ideal yapılardır. Konjugasyon biofilm hücrelerinde, planktonik hücrelere göre daha fazla görülür. Yapılan çalışmalar sonucunda konjugasyona hazır plazmid içeren bakterilerin biofilm oluşturmaya daha yatkın oldukları öne sürülmektedir. Verici hücrelerden alıcı hücrelere aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabilir ve dolayısıyla biofilmler antibiyotiklere karşı gelişen direncin yayılmasında çok önemli rol oynayabilirler (35,46).

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Aralık 2000-Mayıs 2005 tarihleri arasında endotrakeal aspirat örneklerinden etken olarak soyutlanan 57 *P.aeruginosa* suşu ve aynı tarihler arasında trakea dışında çeşitli klinik örneklerden (kan, balgam, boğaz, yara, idrar, batin içi sıvısı gibi) soyutlanan 91 *P.aeruginosa* suşu olmak üzere toplam 148 *P.aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alındı. Standart köken olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Suşların tanımlanması geleneksel yöntemler ile yapıldı. Suşlar; şekerlere olan etki, oksidaz, katalaz, arginin dihidrolaz test pozitiflikleri, piyosyanin, piyoverdin pigment oluşumu gibi biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandı. Nonfermantatif, oksidaz testi olumlu, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri olumsuz, H₂S oluşturmeyen, metil kırmızısı ve Voges Proskauer (VP) testleri negatif, Mueller Hinton Agar'da pigment oluşturan suşlar *P.aeruginosa* olarak tanımlandı (1-4). Tüm suşların disk diffüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları CLSI standartlarına göre test edildi (75,76).

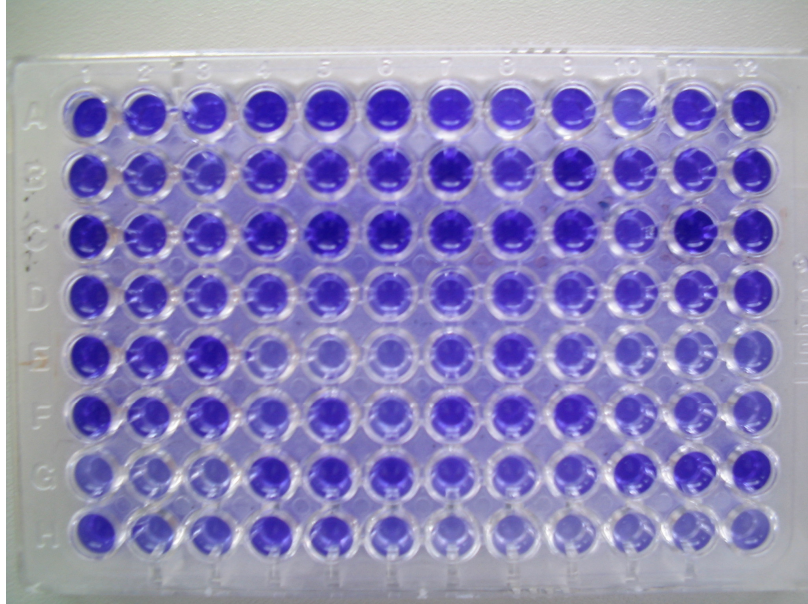
BİOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

Bakterilerde biofilm oluşumu mikropate yöntemi ile araştırıldı (77, 78).

Kanlı agarda bir gece inkübasyondan sonra elde edilmiş suşların taze kültürlerinden, bulanıklık 0.5 McFarland olacak şekilde %1 glukozlu Luria Bertoni (LB) besiyeri içeren tüplere alınarak süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan her suş üç kuyucuğa olmak üzere, hazırlanan süspansiyonların 200'er mikrolitresi, 96 kuyucuklu mikropate içerisine dağıtıldı. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen %1 glukozlu LB besiyeri kullanıldı. Aynı işlemler ikinci bir mikropate için de uygulandı ve böylece 24 ve 48 saatlik iki grup elde edildi. Mikropate'ler 37°C'de aerop ortamda inkübe edildi. 24. ve 48. saatlerin sonunda mikropateler etüvden çıkartılarak 3 kez distile su ile yıkandı ve kuyucuklara, hazırlanan % 0,1 Kristal viole solüsyonundan 200 µl dağıtılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe

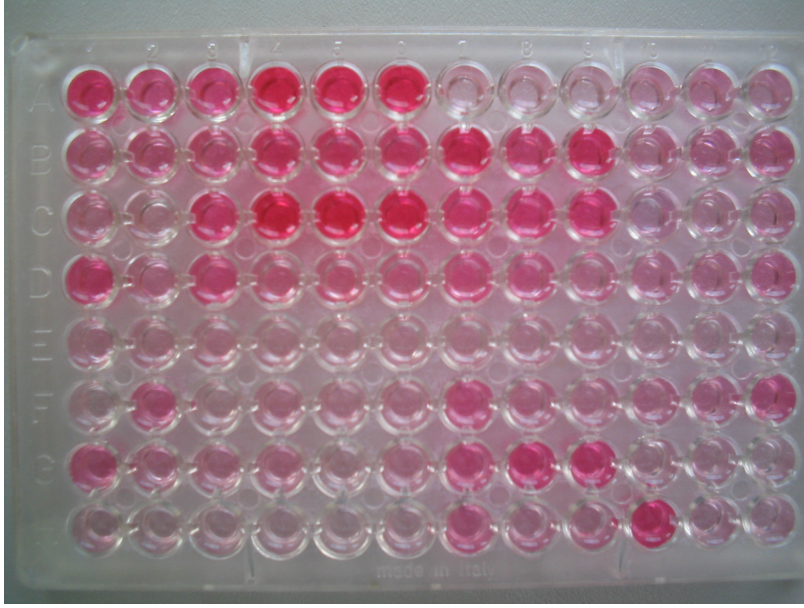
edildi. İnkübasyon sonunda mikroplateler distile su ile tekrar üç kez yıkandı ve kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucukların cidarında gözle görünür bir film tabakasının oluşması “*biofilm pozitif*” olarak değerlendirildi. Hava ile temas eden kısımda halka şeklinde oluşan tabaka dikkate alınmadı. Makroskobik olarak yapılan bu değerlendirmenin ardından kuyucuk cidarında tutulan film tabaka, 200 µl %95’lik etanol ilavesiyle 10 dakika çözdürülerek, 540nm’de “ELISA Pasteur Diagnostic Reader” ile okutuldu (Şekil-6).

Tüm işlemler kristal viole yerine safranin solüsyonu kullanılarak tekrarlandı. Farklı olarak çözdürme işlemi %50’lik asetik asit ile yapıldı ve 470 nm.’de “ELISA Pasteur Diagnostic Reader” ile okutuldu (Şekil-7). Sonuçlar, *P.aeruginosa* ATCC 27853’den elde edilen absorbans değeri ile karşılaştırılarak yorumlandı.



Şekil 6: Biofilm oluşumunun kristal viole kullanılarak değerlendirilmesi

*Her suş üç kuyucukta denenmiştir.



Şekil 7: Biofilm oluşumunun safranin kullanılarak değerlendirilmesi

*Her suş üç kuyucukta denenmiştir.

ÇALIŞILAN ANTİBİYOTİKLERİN Sub MİK DOZLARINDA BİOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

P.aeruginosa ATCC 27853' ün oluşturduğu biofilm miktarı esas alınarak, bu değerlerin %100'ü ve üzerinde biofilm oluşturan 6 suş ve %50-%100'ü arasında biofilm oluşturan 4 suş olmak üzere toplam 10 *P.aeruginosa* suşu bu amaçla test edildi. Bu suşların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri standart broth dilüsyon yöntemi kullanılarak araştırıldı (75,76).

Sub mik dozlarda biofilm oluşumu Yassien ve ark. tarif ettiği yöntemle göre araştırıldı (79). Kullanılan her antibiyotik için bir seri tüp hazırlandı ve her dizideki ilk tüpler dışındaki tüm tüplere, 500 µl triptik soy broth (TSB) dağıtılarak sıralandı. Kinolon grubu antibiyotiklerden ciprofloksasin, moksifloksasin ve levofloksasin; levofloksasin NaOH, ciprofloksasin ve moksifloksasin fosfat

tampon solüsyonunda olmak üzere, son konsantrasyonu 512 µg/ml olacak şekilde çözdürüldü. Hazırlanan bu antibiyotik solüsyonlarının 1000'er µl'si birinci sıra tüplere dağıtıldı. İkinci tüpten başlayarak her seferinde 3-5 kez emip bırakmak suretiyle karıştırarak, tüpten tüpe 500 µl aktarmak suretiyle, son konsantrasyon 0,0625 µg/ml olacak şekilde çift kat sulandırılmalar yapıldı. Sondan bir önceki tüpten 500 µl dışarı atıldı. Son tüplere, antibiyotiksiz şartlarda biofilm oluşumunu gözleyebilmek açısından antibiyotik eklenmedi. Çalışma kapsamına alınan 10 P.aeruginosa suşu, bir gece öncesinden kanlı agarda hazırlanan taze kültürlerinden, bulanıklık 0,5 McFarland olacak şekilde TSB içeren tüplere alınarak süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyon, konsantrasyonu $1,5 \times 10^6$ CFU/ml olacak şekilde dilüe edildi ve elde edilen karışımın 500 µl'si, çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik içermesi sağlanmış olan tüplere dağıtıldı. 24 ve 48 saatlik gruplar elde edebilmek açısından, her suş için tüm işlemler ikişer kez tekrarlandı. Hazırlanan tüm tüplerin 200 µl'si, mikroplate kullanarak biofilm ölçümlerinin yapılması amacıyla, 96 kuyucuklu mikroplate içerisine alındı ve 37°C'de aerob ortamda inkübe edildi. 24. ve 48. saatlerin sonunda mikroplateler etüvden çıkartıldı. Üremenin olduğu MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarda antibiyotik içeren kuyucuklardaki biofilm oluşumları, daha önce tanımlandığı şekilde kristal viole kullanılarak araştırıldı ve bu konsantrasyonlardaki biofilm oluşum oranları, kendi aralarında ve antibiyotiklerle olan ilişkisi karşılaştırıldı.

ÇALIŞILAN ANTİBİYOTİKLERİN BİOFİLM OLUŞTURMUŞ BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI (BİOFİLM İNHİBİTOR KONSANTRASYON-BİK-)

Biofilm oluşturmuş bakteriler üzerine, kinolon grubu antibiyotiklerden ciprofloksasin, moksifloksasin ve levofloksasin'in çeşitli konsantrasyonlarının etkileri aşağıda tanımlandığı şekilde araştırıldı.

P.aeruginosa ATCC 27853' ün oluşturduğu biofilm miktarı esas alınarak, bu değer %100'ü ve üzerinde biofilm oluşturan 6 suş ve %50-%100'ü arasında biofilm oluşturan 4 suş olmak üzere toplam 10 P.aeruginosa suşu bu amaçla test edildi. 24 ve 48 saatlik gruplar oluşturularak, 10 P.aeruginosa suşunun biofilm

oluşturmaları sağlandı. 3 farklı antibiyotiğin çalışılabilmesi için, her suş 3 sıra kuyucuğa konularak daha önce tanımlandığı şekilde biofilm oluşturuldu. Süre sonunda mikroplateler etüvden çıkartılarak 3 kez distile su ile yıkandı. Çalışılan antibiyotiklerin seri dilüsyonla elde edilen farklı konsantrasyonları (512 µg/ml-0,0625 µg/ml), 200'er µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve mikroplateler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikroplateler 3 kez distile su ile yıkanarak antibiyotikler uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara 200'er µl taze LB broth konularak 6 saat çalkalayıcıda inkübe edildi ve her kuyucuk içeriğinin 10 µl'si alınarak kanlı agara ekim yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda üreyen koloniler sayılarak yorumlandı ve BİK değerleri bulundu (79,80). Bu değerler her bir suş ve antibiyotik için, MİK değerleriyle karşılaştırılarak yorumlandı.

ALGINAT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışma kapsamına dahil edilen 148 *P.aeruginosa* suşunun alginat üretim oranları karbazol testi kullanılarak, üronik asit değerlerinin ölçülmesi esasına göre araştırıldı.

Kanlı agarda bir gece inkübasyondan sonra elde edilen *P.aeruginosa* suşlarının taze kültürleri LB besiyerine alındı ve 37 °C'de 24 saat üremeleri için bekletildi. Bu sürenin sonunda bulanıklık 0,5 McFarland olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı ve alginat ölçümü bu süspansiyonlardan elde edilen süpernatant kısmından çalışıldı (81). Alginat üretimi üronik asitin karbazol borat ile verdiği reaksiyon temelinde, mikroplate'de tanımlanan yöntem tüpe uyarlanarak araştırıldı (82). Hazırlanan süpernatantın 200 µl'si, 25 mM olacak şekilde sülfürik asit içerisinde çözdürülen sodyum tetraborat'ın 800 µl'si ile karıştırılarak çalkalandı ve 100 °C'ye ayarlanmış Pasteur fırınında 10 dakika ısıtıldı. Süre sonunda fırından çıkartılan tüpler, 15 dakika oda ısısında soğumaları sağlandıktan sonra, %0.125 olacak şekilde etanol içerisinde çözdürülen karbazolün 200 µl'si tüplere eklenerek tekrar Pasteur fırınında 100 °C'de 10 dakika ısıtıldı. Süre sonunda fırından çıkartılan tüpler, 15 dakika oda ısısında beklenecek soğumaları sağlandıktan sonra, tüp içeriklerinin 200 µl'si alınarak 96

kuyucuklu steril mikroplate içerisine yerleştirildi ve 550 nm.'de mikroplate okuyucu kullanılarak absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar, ticari alginat kullanılarak hazırlanan standart eğri temel alınarak, µg/ml cinsinden hesaplandı ve bu değerler ATCC 27853'den elde edilen değerlerle karşılaştırılarak yorumlandı.

Standart alginat eğrisi hazırlama:

Standart ticari alginat (Fluka 05550), 0,125-100 µg/ml aralıklarında sulandırılarak, her bir sulandırımın 200 µl'si alındı ve daha önceden tarif edildiği Şekilde alginat ölçümleri yapıldı. 550 nm'de elde edilen absorbas değerleri kullanılarak standart eğri elde edildi.

Çalışılan Antibiyotiklerin sub MİK dozlarında alginat üretiminin araştırılması:

Çalışılan antibiyotiklerin (cipfloksasin, moksifloksasin, levofloksasin) alginat üretimine etkileri aşağıda tanımlandığı Şekilde alışıldı .

Kullanılan her antibiyotik için bir seri tp hazırlandı ve her dizideki ilk tüpler dışındaki tüm tüplere 500 µl MHB dağıtılarak sıralandı. Cipfloksasin, moksifloksasin ve levofloksasin, uygun çözücülerde, son konsantrasyonu 512 µg/ml olacak Şekilde zdrld. Hazırlanan bu antibiyotik solüsyonlarının 1000'er µl'si birinci sıra tüplere dağıtıldı ve ikinci tüpten başlayarak her seferinde 3-5 kez emip bırakmak sretiyle karıştırarak, tüpten tüpe 500 µl aktarmak sretiyle seri dilüsyon yapıldı. Daha önce biofilm oluşturduğu saptanan ve MİK değerleri çalışılmış olan 10 P.aeruginosa suşu, bir gece öncesinden kanlı agarda hazırlanan taze kültürlerinden, bulanıklık 0,5 McFarland olacak Şekilde MHB içeren tüplere alınarak süspansiyon hazırlandı ve bu süspansiyonun 500 µl'si, konsantrasyonu $1,5 \times 10^6$ CFU/ml olacak Şekilde dile edilerek tüplere dağıtıldı. Antibiyotiksiz ortamda biofilm oluşturan bakterilerin alginat üretimini gözlemek amacıyla her suş için hazırlanan süspansiyonun 1000 µl'si ayrı bir tüpe alındı. Kontrol amacıyla her suş için tüm işlemler üçer kez tekrarlandı. Ayrıca negatif kontrol olarak, içerisinde bakteri süspansiyonu yerine serum fizyolojik kullanılan

tüpler hazırlandı. Hazırlanan tüm tüpler 37°C de aerop ortamda inkübe edildi. Süre sonunda tüpler etüvden çıkartılarak MHB içerisindeki bakteri süspansiyonundan alginat üretimi, daha önce tanımlandığı şekilde saptandı (81,82,83). MİK/2, MİK/4, MİK/8 konsantrasyonlarda alginat üretimi, antibiyotiksiz koşullardaki alginat üretimi ile karşılaştırıldı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

SPSS 11,0 versiyonu kullanarak; çalışmanın genel verilerinin değerlendirilmesinde ki-kare, yöntemlerin uyumu için spearman ve kappa uyum analiz testleri; antibiyotiklerin biofilm oluşumuna ve alginat üretimine etkilerinin değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis, Bonferroni ve Wilcoxon w analiz testleri kullanılmıştır (p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir).

BULGULAR

Çalışma kapsamına çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 148 P.aeruginosa suşu dahil edildi. Bu suşların 57 tanesi trakeal aspirat örneklerinden (%38,5), 31 tanesi idrar örneklerinden (%20,9), 29 tanesi yara örneklerinden (%19,6), 11 tanesi balgam örneklerinden (%7,4) ve kalan 17 tanesi de (%11,4) çeşitli klinik örneklerden (kan, sürüntü, göz, vb.) izole edildi. Kontrol suşu olarak P.aeruginosa ATCC 27853 kullanıldı.

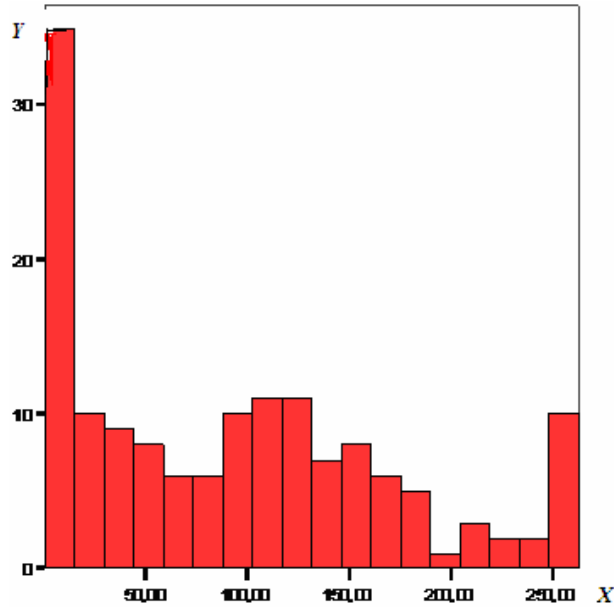
BİOFİLM OLUŞUMU

Çalışılan suşların biofilm oluşturma durumları, kristal viole ve safranin olmak üzere iki farklı boyar madde kullanılarak, 24 ve 48 saatlik ölçümler yapılarak değerlendirildi. Sonuçlar, kontrol suşu olarak kullanılan P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbans değeri esas alınarak, diğer suşlardan elde edilen absorbans değerlerinin bu değere oranlanması şeklinde yorumlandı.

Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri sonrasında, suşların 58 tanesi (%40), ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 23 tanesi (%15,9), %50-%100'ü arasında, 32 tanesi (%21,4), %100-%150'si arasında, 18 tanesi (%12,1), %150-%200'ü arasında, 17 tanesi de (%11,4), %200'ünden yüksek absorbans verdi (Tablo-1, Şekil-8).

Tablo 1: Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%)

ATCC'ye göre % oranı	Biofilm üreten suş sayısı	Biofilm üreten suşların yüzdesi (%)
0-25	42	29,3
26-50	16	10,7
51-75	9	6,0
76-100	14	9,3
101-125	19	12,5
126-150	13	8,7
151-175	13	8,7
176-200	5	3,4
201-225	5	3,4
226>	12	8,0
Toplam	148	100,0

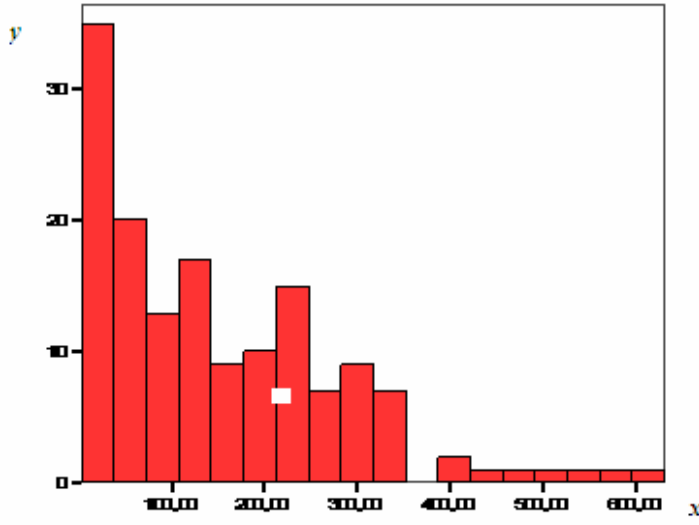


Şekil 8: Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%) (x= P.aeruginosa ATCC 27853'e göre yüzdelik oranları, y=suş sayısı)

Safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri sonrasında, suşların 42 tanesi (%29), P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 19 tanesi (%11), %50-%100'ü arasında, 25 tanesi (%17), %100-%150'si arasında, 14 tanesi (%9), %150-%200'ü arasında, 17 tanesi (%11), %200-%250'si arasında, 11 tanesi (%8), %250-%300'ü arasında ve 20 tanesi de (%13), %300'ünden yüksek absorbans verdi (Tablo 2, Şekil 9).

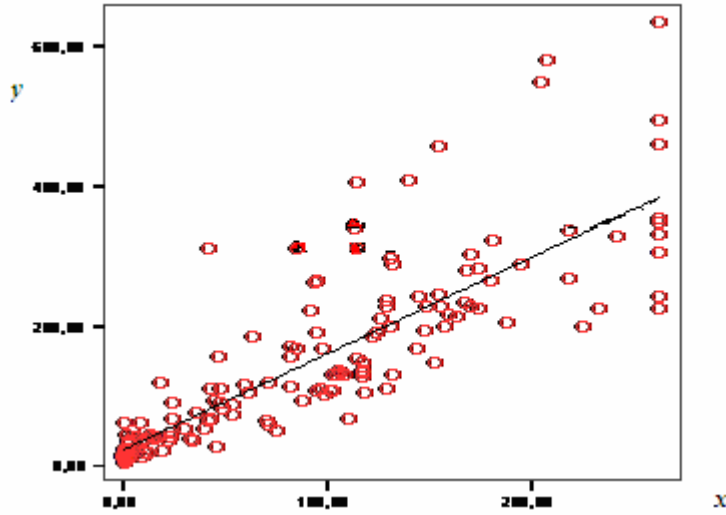
Tablo 2: Safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%)

ATCC'ye göre % oranı	Biofilm üreten suş sayısı	Biofilm üreten suşların yüzdesi (%)
0-25	23	18,7
26-50	19	12,6
51-75	12	6,0
76-100	7	4,7
101-125	14	9,3
126-150	11	7,4
151-175	6	4,0
176-200	8	5,3
201-225	8	5,3
226>	40	26,7
Toplam	148	100,0



Şekil 9: Safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%) (x= P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları, y=suş sayısı).

Safranin ve kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri, istatistiksel olarak yapılan korelasyon testleriyle birbirleriyle uyumlu bulundu (% safranin 24 saat= $23,61 + 1,37 \times$ % kristal viole24 saat " $r^2=0.7$ ") (Şekil 10).

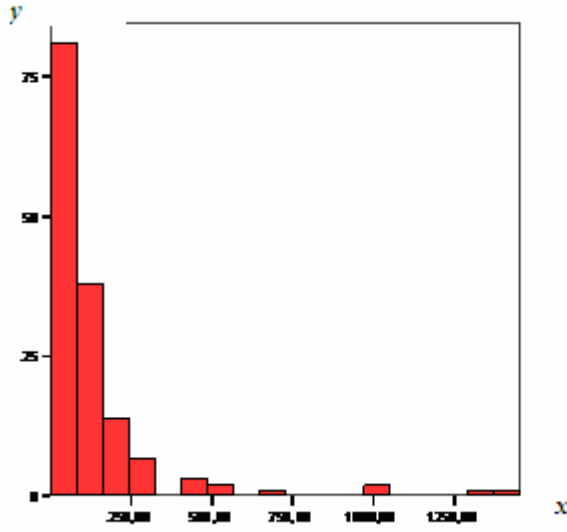


Şekil 10: 24 saatlik biofilm ölçümlerinin karşılaştırmalı regresyon eğrisi (x= Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranı, y= safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranı).

Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümleri sonrasında, suşların 57 tanesinin (%39,3), *P.aeruginosa* ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 35 tanesi (%23,4), %50-%100'ü arasında, 23 tanesi (%15,3), %100-%150'si arasında, 12 tanesi (%8), %150-%200'ü arasında, 7 tanesi (%4,7), %200-%250 arasında ve 14 tanesi de (%9,3), %250'sinden yüksek absorbans verdi. 56 suş ATCC 27853'ün %100'ünden fazla absorbans verdi (Tablo 3, Şekil 11).

Tablo 3: Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e göre oranları (%)

ATCC'ye göre % oranı	Biofilm üreten suş sayısı	Biofilm üreten suşların yüzdesi
0-25	29	20,7
26-50	28	18,6
51-75	16	10,7
76-100	19	12,7
101-125	14	9,3
126-150	9	6,0
151-175	4	2,7
176-200	8	5,3
201-225	4	2,7
226-250	3	2,0
251>	14	9,3
Toplam	148	100

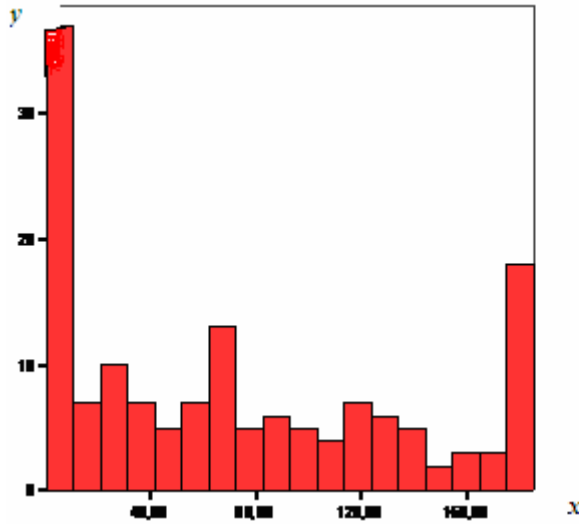


Şekil 11: Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%) (x=safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absobans ölçümlerinin P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbans değerine oranları, y=suş sayısı).

Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm ölçümleri sonrasında, suşların 64 tanesinin (%44), ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 34 tanesi (%22,7), %50-%100'ü arasında, 25 tanesi (%16,6), %100-%150'si arasında, 25 tanesi (%16,6), %150-%200'ü arasında absorbans verdi. 50 suş, ATCC 27853'ün %100'ünden fazla absorbans verdi (Tablo 4, Şekil 12).

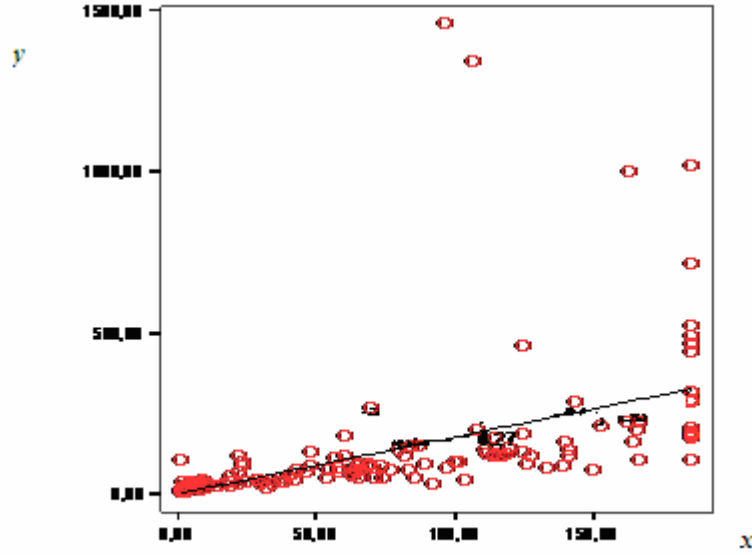
Tablo 4: Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%)

ATCC'ye göre % oranı	Biofilm üreten suş sayısı	Biofilm üreten suşların yüzdesi
0-25	48	33,3
26-50	16	10,7
51-75	22	14,7
76-100	12	8,0
101-125	15	10,0
126-150	10	6,6
151-175	7	4,7
176-200	18	12,0
Toplam	148	100,0



Şekil 12: Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre oranları (%) (x= Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbansa oranları, y= suş sayısı).

Safranin ve kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm ölçümleri, istatistiksel olarak yapılan korelasyon testleriyle birbirleriyle uyumlu bulundu (% safranin 48 saat= 3,58 + 1,76 x % kristal viole 48 saat “ $r^2=0,886$ ”) (Şekil 13).



Şekil 13: 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin karşılaştırmalı regresyon eğrisi (x= Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik absorbans ölçümlerinin *P.aeruginosa* ATCC 27853’den elde edilen absorbans değerine oranları, y= safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin *P.aeruginosa* ATCC 27853’den elde edilen absorbans değerine oranları).

P.aeruginosa ATCC 27853’den elde edilen absorbans değeri esas alınarak, bu değerin üzerinde tesbit edilen bütün ölçümler pozitif olarak kabul edildiğinde, kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik ölçümler sonrasında suşların 67 tanesi (%45) kuvvetli biofilm oluştururken, 81 tanesi (%55) düşük düzeyde biofilm oluşturdu. Safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde ise suşların 87 tanesi kuvvetli (%58,4) biofilm oluştururken, 61 tanesinin (%41,6) düşük düzeyde biofilm oluşturduğu tesbit edildi. Safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde, 21 tane suş (%25,6) biofilm üretimi açısından kuvvetli pozitif olarak tesbit edilmesine

rağmen, bu suşlar kristal viole kullanılarak yapılan ölçümlerde düşük düzeyde tesbit edildi. 66 suş (%75,9) her iki yöntemle de pozitif olarak bulundu. Safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde negatif olarak saptanan sadece 1 suş, kristal viole kullanılarak yapılan ölçümlerde pozitif olarak tesbit edildi (Tablo 5). 24 saatlik biofilm üretimi bakımından her iki yöntem karşılaştırıldığında aralarındaki uyum anlamlı bulundu ($p=0,001$).

Tablo 5: Kristal viole ve safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin karşılaştırılması

Safranin kullanılan 24 saatlik ölçüm	Kristal Viole kullanılan 24 saatlik ölçüm		Toplam n %
	Zayıf biofilm	Kuvvetli biofilm	
Zayıf biofilm	60 (%41,0)	1 (%0,5)	61 (%41,5)
Kuvvetli biofilm	21 (%14,0)	66 (%44,5)	87 (%58,5)
Toplam n (%)	81 (%55,0)	67 (%45,0)	148 (%100)

Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonrasında 49 suş (%33) biofilm üretimi açısından kuvvetli pozitif olarak tespit edilirken, 99 suş (%67) zayıf olarak tesbit edildi. Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonrasında ise 56 suş (%38) kuvvetli pozitif, 92 suş (%62) zayıf olarak tesbit edildi. Kristal viole kullanılarak yapılan ölçümler sonrasında zayıf olarak saptanan 12 tane suş safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde kuvvetli pozitif olarak tesbit edilirken; 5 tane suş da kristal viole ile kuvvetli pozitif olarak tesbit edilirken, safranin ile yapılan ölçümler sonrasında zayıf olarak saptandı (Tablo 6). 48 saatlik biofilm üretimi bakımından her iki yöntem karşılaştırıldığında aralarındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=<0,001$).

Tablo 6: Kristal viole ve safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin karşılaştırılması

Safranin kullanılan 48 saatlik ölçüm	Kristal viole kullanılan 48 saatlik ölçüm		Toplam n %
	Zayıf biofilm	Kuvvetli biofilm	
Zayıf biofilm	87 (%59,0)	5 (%3,0)	92 (%62)
Kuvvetli biofilm	12 (%8,0)	44 (%30,0)	56 (%38)
Toplam n (%)	99 (%67,0)	49 (%33,0)	148 (%100)

Kristal viole kullanılarak yapılan 24 ve 48 saatlik ölçümler karşılaştırıldığı zaman suşlardan 69 tanesi (%47) her iki zamanda da zayıf biofilm oluşturdular. 12 suş (%8) 24 saatte zayıf biofilm oluşturmalarına rağmen, 48 saat sonunda kuvvetli biofilm oluşturdıkları tesbit edildi. Bunun aksine 29 (%19) tane suş da 24 saatte kuvvetli biofilm oluştururken süre 48 saate uzatıldığında biofilm oluşturma oranları zayıfladı. 38 tane suş (%26) hem 24 saat hem de 48 saatlik ölçümler sonrasında kuvvetli biofilm oluşturdular (Tablo 7). Biofilm oluşturma açısından 24 ve 48 saatlik değerler birbirleriyle karşılaştırıldıklarında aradaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,001$).

Tablo 7: Kristal viole kullanılarak yapılan 24 ve 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin karşılaştırılması

Kristal viole kullanılan 24 saatlik ölçüm	Kristal viole kullanılan 48 saatlik ölçüm		Toplam n %
	Zayıf biofilm	Kuvvetli biofilm	
Zayıf biofilm	69 (% 47,0)	12 (%8,0)	81 (%55,0)
Kuvvetli biofilm	29 (% 19,0)	38 (%26,0)	67 (%45,0)
Toplam n (%)	98 (% 66,0)	50 (%34,0)	148 (%100,0)

Safranin kullanılarak yapılan 24 ve 48 saatlik ölçümler karşılaştırıldığı zaman ise suşlardan 51 tanesi (%35) her iki zamanda da zayıf biofilm oluşturdular. 10 suş (%7) 24 saatte zayıf biofilm oluşturmalarına rağmen, 48 saatin sonunda kuvvetli biofilm oluşturdu. Bunun aksine 40 (%27) tane suş da 24 saatte kuvvetli biofilm oluştururken 48 saat sonunda biofilm oluşturma oranları zayıfladı. 47 tane suş (%31) hem 24 saat hem de 48 saatlik ölçümler sonrasında kuvvetli biofilm oluşturdular (Tablo 8). Biofilm oluşturma açısından 24 ve 48 saatlik değerler birbirleriyle karşılaştırıldıklarında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$).

Tablo 8: Safranin kullanılarak yapılan 24 ve 48 saatlik biofilm absorbans ölçümlerinin karşılaştırılması

Safranin kullanılan 24 saatlik ölçüm	Safranin kullanılan 48 saatlik ölçüm		Toplam	
	Biofilm zayıf	Biofilm kuvvetli	n	%
Zayıf biofilm	51 (% 35,0)	10 (%7,0)	61	(%42,0)
Kuvvetli biofilm	40 (% 27,0)	47 (%31,0)	87	(%58,0)
Toplam n (%)	91 (% 62,0)	57 (%38,0)	148	(%100,0)

Biofilm oluşumu ve örneklerin izole edildiği bölgeler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; çalışma kapsamına alınan yara örneklerinin 24 saatlik ölçümlerde, kristal viole kullanarak %65,5' i ATCC 27853'den fazla biofilm oluştururken, safranin kullanarak bu oran %72,4 bulundu. 48 saatlik yapılan ölçümlerde ise, kristal viole kullanılarak bu oran %31,0'a, safranin kullanılarak ise %34,4'e düştü. Balgam örneklerinde ise kristal viole kullanarak yapılan 24 saatlik ölçümlerde %63,6'lık bir pozitiflik saptanırken, safranin kullanılarak bu değer %72,2 bulundu. Kristal viole ve safranin kullanarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonucunda ise sırasıyla %54,5 ve %63,6 oranında pozitiflik saptandı. Çalışma kapsamına dahil edilen en kalabalık grup olan trakeal aspirat örneklerde ise, 24 saatlik yapılan safranin ölçümlerinde %38,9 pozitiflik saptanırken, kristal

viole kullanılan ölçümlerde %27,1 pozitiflik saptandı. Kristal viole ve safranin kullanılan 48 saatlik ölçümlerde sırasıyla %25,4 ve %30,5 pozitif değerler elde edildi (Tablo 9). Biofilm oluşumu açısından örnek alınan bölgeler karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulundu (p=0,10).

Tablo 9: Örneklerin alındığı bölgelerle biofilm üretiminin ilişkisi

ATCC'ye göre biofilm oluşumu	Trakea		Balgam		İdrar		Yara		Diğer	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Kristal viole 24 saat kuvvetli	16	27,1	7	63,6	13	46,4	19	65,5	10	58,8
	43	72,9	4	36,4	15	53,6	10	34,5	7	41,2
Safranin 24 saat kuvvetli	23	38,9	8	72,7	16	57,1	21	72,4	13	76,4
	36	61,1	3	27,2	12	42,9	8	27,6	4	23,6
Kristal viole 48 saat kuvvetli	15	25,4	6	54,5	12	42,9	9	31,0	3	17,6
	44	74,6	5	45,5	16	57,1	20	69,0	14	82,4
Safranin 48 saat kuvvetli	18	30,5	7	63,6	14	50,0	10	34,4	6	35,2
	41	69,5	4	36,4	14	50,0	19	65,6	11	64,8

2-Biofilm üretimi ve antibiyotik duyarlılıkları:

Biofilm üretimleri ve disk difüzyon yöntemiyle tespit edilen antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki Tablo 10'da gösterilmiştir.

Çeşitli klinik örneklerden elde edilen 148 suşun, hem kristal viole hem safranin kullanılarak tespit edilen 24 saatlik biofilm ölçümleriyle, antipseudomonal etkinliği olan 12 antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemiyle

tesbit edilen direnç durumları karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlam bulunamadı. Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümlerde, biofilm üretimi ve gentamisine karşı gelişen direnç arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,001$). Benzer şekilde safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonrasında da gentamisin direnci ve biofilm üretimi arasındaki ilişki anlamlı bulundu ($p=0,002$). Diğer antibiyotiklere karşı gelişen direnç ile biofilm üretimleri arasında ilişki saptanamadı.

Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm ölçümlerinde, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e oranla daha fazla biofilm ürettiği saptanan 56 (%37,8) *P.aeruginosa* suşunun 33 tanesinin (%58,9) gentamisine dirençli, 23 (%41,1) tanesinin de duyarlı olduğu saptandı. *P.aeruginosa* ATCC 27853'e oranla daha az biofilm oluşturan 91 (%65,2) suşun ise 29 (%31,8) tanesi gentamisine dirençliyken, 62 (%68,2) tanesi duyarlıydı. Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümlerde ise, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e oranla daha fazla biofilm üreten 50 (%33,7) *P.aeruginosa* suşunun 30 (%60) tanesi gentamisine dirençliyken, 20 (%40) tanesi duyarlıydı. *P.aeruginosa* ATCC 27853'e oranla daha az biofilm oluşturan 98 (%66,3) suşun ise 32 tanesi (%32,6) gentamisine dirençliyken, 66 tanesi (%67,4) ise duyarlıydı.

Tablo 10: Biofilm üretimleri ve disk difüzyon yöntemiyle tespit edilen antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki

ATCC'ye göre biofilm oluşumu		Safranin 24 saat		Kristal V. 24 saat		Safranin 48 saat		Kristal V. 24saat	
		Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok
Pip	D	65	36	50	51	44	57	40	61
	R	21	26	17	30	12	34	10	37
Gn	D	53	33	41	45	23	62	20	66
	R	33	29	26	36	33	29	30	32
Caz	D	59	27	44	42	33	52	31	55
	R	27	35	23	39	23	39	19	43
Cfp	D	40	22	28	34	24	37	23	39
	R	46	40	39	47	33	54	27	59
Fep	D	51	32	41	42	34	48	32	51
	R	35	30	26	39	22	43	18	47
İmp	D	69	41	54	56	45	64	32	66
	R	17	21	13	25	11	27	24	25
Ak	D	61	38	46	53	32	66	28	71
	R	25	24	21	28	24	25	22	27
Tob	D	61	28	46	43	33	55	32	57
	R	25	34	22	38	23	36	18	41
Cip	D	67	36	51	52	40	62	37	66
	R	19	26	16	29	16	29	13	32
Atm	D	62	40	47	55	34	67	30	72
	R	24	22	20	26	22	24	20	26
Tzp	D	63	40	49	54	43	59	39	64
	R	23	22	18	27	13	32	11	34

(Pip= piperasilin, Gn= gentamisin, Caz= seftazidim, Cfp= sefaperazon, Fep= sefepim, İmp= imipenem, Ak= amikasin, Tob= tobramisin, Cip= siprofloksasin, Atm= azitromisin, Tzp=tazobaktam, D= duyarlı, R= dirençli, Kristal V.= Kristal viole)

3-Çalışılan antibiyotiklerin (ciprofloksasin, moksifloksasin, levofloksasin) sub MİK konsantrasyonlarında biofilm oluşumu:

Çalışma kapsamına dahil edilen, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e göre iyi biofilm oluşturduğu tespit edilen 10 suşun MİK değerleri, standart dilüsyon yöntemiyle, ciprofloksasin için 0,5-16 µg/ml, levofloksasin için 2-16 µg/ml, moksifloksasin için ise 4-16 µg/ml aralığında saptandı.

MİK/2, MİK/4, MİK/8 konsantrasyonlarda antibiyotik içeren tüplerdeki biofilm oluşumu, 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonrasında, kristal viole kullanılarak saptanan absorbans değerleri Tablo 11’de gösterilmiştir. Çalışma sonucunda her 3 antibiyotiğin de, sub MİK konsantrasyonlarda, antibiyotiksiz durum ile karşılaştırıldığında, biofilm yapımını doz bağımlı olarak azalttığı gösterildi. 10 suş için bulunan absorbans değerlerinin ortalamasına bakıldığı zaman, 24 saat için ciprofloksasinin MİK/2 konsantrasyonda, kontrol olarak kullanılan antibiyotiksiz tüpün %18,5’i kadar, MİK/4 konsantrasyonda %39,0’ı kadar, MİK/8 konsantrasyonda ise %52,3’ü kadar absorbans verdiği saptandı. Levofloksasin, MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %23,3’ü kadar, MİK/4 konsantrasyonda %31,2’si kadar, MİK/8 konsantrasyonda %49,2’si kadar absorbans verdi. Moksifloksasin ise MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %43,0’ı kadar, MİK/4 konsantrasyonda %61,2’si kadar, MİK/8 konsantrasyonda %80,6’sı kadar absorbans verdiği bulundu. 48 saatlik antibiyotik uygulaması sonrasında sonuçlar değerlendirildiği zaman ise, 10 suş için ortalama olarak ciprofloksasin MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %31,0’ı kadar, MİK/4 konsantrasyonda %49,7’si kadar, MİK/8 konsantrasyonda %55,0’ı kadar absorbans verdi. Levofloksasin MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %42,0’ı kadar, MİK/4 konsantrasyonda %56,7’si kadar, MİK/8 konsantrasyonda ise %64,8’i kadar absorbans verdi. Moksifloksasin ise MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %49,8’i kadar, MİK/4 konsantrasyonda %63,0’ı kadar, MİK/8 konsantrasyonda ise %90,0’ı kadar absorbans verdi. 24 ve 48 saatlik antibiyotik uygulamaları sonrasında elde edilen ortalama absorbanslar değerlendirildiği zaman, 48 saatlik değerlerin her 3 antibiyotikte ve tüm dozlarda 24 saatlik değerlerden yüksek olduğu saptandı. Absorbans ölçümü yapılan her iki zamanda da, ciprofloksasin MİK/2 konsantrasyonda, biofilm oluşumunu en etkin olarak azaltan antibiyotik olmuştur. Moksifloksasin ise çalışmaya dahil edilen 3 kinolon arasında, her iki zamanda da, sub MİK konsantrasyonlarda biofilm yapımına en az etkili antibiyotik olduğu gösterildi. Çalışmanın sonuçları, farklı zamanlarda yapılan 3 tekrar ile doğrulandı.

3 antibiyotiğin, MİK/2-MİK/4 konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonucunda, biofilm gelişimi üzerine etkileri karşılaştırıldığı zaman aradaki fark anlamlı bulundu ($p=0,032$). Benzer şekilde MİK/4-MİK/8 ($p=0,012$) ve MİK/2-MİK/8 ($p=<0,01$) konsantrasyonlarda 24 saat uygulama sonucunda biofilm gelişimi üzerine etkiler karşılaştırıldığı zaman da, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 48 saat sonunda ise, MİK/2 konsantrasyonda antibiyotik uygulamalarının biofilm gelişimi üzerine etkisi ile MİK/8 konsantrasyonda antibiyotik uygulamalarının biofilm gelişimi üzerine etkisi karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunurken ($p=<0,001$), MİK/4-MİK/8 ($p=0,296$) ve MİK/2-MİK/4 ($p=0,073$) konsantrasyonlarda antibiyotik uygulamalarının biofilm gelişimi üzerine etkileri arasındaki fark anlamsız bulundu.

24 saat antibiyotik uygulaması sonrasında, MİK/2, MİK/4 konsantrasyonlarda, biofilm oluşumuna etki açısından antibiyotikler arasındaki ilişkiye bakıldığı zaman, ciprofloksasin ve levofloksasin arasındaki fark anlamsız bulunurken ($p=0,278$) , bu iki antibiyotiğin moksifloksasin ile olan farkı anlamlıydı ($p=0,022$). MİK/8 konsantrasyonda ise antibiyotikler arasında var olan fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (Tablo 11).

48 saat sonunda ise, antibiyotiklerin MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarda, biofilm oluşumuna etki açısından bakıldığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (Tablo 12).

Tablo 11: Sub MİK dozlarda 24 saat uygulanan antibiyotiklerin biofilm oluşumuna etkisi

		MİK	MİK/2		MİK/4		MİK/8		Aby'siz
		µg/ml	abs	(%)	abs	(%)	abs	%	abs
Suş1	Cip	1	.033	1,5	.980	45,5	1.351	62,8	2.270
	Mok	16	.359	16,6	.895	41,6	1.619	75,3	2.045
	Lev	2	.338	15,7	.533	24,7	.751	34,9	2.137
Suş2	Cip	2	.064	4,4	.212	14,6	.237	16,3	1.418
	Mok	16	.417	28,7	.873	60,2	1.145	79,0	1.455
	Lev	8	.239	16,5	.337	23,2	1.058	73,0	1.473
Suş3	Cip	2	.183	10,0	.369	20,1	.956	52,2	1.974
	Mok	8	.401	21,9	.733	40,0	1.028	56,2	1.515
	Lev	4	.259	14,1	.434	23,7	.931	50,9	1.997
Suş4	Cip	1	.356	67,0	.469	88,3	.532	100,0	.538
	Mok	16	.359	67,6	.530	99,8	.514	96,7	.546
	Lev	2	.259	48,7	.260	48,9	.254	47,8	.510
Suş5	Cip	0.5	.014	2,1	.537	83,3	.654	101,0	.597
	Mok	16	.541	84,0	.731	113,0	.753	116,0	.738
	Lev	4	.102	15,8	.106	16,4	.113	17,5	.597
Suş6	Cip	1	.273	24,8	.340	30,9	.342	31,1	1.134
	Mok	8	.540	49,1	.650	59,1	.758	69,0	1.038
	Lev	2	.339	30,8	.342	31,1	.356	32,4	1.122
Suş7	Cip	4	.256	33,9	.300	39,8	.392	52,0	.735
	Mok	4	.311	41,3	.336	44,6	.450	59,7	.748
	Lev	4	.256	33,9	.360	47,8	.409	54,3	.776
Suş8	Cip	1	.200	21,2	.327	34,7	.400	42,5	.909
	Mok	16	.471	50,0	.486	51,7	1.186	126,0	1.011
	Lev	8	.131	13,9	.204	21,7	.288	30,6	.900
Suş9	Cip	0.5	.142	17,7	.149	18,5	.350	43,6	.815
	Mok	16	.283	35,2	.429	53,4	.763	95,0	.799
	Lev	16	.150	18,7	.170	21,1	.379	47,2	.793
Suş10	Cip	16	.150	9,7	.232	15,1	.339	22,0	1.508
	Mok	8	.555	36,1	.645	41,9	.722	47,0	1.406
	Lev	16	.391	25,4	.823	53,5	.895	58,0	1.696

*%’lik değerler, sub MİK konsantrasyonlarda elde edilen absorbans değerlerinin, antibiyotiksiz durumda elde edilen ortalama absorbans değerine oranlanmasıyla elde edilmiştir.

* Aby’siz= antibiyotiksiz, Cip= ciprofloksasin, Mok= moksifloksasin, Lev= levofloksasin

Tablo 12: sub MİK dozlarda 48 saat uygulanan antibiyotiklerin biofilm oluşumuna etkisi

		mik	Mik/2		Mik/4		Mik/8		Aby'siz abs
		µg/ml	abs	%	abs	%	abs	%	
Suş1	Cip	1	.387	29,3	1.057	80,2	1.110	84,2	1.741
	Mox	16	.381	28,9	1.107	84,0	1.700	129,0	1.200
	Lev	2	.465	35,3	.603	45,7	.727	55,2	1.010
Suş2	Cip	2	.250	26,3	.598	63,1	.965	101,9	.909
	Mox	16	.617	65,1	.655	69,1	1.062	112,0	.982
	Lev	8	.387	40,8	.658	69,4	.849	89,6	.950
Suş3	Cip	2	.104	8,4	.247	20,1	.364	29,6	1.260
	Mox	8	.219	17,8	.279	22,7	.391	83,8	1.150
	Lev	4	.229	18,6	.250	20,3	.259	21,1	1.270
Suş4	Cip	1	.205	45,6	.232	51,6	.241	53,6	.460
	Mox	16	.220	48,9	.245	62,1	.432	73,9	.432
	Lev	2	.219	48,7	.154	34,2	.191	42,5	.456
Suş5	Cip	0.5	.164	30,2	.217	39,9	.321	59,0	.540
	Mox	16	.332	61,1	.375	69,0	.501	92,2	.550
	Lev	4	.224	41,2	.250	46,0	.276	50,8	.540
Suş6	Cip	1	.143	19,6	.249	34,2	.374	51,5	.603
	Mox	8	.250	34,4	.373	51,3	.610	84,0	.892
	Lev	2	.204	28,0	.225	30,9	.307	42,2	.683
Suş7	Cip	4	.163	26,9	.351	58,0	.358	59,1	.608
	Mox	4	.262	43,3	.406	67,1	.454	75,0	.598
	Lev	4	.232	38,3	.385	63,6	.391	64,6	.610
Suş8	Cip	1	.212	38,1	.367	66,0	.400	71,9	.557
	Mox	16	.355	63,8	.398	71,5	.542	97,4	.566
	Lev	8	.254	45,6	.353	63,8	.397	71,4	.545
Suş9	Cip	0.5	.256	57,5	.377	84,7	.398	89,4	.423
	Mox	16	.338	75,9	.396	88,9	.406	91,2	.464
	Lev	16	.277	62,2	.355	79,7	.378	84,9	.450
Suş10	Cip	16	.420	30,0	.634	45,4	.744	53,2	1.490
	Mox	8	.832	59,5	1.162	83,2	1.220	87,3	1.487
	Lev	16	.429	30,7	.567	40,6	.676	48,4	1.212

*%’lik değerler, sub MİK konsantrasyonlarda elde edilen absorbans değerlerinin, antibiyotiksiz durumda elde edilen ortalama absorbans değerine oranlanmasıyla elde edilmiştir

* Aby’siz= antibiyotiksiz, Cip= ciprofloksasin, Mok= moksifloksasin, Lev= levofloksasin

4-Çalışılan antibiyotiklerin (cipfloksasin, moksifloksasin, levofloksasin), oluşmuş olan biofilm üzerine etkileri:

Biofilm oluşturmuş bakteriler üzerine kinolon grubu 3 antibiyotiğin etkinliği, daha önceden tarif edildiği şekilde, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre iyi biofilm oluşturduğu tespit edilen 6 P.aeruginosa suşu ve %50-%100'ü arasında biofilm oluşturan 4 suş olmak üzere toplam 10 P.aeruginosa suşu kullanılarak denendi. Elde edilen BİK değerleri ve aynı suşların MİK değerlerinin karşılaştırması Tablo13'de gösterilmiştir. Buna göre 10 suş için, cipfloksasinin ortalama MİK değeri 2,9 µg/ml bulunurken, ortalama BİK değeri %34,5'luk bir artış göstererek 3,9 µg/ml bulundu. Levofloksasinin ortalama MİK değeri 6,6 µg/ml bulunurken, BİK değeri %130'luk bir artışla 15,2 µg/ml bulundu. Moksifloksasinin ortalama MİK değeri ise 12,4 µg/ml bulunurken, BİK değeri %161'lik artışla 32,4 µg/ml bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda, denenen kinolon grubu antibiyotikler arasında, biofilm üzerine en etkili olanı cipfloksasin olurken, en az etkili olanın ise moksifloksasin olduğu saptandı.

Tablo 13: Antibiyotiklerin BİK-MİK değerlerinin karşılaştırılması

örnek	MİK(µg/ml)			BİK(µg/ml)		
	CIP	MOK	LEV	CIP	MOK	LEV
Suş-1	1	16	2	4	64	16
Suş-2	2	16	8	4	32	8
Suş-3	2	8	4	2	32	8
Suş-4	1	16	2	2	16	4
Suş-5	0.5	16	4	0.5	64	4
Suş-6	1	8	2	1	16	4
Suş-7	4	4	4	8	4	16
Suş-8	1	16	8	1	32	32
Suş-9	0.5	16	16	0.5	32	16
Suş-10	16	8	16	16	32	32

*Cip= cipfloksasin, Mok= moksifloksasin, Lev= levofloksasin

5-Alginate üretimi:

Alginate üretimi, üronik asitin karbazol kullanılarak tesbiti esasına göre, kullanılan mikroplâtelere 100 °C ısıya dayanamaması sebebiyle, mikroplâte yönteminin tüpe uyarlanması şeklinde, spektrofotometrik absorbans ölçümü yapılarak saptandı. Sonuçlar, kontrol suşu olarak kullanılan *P.aeruginosa* ATCC 27853'den elde edilen absorbans değeri esas alınarak, diğer suşlardan elde edilen absorbans değerlerinin bu değere oranlanması şeklinde yorumlandı. Buna göre çalışma kapsamına alınan 148 *P.aeruginosa* suşunun 13 tanesi ATCC 27853'den elde edilen absorbans değerinin %50'si ve altında, 41 tanesi %50-%100'ü arasında, 35 tanesi %100-%150'si arasında ve kalan 59 tanesi de %150'sinden fazla absorbans verdi (Tablo 14).

Tablo 14: Alginate üretiminin *P.aeruginosa* ATCC 27853 'e göre yüzdelik oranları

ATCC'ye göre % oranı	Alginate üreten suş sayısı	Alginate üreten suşların yüzdesi
0-25	3	2,0
26-50	10	6,7
51-75	15	10,0
76-100	26	18,0
101-125	17	11,3
126-150	18	12,0
151-175	11	7,0
176-200	20	13,4
201-225	6	4,0
226-250	6	4,0
251>	16	11,6
Toplam	148	100,0

Standartlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre 148 *P.aeruginosa* suşunun 24 saat sonunda ürettiği alginate, µg/ml cinsinden hesaplandı. Bulunan alginate konsantrasyonları 0,4-6,9 µg/ml aralığındaydı (ortanca=1,5 µg/ml).

P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen alginat konsantrasyon değeri esas alınarak, bu konsantrasyonun üzerindeki değerler kuvvetli pozitif olarak kabul edildiğinde, 148 P.aeruginosa suşunun 95 tanesinin (%64) kuvvetli alginat ürettiği, kalan 53 suşun (%36) zayıf alginat ürettiği saptandı.

Biofilm oluşturma oranları ve alginat üretimleri arasında ilişki karşılaştırıldığı zaman, kristal viole kullanılarak yapılan ölçümlerle 148 P.aeruginosa suşunun 66 tanesinin (%45) ATCC 27853'ye göre daha fazla biofilm ürettiği, 82 tanesinin (%55) daha az ürettiği saptandı. P.aeruginosa ATCC 27853'ye oranla daha fazla biofilm oluşturan 66 suşun 51 tanesi (%77) kuvvetli alginat üretirken, 15 tanesinin (%23) zayıf alginat ürettiği saptandı. P.aeruginosa ATCC 27853'ye oranla daha az biofilm oluşturan 82 suşun ise 45 tanesi (%55) kuvvetli alginat üretirken 37 tanesi (%45), ATCC 27853'den daha az alginat üretti (Tablo 15). Kristal viole kullanılarak saptanan 24 saatlik biofilm oranları ile alginat üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,007$).

Safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde 148 suşun 86 tanesinin (%58) ATCC 27853'ye göre daha fazla biofilm oluşturduğu, kalan 62 tanesinin (%42) ise daha az oluşturduğu saptandı. Biofilm oluşturan 86 suşun 62 tanesinin (%72) kuvvetli alginat ürettiği, 24 tanesinin (%28) zayıf alginat ürettiği saptandı. ATCC 27853'e kıyasla daha az biofilm oluşturan 62 suşun ise 33 tanesi (%53) kuvvetli alginat üretirken 29 tanesi (%47) zayıf alginat üretti (Tablo 15). Safranin kullanılarak yapılan biofilm ölçümleriyle alginat üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,016$).

Tablo 15: Safranin ve kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm absorbans ölçümleriyle alginat üretiminin karşılaştırılması

ATCC'ye göre biofilm üretimi		ATCC'ye göre alginat üretimi zayıf		ATCC'ye göre alginat üretimi kuvvetli	
		n	(%)	n	(%)
Kristal viole 24 saat	kuvvetli	15	(10)	51	(35)
	zayıf	37	(25)	45	(30)
Safranin 24 saat	kuvvetli	24	(16)	62	(42)
	zayıf	29	(20)	33	(22)

Alginat oluşturma oranlarıyla, antibiyotik duyarlılıkları arasında ilişki Tablo 16'da gösterilmiştir. Buna göre antipseudomonal etkinliği olan 13 antibiyotiğe direnç ile alginat üretimi arasında istatistiksel bir anlam bulunamadı. Biofilm oluşturma oranları ve antibiyotik direnci arasında ilişki bulunan tek antibiyotik olan amikaside, duyarlı olan 88 suşun 60 tanesi (%68) P.aeruginosa ATCC 27853'e göre daha fazla alginat oluştururken, 28 tanesi ise (%32) daha az alginat oluşturdu. Amikaside dirençli olan 30 suşun ise 27 tanesi (%90) P.aeruginosa ATCC 27853'den daha fazla alginat üretirken, 13 tanesi (%10) daha az alginat üretti. Alginat üretim oranlarıyla amikasin direnci arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,86$).

Tablo 16: Alginat üretimi ile disk diffüzyon yöntemiyle elde edilen antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması (D= duyarlı, R= dirençli, TZP= tazobaktam).

Antibiyotik duyarlılığı		ATCC'ye göre Alginat üretimi fazla		ATCC'ye göre Alginat üretimi az	
		n	(%)	n	%
Piperasilin	D	57	44,5	29	22,6
	R	30	23,4	12	9,5
Seftazidim	D	54	42,1	27	21,0
	R	33	25,7	14	11,2
Sefaperazon	D	36	28,1	17	13,2
	R	51	39,8	24	18,9
Sefepim	D	48	37,5	20	15,6
	R	39	30,4	21	16,4
İmipenem	D	65	50,7	24	21,8
	R	22	17,1	13	10,4
Gentamisin	D	52	40,6	22	17,1
	R	35	27,3	19	15,0
Amikasin	D	60	46,8	28	21,8
	R	27	21,0	13	10,4
Tobramisin	D	55	42,9	24	18,9
	R	32	25,0	16	12,5
Ciprofloksasin	D	57	44,5	28	21,8
	R	30	23,4	13	10,3
Azitromisin	D	62	48,4	32	25,0
	R	25	19,5	9	7,1
TZP	D	62	48,4	25	19,5
	R	25	19,5	16	12,5
Sefotaksim	D	27	21,0	15	11,9
	R	60	46,8	26	20,3

6-Çalışılan antibiyotiklerin (ciprofloksasin, moksifloksasin, levofloksasin) sub MİK dozlarda alginat üretimine etkisi:

Çalışma kapsamına dahil edilen, P.aeruginosa ATCC 27853'e göre iyi biofilm oluşturduğu saptanmış 6 suş ve P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbans değerinin %50-%100 arasında absorbans veren 4 suşun alginat üretim oranlarının, sub MİK dozlarda antibiyotik uygulamasıyla ilişkisi Tablo 17'de gösterilmiştir. Buna göre, her 3 antibiyotiğin de, sub MİK konsantrasyonlarda alginat üretimini, antibiyotiksiz duruma göre, doz bağımlı olarak arttırdığı tespit edildi. Her 3 antibiyotik için MİK/2 konsantrasyonda elde

edilen alginat üretimi ile MİK/4 konsantrasyonda elde edilen alginat üretimi karşılaştırıldığı zaman aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,01$). Benzer şekilde MİK/4-MİK/8 ($p=0,017$) ve MİK/2-MİK/8 ($p=0,000$) konsantrasyonlarda ki alginat üretimleri de birbirleriyle karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulundu. Çalışılan 3 antibiyotiğin, her 3 konsantrasyon için de alginat üretimine etkileri karşılaştırıldığı zaman antibiyotikler arasındaki fark anlamsız bulundu ($p>0,05$). Sonuçlar, farklı zamanlarda yapılan 3 ayrı çalışma ile doğrulandı.

Tablo 17: sub MİK konsantrasyonlarda antibiyotiklerin alginat üretimine etkisi

		MİK ($\mu\text{g/ml}$)	MİK/2 alg ($\mu\text{g/ml}$)	MİK/4 alg ($\mu\text{g/ml}$)	MİK/8 alg ($\mu\text{g/ml}$)	Aby'siz alg ($\mu\text{g/ml}$)
Suş1	Cip	1	5,4	4,5	4,3	
	Mok	16	8,5	7,8	10,8	3,1
	Lev	2	10,7	7,9	7,1	
Suş2	Cip	2	5,2	2,4	2,9	
	Mok	16	10,4	5,0	5,0	2,1
	Lev	8	4,1	2,7	3,1	
Suş3	Cip	2	8,3	6,2	5,5	
	Mok	8	7,4	5,2	6,3	6,1
	Lev	4	6,6	6,9	5,6	
Suş4	Cip	1	11,1	7,8	6,5	
	Mok	16	12,7	11,6	9,5	2,8
	Lev	2	10,1	8,5	6,5	
Suş5	Cip	0,5	7,3	5,5	5,2	
	Mok	16	9,4	6,5	3,5	3,3
	Lev	4	5,0	3,3	3,9	
Suş6	Cip	1	10,0	5,9	8,0	
	Mok	8	14,9	10,3	5,0	3,2
	Lev	2	13,3	6,8	5,6	
Suş7	Cip	4	7,9	7,1	2,8	
	Mok	4	17,1	8,3	3,7	2,9
	Lev	4	10,4	7,5	3,1	
Suş8	Cip	1	13,1	7,7	2,9	
	Mok	16	6,3	5,1	5,0	1,6
	Lev	8	8,4	5,6	4,0	
Suş9	Cip	0,5	7,3	5,5	5,3	
	Mok	16	12,6	8,7	4,1	4,0
	Lev	16	8,8	7,7	5,5	
Suş10	Cip	16	5,7	5,2	4,8	
	Mok	8	10,1	9,5	8,5	2,3
	Lev	16	6,5	3,9	2,8	

* Aby'siz= antibiyotiksiz, Cip= ciprofloksasin, Mok= moksifloksasin, Lev= levofloksasi

TARTIŞMA

Doğada toprak ve sularda yaygın olarak bulunan Pseudomonaslar içinde insanlarda en sık karşılaşılan tür P.aeruginosa'dır. P.aeruginosa normal florada da bulunabilmesine rağmen, hastane dışı sağlıklı kişilerde Kolonizasyon nadirdir. Çok düşük oranlarda sağlıklı kişilerin deri, burun mukozası, boğaz ve dışkılarında kolonizasyon gözlenebilir. Hastaneye yatış kolonizasyonu belirgin oranlarda artırır, yanıklı hastaların derilerinde, mekanik vantilatöre bağlı hastaların alt solunum yollarında, antineoplastik kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sistemlerinde ve antibiyoterapi alan hastaların herhangi bir vücut bölgesinde kolonizasyon gözlenebilir. Sağlıklı hastane personelinin ellerinde de kolonizasyon olduğu ve hastalık bulaşında önemli rolü olduğu bilinmektedir (1,2,3,5,84,85).

P.aeruginosa primer olarak nosokomiyal bir patojendir. Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC-) verilerine göre ABD'de dördüncü sıklıkta rastlanan nosokomiyal patojendir. Hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unu oluştururlar. Nosokomiyal pnemonilerin başta gelen nedenidir. Nosokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının üçüncü, cerrahi yara enfeksiyonlarının beşinci ve bakteriyemilerin sekizinci en sık etkenidir. P.aeruginosanın yanık yoğun bakım ünitelerinde nosokomiyal etkenler içerisinde birinci sırayı aldığı bilinmektedir (7,86,87).

Üst solunum yollarında kolonize olan P.aeruginosa sıklıkla alt solunum yollarına ilerleyerek pnemoni oluşturabilir. Entubasyon, solunum desteği, kronik akciğer hastalığının olması, ventilatörün bir haftadan uzun süre kullanılması pnemoni oluşumunu kolaylaştırır. Kistik fibrozis hastalarında meydana gelen, P.aeruginosaya bağlı gelişen kronik pnemoni bu hastalardaki en önemli mortalite ve morbidite sebebi olmaktadır. Hastalık daha çok P.aeruginosanın mukoid kökenleriyle meydana gelir (2,3,35,85,88).

P.aeruginosa, immun sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden bakteriyemilere neden olabilir. Bu bakteriyemi nosokomiyal enfeksiyon şeklinde görülür. Bakteriyemide primer odak her zaman saptanamamakla beraber, genellikle üriner sistem, gastrointestinal sistem, akciğer, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları odak oluşturabilir. Klinik tablo diğer gram negatif sepsislerden farklı olmamakla beraber, deride gözlenen ektima gangrenosum tarzında lezyonlar *P.aeruginosa* sepsisi için patognomoniktir. Ektima gangrenosum klasik deri lezyonudur, perirektal alanlarda aksillada ve kasıklarda sıkça gözlenir (2,35).

*P.aeruginosa*nın banyo küveti, dezenfektan solüsyon ve pomatlarda üreyebilmesi yanık zemininde enfeksiyon gelişmesini kolaylaştırır. Yanık zemininde gelişen *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının %50 sepsise yol açabilir (2,3,35,85,87).

Penetran göz yaralanmaları, intraoküler girişimler, kontakt lens kullanımı ve lens solüsyonları da, *P.aeruginosa*ya bağlı keratit, korneal ülserler ve endoftalmiye neden olurlar (85,87).

Son yıllarda *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde biofilm oluşumunun önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır. bakteriyel biofilmler bakteriler tarafından üretilen ve mikrokolonilerin etrafını çeviren eksopolisakkaritlerden meydana gelir. Biofilm yapıları hidrofilik özellik gösterir ve yapının büyük bir kısmında su molekülleri bütünü oluşturan esas maddedir. bakteriyel hücreler biofilm içerisine heterojen olarak dağılmıştır ve total biofilm volümünün ancak %10-20'sini oluştururlar. Kalan kısım polisakkarit tabakayı penetre eden ilkel dolaşım sistemine benzer yapıda olan su kanallarından meydana gelir. Bu su kanalları biofilm bakterileri için gerekli besin maddelerinin taşınmasında ve meydana gelen metabolik atıkların uzaklaştırılmasında rol alırlar (28,29,33,35).

İlk olarak Leeuwenhoek'un 17.YY'da dışından almış olduğu plaklar içerisinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra, bugün için

gelişen teknolojiden faydalanılarak yapılan detaylı incelemelerle, bakterilerin doğadaki sıvısal ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalmalarının %99.9 biofilm aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (89). Günümüzde derin yeraltı suları ve okyanusun derinlikleri hariç biofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmekte ve doğal kapak endokarditi, osteomyelit, kronik bakteriyel prostatit, orta kulak enfeksiyonları, tıbbi implant enfeksiyonları ve özellikle kistik fibrozisli kronik akciğer hastalıklarıyla yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (28,29,33,35).

Çalışma kapsamına çeşitli klinik örneklerden izole edilen 148 *Pseudomonas aeruginosa* suşu dahil edilmiştir. Bu suşların 57 tanesi trakea örneklerinden (%38,5), 31 tanesi idrar örneklerinden (%20,9), 29 tanesi yara örneklerinden (%19,6), 11 tanesi balgam örneklerinden (%7,4) ve kalan 17 tanesi de (%11,4) çeşitli klinik örneklerden (kan, sürüntü, göz, vb.) izole edilmiştir.

Biofilm gelişim sürecinin moleküler düzenlenmesi ve antibiyotik direncinin genetik temelleri farklı araştırmacılar tarafından birçok kez araştırılırken, çeşitli örneklerden elde edilen suşların, biofilm üretme oranları hakkında literatürde kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Dellissalde ve ark. farklı fenotipteki 162 klinik *P.aeruginosa* izolatında, biofilm üretimi ile antibiyotik duyarlılıkları ve plazmid içeriklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, biofilm dağılım değerlerine göre iki farklı subpopülasyon elde etmişlerdir. Buna göre 162 suşun 23 tanesinin (%14) 8 saat inkübasyon sonrasında biofilm oluştururken, 13 suşun (%8) 24 saat sonunda biofilm oluşturduğunu bulmuşlardır. Suşlardan sadece 5 tanesinin, her iki zamanda da biofilm ürettiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu iki subpopülasyonun biofilm üretimi açısından çok kararlı olmadıklarını, çeşitli çevresel faktörlerden etkilendiklerini de çalışmalarında belirtmişlerdir (77).

Moskowitz ve ark. kistik fibrozisli hastalardan elde ettikleri 96 izolat ile çeşitli yöntemler kullanarak yaptıkları hassasiyet çalışmalarında, suşların %73'ünün, 26 saat sonunda, kontrol suşu olarak kullandıkları ATCC 27853'den daha fazla absorbons verdiğini bulmuşlardır (90).

Yassien ve ark. 4 farklı fluorokinolonun, mikrotiter plate ve vasküler katater kesitlerinde oluşmuş olan *P.aeruginosa* biofilmlerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tüp yöntemi kullanılarak klinik örneklerden elde edilen 50 *P.aeruginosa* suşunun 20 tanesinin (%40), biofilm oluşturduğunu göstermişlerdir (79).

Bu çalışmada, trakea, balgam, idrar, yara ve çeşitli örneklerden elde edilen 148 *P.aeruginosa* suşunun biofilm üretim yetenekleri mikroplate yöntemi ile 24 ve 48 saatlik sürelerde, kristal viole ve safranin kullanılarak çalışılmıştır. Klinik örneklerden izole edilen *pseudomonas* izolatlarının tamamının biofilm üretme yeteneğinde olmakla beraber, biofilm üretim oranlarında farklılıklar saptanmıştır. Tüm suşlar, standart suş olarak kullanılan *P.aeruginosa* ATCC 27853 baz alınarak değerlendirildiğinde 24 saatlik biofilm oluşturma oranı kristal viole ile %45 bulunurken, safranin ile %58,4 bulunmuştur. 48 saatlik yapılan ölçümlerden sonra ise, kristal viole ile yapılan ölçümlerde %33,6 oranında biofilm oluşumu gözlenirken safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde %37,8 oranında biofilm oluşumu saptanmıştır. Her iki grup için 24 ve 48 saatlik yapılan ölçümler sonrasında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunsa da ($p=0,038$), çalışma boyunca yapılan gözlemler sonucu oluşan genel kanı, biofilm üretimi açısından suşların bireysel farklılık gösterdiği yönündedir. Bu konuyla ilgili literatürde olan kısıtlı sayıdaki çalışmaların sonuçları arasında bir uyum yoktur. Bu durum biofilm oluşum sürecinin çok dinamik bir süreç olmasından, ısı, pH, ortamdaki besin konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenebilmesinden ve çok ana hatlarıyla benzer bir süreç olmasına rağmen, türler ve suşlar arasında oluşum basamakları açısından önemli farklılıklar içeriyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (28,29,36,43).

Gelişen teknolojiyle beraber, deneysel biofilm çalışmalarında kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Günümüzde in-vivo, in-vitro biofilm çalışmalarında, ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da floresan mikroskop kullanarak direkt sayım, canlı hücre sayım yöntemleri, metabolik aktif boya

maddeleri, radyokimyasallar sıklıkla kullanılmaktadır (54,91,93,94,95). Bu çalışmada 148 P.aeruginosa suşunun biofilm üretim kabiliyetleri EPS'nin safranin ve kristal viole kullanarak boyanması esasına göre karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Literatürde, safranin (95-98) ve kristal viole nin (77,79,90,99), biofilm tespiti için kullanıldığı birçok çalışma olmakla beraber, bu iki boyar maddenin birbirlerine üstünlüklerinden bahsedilmemektedir. Genel kanı, biofilm tespiti için tüp yöntemi tercih edilecekse safranin, mikropate yöntemi tercih edilecekse kristal viole kullanma yönündedir. Bu çalışmada her iki boyar madde, mikropate yöntemi kullanılarak denenmiştir.

Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik ölçümler sonrasında suşların 67 tanesi (%45) P.aeruginosa ATCC 27853'den fazla biofilm oluştururken, 81 tanesinin (%55) daha az oluşturduğu, safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde ise suşların 87 tanesinin (%58,4) ATCC 27853'den fazla biofilm oluştururken, 61 tanesinin (%41,6) daha az oluşturduğu bulunmuştur (Tablo 5). Safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde, 21 tane suş (%25,6) biofilm üretimi açısından pozitif olarak tespit edilmesine rağmen, bu suşlar kristal viole kullanılarak yapılan ölçümlerde negatif olarak tespit edilmiştir. 66 suş ise (%75,9) her iki yöntemle de pozitif olarak bulunurken, safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde negatif olarak saptanan sadece 1 suş, kristal viole kullanılarak yapılan ölçümlerde pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 5). Kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonrasında 49 suş (%33) biofilm üretimi açısından pozitif olarak tespit edilmişken, 99 suş (%67) negatif olarak tespit edilmiştir. Safranin kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonrasında ise 56 suş (%38) pozitif, 92 suş (%62) negatif olarak tespit edilmiştir (Tablo 6). Kristal viole kullanılarak yapılan ölçümler sonrasında negatif olarak saptanan 12 tane suş safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde pozitif olarak tespit edilirken, 5 tane suş da kristal viole ile pozitif olarak tespit edilirken, safranin ile yapılan ölçümler sonrasında negatif olarak saptanmıştır (Tablo 6). Ancak her iki zaman için yapılan ölçümler, ATCC 27853 baz alınarak değerlendirildiğinde, uyum testleriyle, her iki boyar madde uyumlu bulunmuştur (p=0,001). Sonuçlar yüzdelik dilimlere göre yorumlandığında iki gruptan elde edilen değerler, iki zaman için de korole

bulunmuştur (Şekil10, Şekil 13). Planktonik hücreler ve biofilm olgunlaşma dönemi karşılaştırıldığı zaman, biofilm hücrelerinin 800'den fazla, farklı protein salgıladıkları bilinmektedir (64). Safranin ve kristal viole farklı moleküler yapıları gereği, farklı proteinlere afinite gösterebilirler. Safranin ve kristal viole hem regresyon hem de kappa uyum testi kullanılarak yapılan analizlerle uyumlu bulunmuştur. Çalışma sonucunda, mikropate yöntemi kullanılarak yapılan biofilm çalışmalarında safraninin de kullanılabilceği düşünülmektedir.

Biofilm yapısındaki patojen mikroorganizmaların meydana getirdiği hastalıklar klinik ve halk sağlığı açısından önemlidir. Biofilmlerin kistik fibrozis hastalarında meydana gelen kronik akciğer enfeksiyonları, otitis media, periodontitis, kronik prostatit, diş çürükleri, osteomyelit ve özellikle idrar sondası, santral venöz katater, oküler implantlar, gibi medikal alet ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Pseudomonas biofilmleri özellikle ses telleri, akciğer yüzeyi, böbrekler, idrar yolu kataterleri, kalp kapakçıkları, kulak cihazlarından izole edilirler (28,29,33,35,100).

Battan ve ark. (96), seftazidim ve piperasilinin neden olduğu oksidatif strese, pseudomonas cinsi bakteri biofilmlerinin direncini araştırdıkları çalışmalarında, iki tanesi kistik fibrozis, bir tanesi kistik fibrozis olmayan akciğer ve bir tanesi de idrar örneklerinden elde edilen 4 farklı pseudomonas suşu kullanarak, tüp yöntemiyle biofilm oluşumunu araştırmışlar ve 24 saat sonunda kistik fibrozis hastalarından elde edilen biofilm oranının diğer örneklerden elde edilenlerden daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, 148 P. aeruginosa suşunun 59 tanesi trakeal aspirat, 11 tanesi balgam, 28 tanesi idrar, 29 tanesi yara ve kalan 17 tanesi çeşitli örneklerden izole edilmiştir. Çalışma kapsamına alınan yara örneklerinin 24 saatlik ölçümlerde, kristal viole kullanarak %65,5'u ATCC 27853'den fazla biofilm oluştururken, safranin kullanarak bu oran %72,4 bulunmuştur. 48 saatlik yapılan ölçümlerde ise, kristal viole kullanılarak bu oran %31'e, safranin kullanılarak ise %34,4'e düşmüştür. Balgam örneklerinde ise kristal viole kullanarak yapılan 24 saatlik ölçümlerde %63,6'lık bir pozitiflik saptanırken, safranin kullanılarak bu değer %72,2 bulunmuştur (Tablo 9). Kristal

viole ve safranin kullanarak yapılan 48 saatlik ölçümler sonucunda ise sırasıyla %54,5 ve %63,6 oranında pozitiflik saptanmıştır. Çalışma kapsamına dahil edilen en kalabalık grup olan trakeal örneklerde ise, 24 saatlik yapılan safranin ölçümlerinde %38,9 pozitiflik saptanırken, kristal viole kullanılan ölçümlerde %27,1 pozitiflik saptanmıştır. Kristal viole ve safranin kullanılan 48 saatlik ölçümlerde sırasıyla %25,4 ve %30,5 pozitif değerler elde edilmiştir (Tablo 9). Biofilm oluşumu açısından örnek alınan bölgeler karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p=0,10$). Çalışma sonucunda, 24 saatlik yapılan ölçümler sonrasında, biofilm üretim oranının en fazla olduğu grup yara örnekleri olurken, 48 saatin sonunda ise balgam örnekleri en yüksek pozitifliği vermiştir.

Biofilm kaynaklı enfeksiyonların, tüm enfeksiyonların %60'ından fazlasında sorumlu olduğu bilinmektedir (4,10). Bu enfeksiyonlar, doku bütünlüğünün bozulduğu, özellikle uygunsuz kullanılan katater, transkutanöz uygulamalar gibi yumuşak doku implantlarının kullanıldığı durumlarda daha sıklıkla gözlenmektedir (32). Toplum sağlığı açısından biofilm gelişiminin en önemli sonuçları, kullanılan medikal implantların başarısız olması ve dirençli enfeksiyonların meydana gelmesidir. Oluşan biofilmin antibiyotik tedavisine, aynı genetik materyale sahip planktonik bakterilere oranla 10-1000 kat tolerans veya direnç geliştirmesi, fagositoza karşı oluşan direnç ve tedavi sonrası relaps oranının yüksek oranda görülmesi, biofilm oluşturan bakterilerin yaşayan organizmadan uzaklaştırılmasının ne kadar güç olduğunun en önemli göstergesidir (28,29,101).

Biofilm bakterilerinde var olan direnç, yavaş büyüme oranları, antibiyotik penetrasyonunu engelleyen eksopolisakkarit üretimi, antibiyotik yıkımını sağlayan enzim üretimi ve henüz tamamen anlaşılamayan, biofilme özgü karakteristik özelliklerle açıklanmaya çalışılmaktadır (52,102,103). Genel olarak antibiyotikler hızlı üreme özelliği gösteren organizmalarda etkili oldukları için, yavaş büyüme oranlarının biofilm içerisinde var olan dirence katkısı tartışılmazsa da, tek başına bu dirençten sorumlu olamayacağı düşünülmektedir. Biofilm bakterilerinin ürettiği eksopolisakkaritlerin, genel olarak aminoglikozidlerin

penetrasyonunu engellerken, kinolon grubu antibiyotiklerin penetrasyonunu çok fazla değiştirmediği kabul edilmektedir. Yaygın direnç mekanizmalarından olan multidrug efflux pompalarında biofilm direncinde akılda tutulması gerektiği söylenmekteyse de, aksini savunan yayınlar da bulunmaktadır (70,103).

Spoering ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* O-1 suşu (PAO-1) kullanarak yaptıkları, 4 farklı grup antibiyotiğin (ofloksasin, tobramisın, carbenisilin, perasetik asit), stasyoner faz planktonik, logaritmik faz planktonik ve biofilm hücrelerine etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, carbenicillin'in sadece logaritmik fazda üreyen planktonik hücrelere etkilerken, ofloksasin'in düşük dozlarda hem biofilm hem stasyoner faz planktonik hücrelerin büyük kısmına düşük konsantrasyonlarda etkili olduğunu bulmuşlardır. Biofilm ve stasyoner faz planktonik hücreler tobramisine toleranslı bulunurken, stasyoner faz planktonik hücrelerin biofilm hücrelerinden perasetik asit'e çok daha toleranslı olduğu gösterilmiştir. Araştırıcılar tüm çalışmalar sonucunda genel olarak stasyoner faz planktonik hücrelerin, biofilm hücrelerinden biraz daha toleranslı olduğunu söylemişler ve her iki hücre popülasyonunda da direncin, büyük oranda inatçı hücrelerden kaynaklandiğını düşünmüşlerdir (70). *P.aeruginosa* 2126 kökeni ile yapılan benzer bir çalışmada, biofilm formundaki dış bölgeye yakın bakteriler ve biofilm oluşumuna katılmayan serbest hücrelere 24 saat uygulanan antibiyotik sonrasında levofloksasin, ciprofloksasin ve gentamisin'in koloni sayısını 10^6 CFU/ml'den 10^3 CFU/ml'ye indirdiğini fakat seftazidim'in etkisiz olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada levofloksasin'in üreme fazında olmayan bakterilere 6 saatlik MİK dozunda uygulanması sonrasında, yaşayan hücre sayısını 10^6 CFU/ml'den 10^3 CFU/ml'ye indirdiği, 16XMİK lik konsantrasyonda ise 6 saatte yaşayan hücrelerin tamamını öldürdüğü gösterilmiştir. Ciprofloksasin ve gentamisin 16XMİK konsantrasyonda 24 saat uygulamadan sonra etkili olabilirken, seftazidimin bu konsantrasyonlarda etkisiz olduğu gösterilmiştir (104).

Yassien ve ark. 50 klinik *P.aeruginosa* suşu kullanarak kinolon grubu 4 antibiyotikle yaptıkları hassasiyet çalışmasında, ciprofloksasin, norfloksasin,

pefloksasin ve ofloksasin'in her birinin 1/2, 1/4, 1/8 MİK'lik konsantrasyonlarda, P.aeruginosa biofilm oluşumunu, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttıklarını göstermişlerdir. Aynı çalışmada bu 4 antibiyotiğin, 2 günlük biofilm oluşumu üzerine 12,5-400 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda etkilerine bakmışlar ve kontrol grubuna göre optik dansiteyi 12,5 µg/ml konsantrasyonda %77- 69, 400 µg/ml konsantrasyonda ise % 60-39 arasında değişen oranlarda azalttığını göstermişlerdir. Çalışma sonunda en etkili antibiyotiğin pefloksasin, en az etkili olanın ise ciprofloksasin olduğu bulunmuştur (79). Başka bir çalışmada ise fosfomisin ve ulifloksasin kombinasyonunun P.aeruginosa biofilm üzerine, bu antibiyotiklerin tek başına kullanımından daha etkili olduğu gösterilmiştir (105). Yapay idrar modeli kullanılarak oluşturulan P.aeruginosa biofilm üzerinde yapılan bir çalışmada; seftazidim, panipenem, piperasilin, amikasin, ciprofloksasin ve levofloksasin'in birbirlerine üstünlüklerine bakılmış ve kinolon grubu antibiyotiklerin biofilm eradikasyonunda en etkili antibiyotikler olduğu bulunmuştur (106). İnfrared spektroskopi kullanılan başka bir çalışmada ise, ciprofloksasinin P.aeruginosa biofilmine penetrasyonu araştırılmış ve P.aeruginosa'ya penetrasyon normalde 40 saniye iken, biofilm formu geliştikten sonra süre 21 dakikaya uzamıştır (107).

Moskowitz ve ark. 41 kistik fibrozis hastasından elde ettikleri 94 P.aeruginosa izolatu ile yaptıkları kapsamlı çalışmada, antipseudomonal etkinliği olan 12 antibiyotik için saptanan MİK ve BİK değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda amikasin, ciprofloksasin ve tobramisin için saptanan BİK ve MİK değerleri birbirine yakın bulunurken, gentamisin ve meropenem için BİK değeri, MİK'in birkaç katı bulunmuştur. Çalışma kapsamına alınan aztreonem, seftazidim, piperasilin/tazobaktam ve tikarsilin/klavulanat gibi β-laktam antibiyotikler ve doksisisiklin'de ise BİK değerleri MİK değerinin birkaç on katı bulunmuştur (90). Kistik fibrozis hastalarından elde edilen örneklerden yapılan bir başka çalışmada ise, 6 kistik fibrozis hastasının her birinden bir mukoid ve bir nonmukoid olmak üzere toplam 12 P.aeruginosa izolatıyla, tek ve kombine antibiyotiklerin duyarlılığı çalışılmıştır. Çalışma sonucuna göre, antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında, mukoid ve nonmukoid bakterilerin planktonik

formları antibiyotiklere rolatif olarak dirençliyen, bakteriler tek tabakalı adherent ve biofilm moduna geçtiklerinde MİK ve MBK değerlerinin oldukça yükseldiği bulunmuştur. Seftazidim ve ciprofloksasin için, planktonik ve biofilm modunda üreme için elde edilen MİK ve MBK arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, aminoglikozit grubu antibiyotiklerde bu fark anlamsız bulunmuştur. Tek başına kullanılan antibiyotiklere hassasiyet açısından, adherent ve biofilm bakterileri arasında istatistiksel bir fark gösterilememiştir. Aynı çalışmada doksandan fazla antibiyotik kombinasyonu denenmiş ve biofilm formunda üreyen bakteriler ile adherent bakteriler arasında istatistiksel bir fark bulunurken, planktonik ve adherent bakteriler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (99).

Farklı antibiyotiklerin *P.aeruginosa* biofilmlerine olan etkisi, çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (96,108-112).

Medikal implant kullanılarak oluşturulan biofilm modeli kullanılarak yapılan duyarlılık çalışmaları da vardır. Soboh ve ark. (113) 1cm'lik kırmızı plastik katater kesitleri üzerinde oluşturdukları *P.aeruginosa* biofilmi üzerine, protamin sulfat ve ciprofloksasin'in tek tek ve kombine halde uygulamanın sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, ciprofloksasin ve protamin sulfat kombinasyonunun, planktonik ve biofilm hücrelerini öldürmede, tek başına kullanılan ciprofloksasin'den çok daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Goto ve ark. (106) yapay idrar modeli kullanarak teflon katater üzerinde 24 saatte oluşturulan *P.aeruginosa* biofilmi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkilerine bakmışlardır. Çalışma sonucunda, 24 saat sonunda katater üzerinde oluşan biofilm yapısı tarama elektron mikroskobu ile tespit edilmiş ve bu yapının 5 gün boyunca değişmeden kaldığı gösterilmiştir. 48 saat uygulanan antibiyotik tedavisi sonucunda piperasilin yaşayan canlı hücre sayısını 10^8 CFU/ml'den 10^6 CFU/ml'e, seftazidim ise 10^3 CFU/ml'e indirmiştir. Papipenem ve amikasinin etkinliklerinin ise birbirlerine yakın olup, piperasilin ve seftazidimden daha etkin olduğunu söylemişlerdir. Ciprofloksasin ve levofloksasinin ise en etkin antibiyotikler olduğu ve sadece 24 saatte yaşayan tüm bakterileri öldürdüğü gösterilmiştir.

Yapılan benzer bir çalışmada ise biofilm bakterilerini öldürmede, tobramisin'in diğer aminoglikozidlerden çok daha etkin olduğu gösterilmiştir (112). Tsukamoto ve ark. yapmış oldukları çalışmada, katater ilişkili idrar yolu enfeksiyonu olan hastalarda, oral yoldan 14 gün süreyle verilen ciprofloksasin ve bu antibiyotiğin klaritromisin ile kombinasyonunun klinik etkinliği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda iki grup arasında, klinik etkinlik açısından bir fark bulunamadığı gösterilmiştir (115).

İn-vivo şartlarda biofilm-antibakteriyel ilişkisini araştıran farklı çalışmalar da bulunmaktadır (116-118).

Bu çalışmada, çalışma kapsamına alınan 148 *P.aeruginosa* suşu, CLSI önerileri doğrultusunda farklı antibiyotik diskleri ile test edildi. Bu antibiyotiklere direnç profilleri ve bu direnç durumunun biofilm üretimi ile karşılaştırılması Tablo10'da verilmiştir. Bunu göre, 148 *P.aeruginosa* suşunun 86 tanesinde dirençli saptanan sefaperazonun en çok direnç geliştirilen antibiyotik olduğu, 38 tanesinde direnç saptanan imipenemin de, en az direnç geliştirilen antibiyotik olduğu bulunmuştur. Çeşitli klinik örneklerden elde edilen 148 suşun, hem kristal viole hem safranin kullanılarak tespit edilen 24 saatlik biofilm ölçümleriyle, antipseudomonal etkinliği olan 12 antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemiyle tesbit edilen direnç durumları karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlam bulunamadı. Her iki boyar madde kullanılarak yapılan 48 saatlik ölçümlerde ise, biofilm üretimi ve gentamisine karşı gelişen direnç arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,001$, $p=0,002$). Diğer antibiyotiklere gelişen direnç ile biofilm üretimleri arasında ilişki saptanamadı (Tablo 10). Her ne kadar biofilm oluşumunun aminoglikozid penetrasyonunu engellediğine yönelik çalışmalar olsa da, disk diffüzyon yönteminin, sadece serbest bakterilerin direnç profilini yansıttığından dolayı in-vitro biofilm hassasiyet çalışmalarına uygun olmadığı bilinmekte, bu yüzden gentamisine karşı var olan bu direncin biofilm oluşumu ile açıklanmaması gerektiği düşünülmektedir. Dolayısı ile biofilm oluşumunun antibiyotik direncine olan gerçek etkisini anlayabilmek için kullanılan antibiyotiklerin sub MİK dozlarda biofilm yapımını nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Mikroplate yöntemiyle *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün oluşturduğu biofilm miktarı esas alınarak, bu değerin %100'ü ve üzerinde biofilm oluşturan 6 suş ve %50-%100'ü arasında biofilm oluşturan 4 suş olmak üzere toplam 10 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak, öncesinde biofilm yapımını provoke eden uygun prosedürlerle duyarlılık çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Tablo11 ve Tablo12' de gösterilmiştir.

Çalışma kapsamına alınan 10 suşun MİK değerleri, standart dilüsyon yöntemiyle, ciprofloksasin için 0.5-16 µg/ml, levofloksasin için 2-16 µg/ml, moksifloksasin için ise 4-16 µg/ml aralığında olduğu saptanmıştır. 3 antibiyotiğin, MİK/2, MİK/4, MİK/8 konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonucunda, biofilm gelişimi üzerine etkileri karşılaştırıldığı zaman aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,005$). 48 saat sonunda ise, aynı konsantrasyondaki antibiyotik uygulamalarının biofilm gelişimi üzerine etkileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

24 saat antibiyotik uygulaması sonrasında, MİK/2-MİK/4 konsantrasyonlarda moksifloksasin anlamlı bir şekilde biofilm gelişimi üzerine diğer antibiyotiklerden daha az etkili bulunmuştur ($p<0,005$). MİK/8 konsantrasyonda ise antibiyotikler arasında biofilm gelişimi üzerine etki açısından fark saptanmamıştır. 48 saat sonunda ise, antibiyotiklerin MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarda, biofilm oluşumuna etki açısından bakıldığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 12).

Bu sonuçlar, diğer çalışmalarla uyumlu olarak, sub MİK konsantrasyonlarda kinolon grubu antibiyotiklerin biofilm gelişimini azalttığı fakat süre uzadıkça biofilm yapısının tekrar organize olmaya başladığını ve belki de biofilm direncinde çok önemli rolü olan persister hücrelerin çoğalmaya başladığını düşündürmüştür. Bu çalışma sonucunda kinolon grubu antibiyotiklerin biofilm enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir tercih olabileceği düşünülmektedir.

Biofilm oluşturmuş bakteriler üzerine kinolon grubu 3 antibiyotiğin etkinliği, daha önceden tarif edildiği şekilde, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e göre iyi

biofilm oluşturduğu tespit edilen 6, %50-%100 arasında bifilm oluşturan 4 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak denenmiş ve elde edilen BİK değerleri ve aynı suşların MİK değerlerinin karşılaştırması tablo 13'de gösterilmiştir. Buna göre 10 suş için, ciprofloksasinin ortalama MİK değeri 2,9 µg/ml bulunurken, ortalama BİK değeri %34,5'luk bir artış göstererek 3,9 µg/ml bulunmuştur. Levofloksasin ortalama MİK değeri 6,6 µg/ml bulunurken, BİK değeri %130'luk bir artışla 15,2 µg/ml bulunmuştur. Moksifloksasinin ortalama MİK değeri ise 12,4 µg/ml bulunurken, BİK değeri %161'lik artışla 32,4 µg/ml bulunmuştur. Bu sonuçlar, biofilm gelişiminin antibiyotik duyarlılığını anlamlı bir şekilde azalttığını göstermektedir. Denenen kinolon grubu antibiyotikler arasında, biofilm üzerine etkili olan ciprofloksasin olurken, en az etkilisi ise moksifloksasin olmuştur. Kinolon grubu antibiyotiklerin *P.aeruginosa* biofilmleri üzerine etkinliğini araştıran benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bu durum, yöntem farklılığı veya biofilmlerin strüktürel yapısındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi, bölgeler arası farklılıktan da kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle bu konuda epidemiyolojik çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

Biofilm duyarlılık çalışmalarından sonra, kinolon grubu antibiyotiklerin biofilm enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir tercih olabileceği düşünülmektedir.

Biofilm gelişimi ve alginat üretimi arasındaki ilişki son zamanlarda ilgi uyandıran konulardan biridir. İlk olarak 1966 yılında kistik fibrozis hastalarından elde edilen mukoid kolonilerde gösterilen alginat yapısı, daha sonra 1980 yılında kistik fibrozis hastalarının alveollerinden postmortem elde edilen mukoid *pseudomonas* türlerinde gösterilmiştir (13). Bugün için *pseudomonas* türlerinin *in-vivo* şartlarda biofilm formasyonu geliştirdiği bilinmektedir. Biofilm gelişimi; başlangıç yapışma, mikrokoloni formasyonu, olgun biofilm oluşumu ve biofilm kopması olmak üzere birbiri ardına gelişen ve iyi organize olmuş basamaklar içerir (29,33,35). Başlangıç, yapışma ve sonrasında gelen basamaklarda *pseudomonas*lar, EPS olarak adlandırılan hücre dışı mukoid madde salgırlarlar (13). EPS, polisakkaritlerin yanında çeşitli protein ve nükleik asitlerden oluşmakla beraber, türler ve cinsler arasında farklılıklar gözlenebilmektedir (81). Alginat,

EPS polisakkaritlerinin majör komponentidir. Biofilm oluşturan suşlarda alginat aşırı üretiminin bakteriye sağladığı avantajlar konusunda kesin bilgiler olmamakla beraber ortak görüş; alginatın bakteri adezyonunu kolaylaştırdığı, enflamasyon alanında bakteriyi serbest radikallerden ve makrofajlardan koruduğu yönündedir (12,13,15,17). Kistik fibrozis hastalarının akciğerlerindeki alginatın, nötrofil kemotaksisini ve kompleman aktivasyonunu engellediği yönünde çalışmalar vardır. Kistik fibrozis hastalarının kanında anti-alginat antikoru bulunmuş fakat in-vitro deneylerde bu antikorumun pseudomonasların opsonik öldürülmesine katkısı olmadığı gösterilmiştir (119).

Nonmukoid türlerin in-vitro şartlarda biofilm oluşturabilmesi için alginatın mutlak gerekli olup olmadığı konusunda yapılan araştırmaların sonuçları çelişkilidir.

Friedman ve Kolter'in, *Pseudomonas aeruginosa* 14 (PA14) izolat ve mutantını kullanarak yapmış oldukları çalışmada, birbirine bitişik 7 genden oluşan *pel* geninin transmembran proteinleri ve karbonhidrat sentez sürecinde rol aldıklarını ve mikroskopik ve makroskopik çalışmalarla *pel* defektif suşun ekstraselüler matriks üretmediğini göstermişlerdir. Sonuç olarak mukoid ve nonmukoid suşların EPS sentezleyebilmesi için *pel* geninin mutlak gerekli olduğunu vurgulamışlardır (120). Benzer bir çalışmada da PAO-1 kullanılarak *psl* gen gurubunun EPS sentezi için mutlak gerekli olduğu gösterilmiş ve mikrotiter ve tüp yöntemleriyle *psl* defektif PAO-1 mutantının biofilm oluşturmadığı doğrulanmıştır (121). Bununla beraber Wolfgang ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* K (PAK) izolatu ve mutantını kullanarak, mikroarrey tekniğiyle yapmış oldukları çalışmada, alginat ekspresyonu için özel bir genin varlığını gösterememişlerdir (122).

Türkiyeden Çıragil ve ark. 60 tanesi kistik fibrozis hastalarından elde edilmiş olmak üzere toplam 213 *P.aeruginosa* suşu kullanarak yapmış oldukları çalışmada, örnek alınan bölge ve alginat üretimi açısından anlamlı bir ilişki

bulunamazken, genel olarak solunum yolu izolatlarının daha yüksek oranda alginat ürettiklerini göstermişlerdir (84).

Stapper ve ark. PAO-1, aşırı alginat üreten mutanti (*mucA 22*), ve alginat defektif mutantını (*algD*) kullanarak, biofilm oluşumu ve alginat üretimi arasındaki ilişkiyi kalitatif ve kantitatif olarak araştırdıkları çalışmalarında, biofilm oluşturabilmek için alginat üretiminin mutlak gerekli olmadığını fakat alginatın (özellikle O-asetillenmiş formu), biofilm oluşumuna önemli katkıda bulunduğunu söylemişlerdir. Yüksek biofilm oluşturan mutant, izogenik non-mukoid özdeşlerine göre, su kanallarıyla ayrılan yüksek biofilm yapısı göstermiş, fakat yapışmadan sonra biofilm oluşturmak için geçen süre fazla bulunmuştur. Bunun aksine nonmukoid türler yapışmadan hemen sonra biofilm yapısı göstermelerine rağmen, biofilm oluşumu kuvvetli bulunmamıştır (12). Hentzer ve ark. yaptıkları çalışmada benzer şekilde aşırı alginat üreten suşların yüksek yapılı biofilm ürettikleri ve isogenik nonmukoid özdeşlerine göre tobramisine anlamlı derecede direnç gösterdiklerini söylemişlerdir (15). Nivens ve ark. da yapmış oldukları çalışmada benzer şekilde biofilm oluşturmak için alginatın mutlak gerekli olmayıp, biofilm mimarisinde özellikle O-asetillemiş formunun etkili olduğunu göstermişlerdir (123).

Alginat ve antibiyotik direncini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Aaron ve ark. 6 kistik fibrozis hastasından elde ettikleri, genotipik olarak özdeş bir mukoid ve bir nonmukoid olmak üzere toplam 12 *P.aeruginosa* suşu kullanarak yaptıkları çalışmada biofilm üretiminin antibiyotik direnciyle yakın ilişkili olduğunu göstermişler fakat mukoid ve nonmukoid grup arasında antibiyotik direnci açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır (98). Hodges ve ark. yapmış oldukları çalışmada, mukoid ve nonmukoid *P.aeruginosa* suşlarının ürettikleri alginatın koruyucu etkisinin difüzyon kısıtlamasına bağlı olmadığını göstermişlerdir (124).

Pina ve ark. P.aeruginosanın antibiyotik direnci ve alginat sentezi üzerine kinolon grubu antibiyotiklerin etkisini araştırdıkları çalışmada, 3µg/ml konsantrasyonda ciprofloksasine maruz bırakılan nonmukoid P.aeruginosa izolatlarının 8 gün sonunda büyük bir kısmının canlılığını yitirdiğini, 18 gün sonunda ise sağ kalan P.aeruginosa izolatlarının tamamının mukoid forma dönüştüğünü göstermişlerdir. Araştırcılar, alışma sonucunda 2. ve 3. kuşak kinolonların, P.aeruginosa kolonilerinin mukoid dönüşümünü provoke ettiği sonucuna varmışlardır (125). Benzer şekilde Takahashi ve arkadaşları da in-vitro şartlarda ofloksasin, norfloksasin ve seftazidimin P.aeruginosa alginat üretimini arttırdığını göstermişlerdir (126).

Bu çalışmada, çalışma kapsamına alınan 148 P.aeruginosa suşunun 13 tanesi P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbans değerinin %50'si ve altında, 41 tanesi %50-%100' arasında, 35 tanesi %100-%150'si arasında ve kalan 59 tanesi de %150'sinden fazla absorbans verdi (Tablo 14). P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen alginat konsantrasyon değerisi esas alınarak, bu konsantrasyonun üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edildiğinde, 148 P.aeruginosa suşunun 95 tanesinin (%64) kuvvetli alginat ürettiği, kalan 53 suşun (%36) zayıf alginat ürettiği saptanmıştır. Biofilm oluşturma durumları ve alginat rimi arasındaki ilişki Tablo 15'de verilmiştir. Buna göre hem safranin hem de kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri ve alginat rimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,007, p=0,016). Çalışma sonucunda, tüm P.aeruginosa suşlarının bir miktar alginat ürettiği, biofilm gelişimi için alginat üretiminin mutlak şart olmadığı fakat biofilm oluşturan suşların, alginat üretim kabiliyetlerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Alginat rimi açısından, tanımlanan özelliklerin yanında henüz tanımlanmamış birçok özelliğin olduğu ve farklı mekanizmaları sorgulayan moleküler ve epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Ciprofloksasin, moksifloksasin ve levofloksasinin sub MİK konsantrasyonlarda alginat üretimine etkileri Tablo 17 de gösterilmiştir. Buna göre MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 konsantrasyonlarda antibiyotiklerin, diğer

çalışmalarla uyumlu olarak alginat üretimini arttırdığı ve her konsantrasyon için aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Alginat üretimine etki açısından 3 antibiyotik kendi aralarında değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir fark bulunmazken, moksifloksasin genel olarak alginat üretimini diğer ikisinden daha fazla arttırmıştır.

Bu çalışmada alginat üretiminin, antibiyotik yoğunluğunun fazla olduğu durumlarda daha yüksek olduğu, düşük antibiyotik konsantrasyonlarında ise bakteri sayısının daha yüksek olma olasılığına karşın, bu konsantrasyonlardaki alginat üretiminin daha düşük olduğu bulunmuştur. Çalışmada, alginat üretiminin antibiyotiklerin sub MİK konsantrasyonlarından ne ölçüde etkilendiği, aynı deneysel çalışma üç kez aynı suşlarla tekrarlanarak test edilmiştir. Her 3 çalışmada da MİK/2 konsantrasyonda alginat üretimi, her üç antibiyotik için de diğer konsantrasyonlardan yüksek bulunmuştur. Bu durumun antibiyotik varlığında bakterilerin alginat ekspresyonunu arttırdığından mı kaynaklandığı yoksa antibiyotiklerin moleküler yapısından kaynaklı, ölçümü etkileyen bir durum olup olmadığını ortaya koymak için, çalışma negatif kontrol, sadece antibiyotik varlığında ve her suşun 1XMİK konsantrasyonlardaki kuyucuklarında alginat ölçümleri yapıldı. Bu kuyucuklardaki alginat ölçümleri negatif kontrole yakın değerlerde bulundu. Sonuçta, çalışmaya alınan 10 suş ve her 3 antibiyotik için aynı sonuçların elde edilmiş olması ilginç bulundu. Antibiyotiklerin varlığında bakterilerin alginat üretimlerini artırma yönünde bir davranışa gittikleri; ancak antibiyotik varlığında biofilm ölçümlerinin düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum çelişkili gibi gözükmeyle beraber antibiyotik varlığında bakterilerin kendilerini korumak amacıyla alginat ekspresyonunu arttırmış olabileceği, ancak alginat artışının tek başına biofilm formasyonu için yeterli olmamasından kaynaklanmış olabilir (12). Ancak bu çalışmadaki bu sonucun, moleküler, genetik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği, fenotipik olarak gözlenen bu durumun, çalışılan suşlara özgü mü yoksa kinolon grubu antibiyotiklerin varlığında P.aeruginosanın alginat üretim genlerinde bir ekspresyon mu olduğu daha kapsamlı çalışmalarla ortaya konmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Sonuç olarak; P.aeruginosa suşlarında biofilm oluşumunu etkileyen genetik birçok faktörün yanında çevresel koşulların

niteliği de son derece önemlidir. Bu çeşitlilik bir suşun farklı koşullarda farklı biofilm oluşturma eğilimi gosterebileceğini gostermektedir. Biofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin antimikrobiyelerle tedavide gucluk gosterdiği çeşitli çalışmalarla BİK değerinin MİK değerlerinden çok yuakse bulunmasıyla gosterilmiştir. Bu durum ozellikle sorunlu bolge enfeksiyonlarında tedaviyi guleştirecektir. Bütün bu verilerin ışığında P.aeruginosa suşlarının biofilm oluşumuna gidiş mekanizmalarının farklı koşullarda denenmesinin farklı antibiyotiklerin varlığındaki biofilm oluşturma eğilimlerinin ne olude etkilendiklerini başka çalışmalarla denenmesi gerekmektedir. Çevresel ve suşa ait ozelliklerden son derece etkilenen biofilm oluşum mekanizmalarının, biofilmde rol aldığı duşunuken yapıların, enzim ve maddelerin fenotipik ve genotipik araştırılması etkin tedavi yaklaşımının planlanması açısından son derece önemli olacaktır. Ayrıca biofilme gidişte suşlar arasında coğrafi bolge farklılığının olup olmadığı epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

SONUÇLAR

1-Çalışmaya alınan toplam 148 örneğin 57 tanesi endotrakeal aspirat örneklerinden (%38,5), 31 tanesi idrar örneklerinden (%20,9), 29 tanesi yara örneklerinden (%19,6), 11 tanesi balgam örneklerinden (%7,4), 17 tanesi (%11,4) çeşitli örneklerden (kan, sürüntü, göz vb.) soyutlanmıştır.

2-Kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri sonrasında, suşların 60 tanesi, *P.aeruginosa* ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 23 tanesi, %50-%100'ü arasında, 32 tanesi, %100-%150'si arasında, 18 tanesi, %150-%200'ü arasında, 17 tanesi de %200'ünden yüksek absorbans elde edilmiştir.

3-Safranin kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri sonrasında, suşların 42 tanesi, ATCC 27853'den elde edilen absorbansın %50'si ve altında, 19 tanesi, %50-%100'ü arasında, 25 tanesi, %100-%150'si arasında, 14 tanesi, %150-%200'ü arasında, 17 tanesi, %200-%250'si arasında, 31 tanesi %250'sinden yüksek absorbans elde edilmiştir.

4-Safranin ve kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleri, istatistiksel olarak yapılan korelasyon testleriyle birbirleriyle uyumlu bulunmuştur ($r^2= 0,900$).

5-Safranin ve kristal viole kullanılarak yapılan 48 saatlik biofilm ölçümleri, istatistiksel olarak yapılan korelasyon testleriyle birbirleriyle uyumlu bulunmuştur ($r^2= 0,886$).

6-*P.aeruginosa* ATCC 27853'den elde edilen absorbans değeri esas alınarak, kristal viole kullanılarak yapılan 24 saatlik ölçümler sonrasında suşların 67 tanesinin kuvvetli biofilm oluşturduğu, 82 tanesinin zayıf biofilm oluşturduğu saptanmıştır.

7-P.aeruginosa ATCC 27853'den elde edilen absorbans değeri esas alınarak, safranin kullanılarak yapılan ölçümlerde suşların 87 tanesinin kuvvetli biofilm oluşturduğu, 62 tanesinin zayıf biofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

8-24 saatlik biofilm üretimi açısından safranin ve kristal viole olmak üzere kullanılan iki yöntem arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

9-Ciprofloksasin, moksifloksasin ve levofloksasinin, MİK/2, MİK/4, MİK/8 konsantrasyonlarda 24 saat uygulanması sonucunda, biofilm gelişimi açısından aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,005$).

10-24 saat antibiyotik uygulaması sonrasında, biofilm oluşumuna etki açısından antibiyotikler arasındaki ilişkiye bakıldığı zaman, moksifloksasinin en az etkili antibiyotik olduğu bulunmuştur ($p<0,005$).

11- BİK ve MİK değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

12- 148 P.aeruginosa suşuna, alginat üretimi açısından bakıldığında; 13 tanesi ATCC 27853'den elde edilen değerlerin %50'si ve altında, 41 tanesi %50-%100'ü arasında, 35 tanesi %100-%150'si arasında ve kalan 59 tanesi de %150'sinden yüksek değer vermiştir.

13-Standartlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre 148 P. aeruginosa suşunun 24 saat sonunda ürettiği alginat miktarı 0,4-6.9 µg/ml aralığında bulunmuştur.

14-Kristal viole kullanılarak saptanan 24 saatlik biofilm oranları ile alginat üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,007$).

15-Safranin kullanılarak yapılan biofilm ölçümleriyle alginat üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,016$).

16-Ciprofloksasin, moksifloksasin ve levofloksasinin sub MİK konsantrasyonlarda alginat üretimini, antibiyotiksiz duruma göre, doz bağımlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli vücut örneklerinden soyutlanan *P. aeruginosa* suşlarının, farklı sürelerde ve farklı yöntemlerle, biofilm oluşturma ve alginat üretme yetenekleri, bu yeteneklerin antibakteriyel madde varlığındaki değişimleri ve aynı zamanda biofilm oluşturma ve alginat üretiminin antibakteriyel madde direncine katkısı araştırıldı.

P.aeruginosa suşlarının 57 tanesi endotrakeal aspirat örneklerinden (%38,5), 31 tanesi idrar örneklerinden (%20,9), 29 tanesi yara örneklerinden (%19,6), 11 tanesi balgam örneklerinden (%7,4), 17 tanesi (%11,4) çeşitli örneklerden (kan, sürüntü, göz vb.) soyutlanmıştır. 24 saatlik ölçümler sonrasında, kristal viole kullanarak suşların %45'inin, safranin kullanarak ise %58,4'ünün *P.aeruginosa* ATCC 27853'den daha fazla biofilm oluşturduğu saptanmıştır. 48 saatlik ölçümler sonrasında, kristal viole kullanarak suşların %33,6'sı, safranin kullanarak %37,8'i ATCC 27853'den daha fazla biofilm oluşturmuştur. 24 saatlik değerler ile 48 saatlik değerler arasındaki fark, her iki boyar madde kullanımında da anlamlı bulunmuştur ($p=0,00$). Kinolon grubu antibiyotiklerin biofilm üretimine etkisine bakıldığı zaman, bütün antibiyotiklerin sub MİK konsantrasyonlarda 24 saat sonunda biofilm üretimini doz bağımlı olarak azalttığı saptanmıştır. Sub MİK konsantrasyonda biofilm oluşumuna etki açısından bakıldığında, ciprofloksasin ve levofloksasin, moksifloksasine göre daha etkili bulunmuştur. Sub MİK konsantrasyonlarda 48 saat sonunda biofilm oluşumuna etki açısından bakıldığında, antibiyotikler arasında bir fark bulunmamıştır. Biofilm oluşturmuş bakteriler üzerine kinolon grubu antibiyotiklerin etkisine bakıldığında, her 3 antibiyotik için de BİK değerlerinin MİK değerlerine göre oldukça yükseldiği bulunmuş ve moksifloksasinin, biofilm üzerine ciprofloksasin ve levofloksasinden daha az etkili olduğu saptanmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının standartlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre 24 saat sonunda ürettiği alginat miktarı 0,4-6,9 µg/ml aralığında bulunmuştur. Her iki boyar maddeyle yapılan 24 saatlik biofilm ölçümleriyle, alginat üretimleri karşılaştırıldığında, aradaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0,007$; $p=0,016$). Kullanılan her 3 antibiyotiğin de sub MİK

konsantrasyonlarda alginat üretimini doz bağımlı olarak arttırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak biofilm oluşumu ve alginat üretimi, *P.aeruginosa* suşlarının tedavi yanıtını etkileyen önemli virulans faktörlerindedir.

