

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ENDOTRAKEAL TÜP ÜZERİNDE OLUŞMUŞ *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA* BİYOFİLMİ ÜZERİNE KOLİSTİN VE  
AMBROKSOLÜN ETKİSİ**

**Dr. Nesil BAYRAKTAR**

**KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. İsmail BALIK**

**ANKARA-2011**

# KABUL VE ONAY

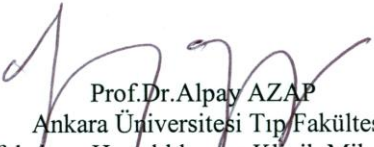
T.C.  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan “Endotrakeal Tüp Üzerinde Oluşmuş Pseudomonas Aeruginosa Biyofilmi Üzerinde Kolistin ve Ambroksolün Etkisi” başlıklı Dr.Nesil Bayraktar’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/11/2011

  
Prof.Dr.İsmail BALIK  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı Başkanı  
Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı

  
Prof.Dr.Alpay AZAP  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr.Serhat BİRENGEL  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı  
Üye

## TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp fakültesinde Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarıma, tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İsmail Balık'a, tez çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini gördüğüm laborantımız Meşure Coşkun'a, tez konu seçimimde biyofilm konusunda çalışmamda yönlendirici etkilerinden dolayı Doç. Dr. K. Osman Memikoğlu'na,

Tezimin deney aşamasında sabırla tüm sorularıma cevap veren Tıbbi Mikrobiyoloji Arş. Grv. Dr. Emel Uzunoglu'na,

Beş yıllık asistanlık sürem boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk, tüm zorluklarda yanımda olan değerli dostlarım Dr. Zeynep Köken Bayındır ve Dr. Güle Çınar Aydın'a,

Tezimin her aşamasında sabırla desteğini esirgemeyen, dostum ve ev arkadaşım Dr. Evrim Yanmaz'a,

Manevi desteği ile bana her zaman güven veren anneme ve tüm aileme,

Teşekkür ederim.....

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİLDİZİNİ .....	v
TABLO VE GRAFİK DİZİNİ .....	vi
I. GİRİŞ .....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. PSEUDOMONAS AERUGİNOSA .....	4
2.1.1. Mikrobiyoloji.....	4
2.1.2. Tarihçe .....	7
2.1.3. Epidemiyoloji .....	8
2.1.3. Virulans ve Patojenite.....	10
2.1.4.1. Patogenez .....	11
2.1.4.2. Adezyon ve Kolonizasyon .....	11
2.1.4.3. Virulans Faktörleri .....	12
2.2. BİYOFİLM.....	20
2.2.1. Tanım.....	20
2.2.2. Biyofilm Oluşumu .....	21
2.2.2.1. Geri Dönüşümlü Yapışma.....	22
2.2.2.2. Geri Dönüşümsüz Yapışma .....	22
2.2.2.3. Biyofilm İskeletinin Oluşumu ve Mikrokolonilerin Oluşumu.....	22
2.2.2.4. Hücrelerin Biyofilm İçinde Dağılması.....	23
2.2.3. Biyofilmlerin Önemi.....	23
2.3. QUORUM-SENSING (QS) = ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA .....	27
2.4. AMBROKSOL YAPI VE ETKİ MEKANİZMASI.....	30
2.5. KOLİSTİN (POLİMİKSİN E) .....	33
III. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. BİYOFİLM OLUŞTURAN BAKTERİLERİN SEÇİLMESİ.....	36
3.2. ENDOTRAKEAL TÜPLERİN (ETT) HAZIRLANIŞI.....	37
3.3. BESİYERLERİNİN HAZIRLANIŞI .....	37

3.4. BAKTERİ SAYIMI .....	38
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	39
IV. BULGULAR.....	40
V. TARTIŞMA .....	45
VI. SONUÇ.....	52
VII. ÖZET .....	53
VIII. SUMMARY .....	55
IX. KAYNAKLAR .....	57

## ŞEKİLDİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Mavi-Yeşil Pigment Görüntüsü.....	4
<b>Şekil 2.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Flagella ve Fimbria Elektron Mikroskop Görüntüsü .....	6
<b>Şekil 3.</b> Alginatın Kimyasal Yapısı .....	17
<b>Şekil 4.</b> Alginat Sentezi .....	17
<b>Şekil 5.</b> Quorum-Sensing Sisteminde Reseptör Spesifik Molekül İlişkisi .....	28
<b>Şekil 6.</b> Biyofilm oluşumunun Kongo red agar yöntemi ile değerlendirilmesi .....	37

## TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya Ait Virulans Faktörleri .....	12
<b>Tablo 2.</b> Medikal İmplantlardan İzole Edilen Biyofilm İlişkili Mikroorganizmalar .....	27
<b>Tablo 3.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Kliniklere Göre Dağılımı .....	36
<b>Tablo 4.</b> Kolistin, Ambroksol ve Kombinasyonlarının Bakteriyel Koloni Sayıları Üzerine Etkileri .....	43
<b>Grafik 1.</b> Kolistin, ambroksol ve kombinasyonlarının zamana göre bakteriyel koloni sayıları üzerine karşılaştırmalı etkileri .....	42
<b>Grafik 2.</b> Kolistin, ambroksol ve kombinasyonlarının bakteriyel koloni sayıları üzerine etkileri.....	42

## I. GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonadaceae* ailesinin major patojeni olup Gram negatif bir basildir. *P. aeruginosa* monotriş flagella ve fimbriya kaplı bir yüzeye sahiptir. Hemen hemen tüm suşlar alginat olarak bilinen ekstrasellüler polisakkarit üreten genlere sahiptir. Bu madde literatürde mukoid ekzopolisakkarit olarak da geçmektedir (1). *P. aeruginosa*'nın etken olduğu özellikle kistik fibrosis hastaları başta olmak üzere kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabetik ayak gibi kronik yara yeri enfeksiyonları ve yabancı cisim enfeksiyonlarının kimyasal temelini oluşturur. Son yıllarda ekstrasellüler polisakkarit yapısının pelikül ve biyofilm oluşumunda rol aldığı anlaşılmış olup patogenezdaki önemi vurgulanmaktadır (2).

*P. aeruginosa* minimum beslenme koşullarında bile hemen tüm çevresel şartlarda üreyebilmesi nedeniyle öncelikle önemli bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmiştir. Hastane dışında *P. aeruginosa* toprakta, suda ve bitkilerde bulunmakla birlikte insanlarda ve hayvanlarda kolonizan olarak bulunur. Isıya dayanıklı bir bakteri olup 45-50°C ısıda yaşamını sürdürebilir. Hastane ortamında hastaların nemli bölgelerine (aksilla, kulak, perine gibi), katater girişlerine, lavabo, tuvalet ve duş gibi cansız yüzeylere kolonize olabilir. Hasta odalarında bulunan çiçeklerin sularından da patolojik suşlar izole edilmiştir. Ayrıca hastanede kullanılan temizlik malzemeleri (paspas, temizlik solüsyonları gibi), mekanik ventilatörler, gıda ve gıda üretim cihazları da *P. aeruginosa* için kaynak oluşturabilmektedir (3).

Nozokomiyal *P. aeruginosa* dışında, toplum kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonları da giderek artan bir sıklıkta karşımıza çıkmaktadır (4). Uzun süre solüsyonda kalan kontakt lenslerin kullanılmasına bağlı *P. aeruginosa*'ya bağlı ülseratif keratit geliştiği bildirilmiştir (5, 6). Ayrıca otitis eksternanın da en sık nedenlerinden biri *P. aeruginosa*'dır (7). Özellikle tenis oynayan çocukların ayaklarında ayakkabıların *P. aeruginosa* ile kolonizasyonuna bağlı yara yeri enfeksiyonları bildirilmiştir (8).



Nozokomiyal *P. aeruginosa* enfeksiyonları sıklıkla; mekanik ventilasyon uygulaması, antibiyotik kullanımı, kemoterapi uygulanması ve cerrahi girişimlerle ilişkili kabul edilir (9).

*P. aeruginosa* esas olarak fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. Patojenik ve patojenik olmayan suşlar arasındaki temel farklılık, patojenik suşların virulans faktörleri üretebilme kapasitesidir (10).

Çeşitli virulans faktörlerinin katkısı ile sepsisemi, üriner enfeksiyon, akut veya kronik akciğer enfeksiyonu, endokardit, dermatit ve osteokondrit gibi enfeksiyonlara yol açar. Öncelikle bakteri; konak savunmasının ilk aşamasını oluşturan anatomik ve fizyolojik bariyerleri aşarak adezyonu ve kolonizasyonu gerçekleştirir, sonrasında bulunduğu bölgede çoğalarak yeterli sayıya ulaşmayı hedefler. Hedef sayıya ulaşmasını takiben lokal invazyon süreci başlar. Bu dönemde bakteri kontrol altına alınamazsa yaygın sistemik enfeksiyona yol açar (11).

*P. aeruginosa* antibiyotiklere direnç geliştirme konusunda oldukça başarılıdır. Dış membran yapısındaki lipopolisakkaritler doğal bariyer oluşturarak çoğu antibiyotiğin penetrasyonunu engeller. Biyofilm oluşturarak koruyucu bir matriks içinde kolonize olması, antibiyotiklerden korunmasını sağlar. Florokinolonlar, bazı aminoglikozidler ve imipenem gibi sınırlı sayıda antibiyotiklere karşı hassas olmakla beraber giderek artan bir direnç sorunu söz konusudur ve bu hassasiyet de suşlar arasında farklılıklar gösterir (12).

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri ekstrasellüler polisakkaritler (EPS), proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır. Biyofilmin temel birimi mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler bir veya daha fazla türde bakteri hücresinden oluşabilir. Biyofilm, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları müköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, “mikroplar şehri” olarak tanımlanmıştır (13).

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak herşeyden önce ciddi bir savunma sistemi geliştirmektedir. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi birtakım

fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilm içindeki mikroorganizma; besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı serbest yaşayan bakterilere göre daha dirençlidirler. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekstrasellüler polisakkaritler (bulduğu bakteriyi çekim alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan, antibiyotik etkisinden korur) savunmada önemli rol oynar (14).

Konak için, biyofilmlerin oluşturduğu savunma sisteminin bir diğer önemi ise biyofilm içerisindeki mikroorganizmanın antimikrobiyallere karşı toleransının planktonik formlarına göre 500-1000 kat kadar fazla olmasıdır. Buna bağlı olarak patogenezinde biyofilmlerin rol aldığı hastalıklarda antimikrobiyal dirence bağlı olarak ciddi tedavi zorlukları ortaya çıkmaktadır (15).

Mikroorganizma çevreye uyum sağlayabilirken hem metabolik açıdan değişikliğe uğramış organizmanın duyarlılığı değişmekte hem de ortamdaki metabolitlerin kullanıma bağlı konsantrasyonu değişmektedir. Buna bağlı olarak da anti mikrobiyal etkinlik de olumsuz yönde etkilenebilmektedir (16). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan ve/veya ventilatöre bağlı hastalarda çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır (17).

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gelişen *P. aeruginosa*'ya bağlı enfeksiyonların tedavisinde, antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre iyi bir seçenekmiş gibi görünen kolistin antibiyofilm etkinliği ile ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde yatmakta olan hastalardan gönderilen balgam ve derin trakeal aspirat kültürlerinden izole edilmiş ve in vitro endotrakeal tüp üzerinde matür biyofilm tabakası oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ambroksol, kolistin, ambroksol ve kolistin etkilerinin araştırılması ve antibiyofilm etkinliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

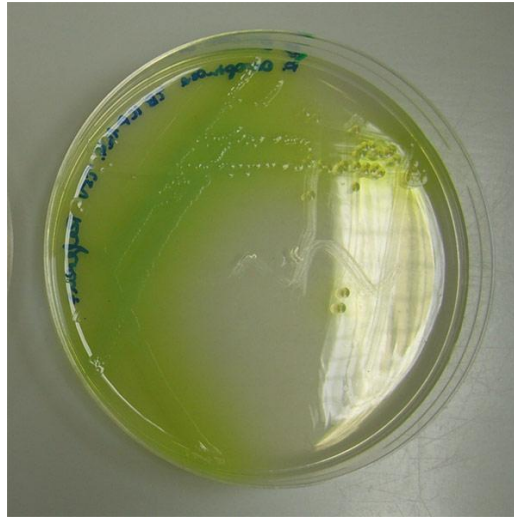
## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

#### 2.1.1. Mikrobiyoloji

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonadaceae* ailesinin major patojeni olup Gram negatif bir basildir. *P. aeruginosa*'nın boyu 1-3 µm ve genişliği 0.5-1 µm arasında değişmektedir. Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor oluşturmazlar. Tek polar flajellası ile hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flajella bulunabilir (18).

*P. aeruginosa*'nın değişik pigmentleri vardır. Kökenlerin çoğunluğu mavi-yeşil bir ekstraselüler pigment olan pyosiyanın pigmenti oluşturur (Şekil-1). Pyosiyanın; phenazine yapısındadır, koloniye rengini veren esas pigmenttir. Bu pigment yalnızca aerop ortamda oluşur, tanı değeri yüksektir. Pyosiyanın kloroformda erir. *Pseudomonas* spp. floresein pigmenti de yapabilirler. Floresein pyoverdin yapısında, soluk sarı renklidir. Özel besiyerlerinde ve UV (ultraviöle) ışığında (wood lambası) daha iyi gözlenebilir. Daha seyrek rastlanmakla beraber; Pyorubin; kırmızı, pyomelanin; kahverengi-siyah renkte koloni oluşturan pigment yapabilirler. Diğer pigmentlerin varlığı halinde pyosiyanın pigmentinin maskelenmesi söz konusu olabilir (19).



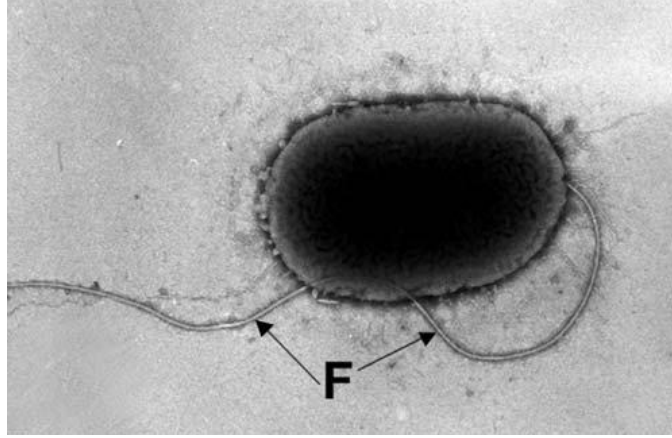
Şekil 1. *P. aeruginosa* Mavi-Yeşil Pigment Görüntüsü (20)

İsmini aldığı ‘‘aeruginosa’’ kelimesi de bir çok klinik izolatta görülen renk tonundan gelmektedir. *P. aeruginosa* çok farklı morfolojilerde koloni oluşturabilir. *P. aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virulansı daha yüksek olan diğer tipte, alginat üretimi sonucu mukoid özellikte koloniler gözlenir. Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondulan yapıda koloniler oluşturur. Bazıları hücre dışına alginat salgıladıklarından mukoid koloniler yapar (21). Genellikle  $\beta$  hemoliz oluştururlar. Eozin Metilen Blue (EMB), McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. Besiyerinde kendine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2 aminoasetofenon’a aittir ve *P. aeruginosa*’ya özgüdür (22).

*P. aeruginosa* hemen tüm besi yerlerinde kolaylıkla üreyebilmektedir. En iyi aerobik şartlarda üreyebilmesine karşın anaerobik ortamda da üreyebilmektedir. *P. aeruginosa*’nın nutrisyonel gereksinimleri oldukça basittir. Distile su içinde bile üreyebilmesi ne kadar az besin ile yetinebildiğinin göstergesidir. *P. aeruginosa* karbonhidratları fermentasyonu gerçekleştirmez fakat glukoz, fruktoz ve ksilozdan asit üretebilmesine rağmen laktoz ve sükrozu fermente edemez. Oksidaz kuvvetli pozitifdir. Yani sitokrom C oksidaz içeren elektron transport zinciri sistemine sahiptir. Sitokrom C oksidaz içermeleri *Pseudomonas* cinsini *Enterobacteriaceae* ailesinden ayıran temel özelliklerdendir. Optimal büyüme 42 derecedir. Üç şeker agarda alkali reaksiyon gösterir, sitrat ve L-arjinin dehidrolaz pozitifdir. *P. aeruginosa* L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatifdir ve hidrojen sülfid üretmez (23).

*P. aeruginosa* monotriş flagella ve yüzeyi fimbriya kaplı bir yüzeye sahiptir (Şekil-2). Hemen hemen tüm suşlar alginat (bir deniz yosunu türü olarak bilinen ‘‘varek’’in ürettiği alginata benzediği için) olarak bilinen EPS üreten genlere sahiptir. Bu madde literatürde mukoid ekzopolisakkarit olarak dadeçmektedir (24). *P. aeruginosa*’nın etken olduğu özellikle kistik fibrosis hastaları başta olmak üzere kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabetik ayak gibi kronik yara yeri enfeksiyonları ve yabancı

cisim enfeksiyonlarının kimyasal temelini oluşturur. Genellikle çevreden ve nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının non-mukoid özellikte olduğu düşünülmektedir oysa non mukoid suşların büyük bir çoğunluğu in vitro şartlarda düşük düzeyde alginat polisakkarit üretmektedir (1, 25). Son yıllarda ekstrasellüler polisakkarit yapısının pelikül ve biyofilm oluşumunda rol aldığı anlaşılmış olup patogenezdaki önemi vurgulanmaktadır (2, 26).



**Şekil 2.** *P. aeruginosa* Flagella ve Fimbria Elektron Mikroskop Görüntüsü (27)

Çevreden ve nozokomiyel enfeksiyonlarda elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının sadece %10-30'u O yan zincirine sahiptir ve saf lipopolisakkarit (LPS) üretebilmektedir. Geriye kalan *P. aeruginosa*'larda LPS molekülü içerisinde lipid A, dış ve iç çekirdek bölge (core region) yer alırken O yan zinciri içermez. Son yıllarda yapılan çalışmalarda LPS dış çekirdek bölgesinde O yanzincirine sahip suşlardan yapısal olarak farklılık gösteren O yan zinciri olduğu gösterilmiştir. Dış membranları Gram negatif bakteriler için ortak olan çeşitli fonksiyonları üstlenmiş (üreme ve metabolizma gibi) dış membran proteinleri içerir. *P. aeruginosa* için yapılan incelemelerde 300'den fazla dış membran proteini olduğu gösterilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyonları ise büyüme koşulları veya bakterinin fenotipine göre değişkenlik göstermektedir (10, 11, 28, 29).

*P. aeruginosa* antibiyotiklere direnç geliştirme konusunda oldukça başarılı bir bakteridir. Dış membran yapısındaki LPS doğal bariyer oluşturarak çoğu antibiyotiğin penetrasyonunu engeller. Biyofilm oluşturarak koruyucu bir matriks içinde kolonize olması, antibiyotiklerden korunmasını sağlar. Doğal ortamda basiller, aktinomiçes ve mantarlarla bir arada olması doğal antibiyotiğe karşı rezistans geliştirmesini sağlar. Antibiyotik rezistans plazmidleri içerir ve transdüksiyon ve konjugasyon ile bunları transfer eder (30).

Florokinolonlar, bazı aminoglikozidler ve imipenem gibi sınırlı sayıda antibiyotiklere karşı hassas olmakla beraber giderek artan bir direnç sorunu söz konusudur ve bu hassasiyet de suşlar arasında farklılıklar gösterir (12, 31).

### **2.1.2. Tarihçe**

Modern mikrobiyolojinin gelişmesinden önce Dogget ve arkadaşları tarafından *P. aeruginosa*'nın ciddi yara yeri ve cerrahi enfeksiyonlarının etkeni olduğu gösterilmişti. Sédillot 1850 yılında cerrahi pansuman malzemeleri üzerinde enfeksiyona bağlı mavi-yeşil akıntı olduğunu; 1862 yılında Luke mavi-yeşil renkli pülden aldığı örneğin mikroskopik incelemesinde basiller gördüğünü bildirmiş. Gessard, 1882 yılında enfekte alanlardan izole ettiği mikroorganizmaya *Bacillus pyocyaneus* adını vermiş. Osler 1925 yılında, sağlıklı dokuların tersine hasarlı dokularda fırsatçı bir mikroorganizma olabileceğini öne sürmüştür. *P. aeruginosa* 1960'lı yıllarda immüno-kompromize hastalarda, yanık yaralarında ve kistik fibrosisli hastalarda major etken patojen olarak önem kazanmıştır. Sonraki yıllarda ise *P. aeruginosa* nozokomiyal akciğer, kan akımı ve üriner enfeksiyonların en ciddi patojeni olarak modern tıpta yerini almıştır. *P. aeruginosa*'nın hızlı antibiyotik direncine yol açabildiği, bazı suşlarının çok ilaca dirençli hale gelebileceği tespit edildikten sonra özellikle antipseudomonal ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar başlatılmıştır (32).

### 2.1.3. Epidemiyoloji

*P. aeruginosa* minimum beslenme koşullarında bile hemen tüm çevresel şartlarda üreyebilmesi nedeniyle öncelikle önemli bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmiştir. Hastane dışında *P. aeruginosa* toprakta, suda ve bitkilerde bulunmakla birlikte insanlarda ve hayvanlarda kolonizan olarak bulunur. Kırkbeş – elli derece ısıya dayanıklıdır; çözülmüş karbon dioksit, sülfür, fosfor, demir ve divalan kationları karbon kaynağı olarak kullanabildiğinden kolaylıkla distile suda yaşayabilmektedir. Asidik (pH<4.5) ortama dayanıksızdır. Hastane ortamında hastaların nemli bölgelerine (aksilla, kulak, perine gibi), katater girişlerine, lavabo, tuvalet ve duş gibi cansız yüzeylere kolonize olabilir. Hasta odalarında bulunan çiçeklerin sularından da patolojik suşlar izole edilmiştir. Ayrıca hastanede kullanılan temizlik malzemelerinden (paspas, temizlik solusyonları gibi), mekanik ventilatörler, gıda ve gıda üretim cihazları da *P. aeruginosa* için kaynak oluşturabilmektedir (3, 23).

Nozokomiyal *P. aeruginosa* dışında, toplum kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonları da giderek artan bir sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. Özellikle çeşitli banyo küvetleri, yüzme havuzu ve diğer su rezervuarlarının kullanıldığı banyo türlerini kullananlarda toplum kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına rastlanmaktadır (33).

Uzun süre solüsyonda kalan kontakt lenslerin kullanılması ile ilişkili olarak *P. aeruginosa*'ya bağlı ülseratif keratit geliştiği bildirilmiştir (5, 6). Ayrıca otitis eksternanın da en sık nedenlerinden biri de *P. aeruginosa*'dır (7). Özellikle tenis oynayan çocukların ayaklarında ayakkabıların *P. aeruginosa* ile kolonizasyonuna bağlı yara yeri enfeksiyonları bildirilmiştir (8). Göz travması veya cerrahisi sonrası *P. aeruginosa* endoftalmiti, intravenöz ilaç kullananlarda endokardit olguları bildirilmiştir (34, 35).

Nozokomiyal *P. aeruginosa* enfeksiyonları sıklıkla; mekanik ventilasyon uygulaması, antibiyotik kullanımı, kemoterapi uygulanması ve cerrahi girişimlerle ilişkili kabul edilir (9). Tüm bunların ötesinde toplumda küçük bir oranda normal flora elemanı olarak bulunmaktadır. Bunun nedeni yoğun bakım ünitelerinde tedavi almış ve *P. aeruginosa* kolonize kişilerin topluma *P. aeruginosa*'yı taşıması şeklinde

ifade edilmektedir (36, 37). Yanık yaraları olan hastalar *P. aeruginosa* enfeksiyonu için ciddi risk altında idi ancak son yıllarda modern yanık merkezlerinin geliştirilmesi, etkin topikal tedavi ve yeterli debridman uygulamaları ile *P. aeruginosa* enfeksiyon insidansı önemli oranda azalmıştır (38). Sağlıklı bireylerde; boğaz, nazal mukoza veya ciltte %7 oranında *P. aeruginosa* taşıyıcılığı mevcuttur. Dışkıda taşıyıcılık oranı ise %24'e kadar çıkmaktadır (39).

İnvaziv *P. aeruginosa* enfeksiyonundan önce; sıklıkla kolonizasyon gerçekleşir, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların %50'sinin önceden kolonize olduğu tespit edilmiştir. Kolonize hastaların hangisinin invaziv enfeksiyona gideceğine karar vermek veya başlangıç kaynağının ne olduğuna ya da bulaş şeklini bilmek çok zordur. Özellikle nozokomiyal salgınlarında kaynak genellikle kolonize bir hasta, nemli alanlar (duşlar, tuvaletler, vazolar vb. ) veya pişirilmemiş sebzeler olabilir. Birçok hastanın, özellikle mekanik ventilasyon uygulananların, üst solunum yolları *P. aeruginosa* ile kolonize olur fakat çok azında pnömoni gelişir (40). Gastrointestinal sistemin (GİS) *P. aeruginosa* ile kolonizasyonu genellikle antibiyotik kullanımına sekonder floranın hasara uğraması sonucu gelişir, GİS'den zaman zaman aspirasyon sonucu solunum yolları da kolonize olabilir ve pnömoniyeye yol açabilir. Selektif GİS dekontaminasyonunun yoğun bakım ünitelerinde *P. aeruginosa*'ya bağlı ventilatör ilişkili pnömoni mortalitesini azalttığı yönünde birçok çalışma mevcuttur (41-43). Bununla birlikte yapılan meta analizlerde selektif GİS dekontaminasyonunun etkinliği doğrulanmamıştır (44).

Hastane ortamında *P. aeruginosa* kaynaklarının ve prevalansının tespiti epidemiyolojik açıdan enfeksiyon kontrolünü sağlamak için şarttır. Nozokomiyal ortamda kaynak olarak tespit edilen *P. aeruginosa* 'nın tiplendirilmesi, bakteriosin (pyosiyanin) yapısı ve antibiyotik duyarlılık paterninin analizi yapılmalıdır (45). Nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojisi ve insidansı yerel özelliklere göre sürekli değişim göstermektedir ancak *P. aeruginosa* enfeksiyonları (özellikle nozokomiyal pnömoni ve ventilatör ilişkili pnömoni şeklinde) rölatif olarak son 30-40 yıldır benzer oranlarda karşımıza çıkmaktadır. Amerika'da 2003 yılında yapılmış bir çalışmada *P. aeruginosa*; nozokomiyal pnömonilerde %18.1; üriner sistem enfeksiyonlarında %16.3; cerrahi alan enfeksiyonlarında %9.5 kan akımı



enfeksiyonlarında %3.4 oranında etken olarak tespit edilmiştir (46). *P. aeruginosa* ile ilgili bir diğer önemli problem ise bir çok ilaca direnç geliştirebilmesi ve tedavi edilmesi güç enfeksiyonlara yol açmasıdır (47).

### 2.1.3. Virulans ve Patojenite

Bakteriyel virulans faktörlerinin formuna ve fonksiyonlarına bağlı olarak geniş ve değişken bir patolojik süreçten bahsetmek mümkündür. Farklı fonksiyonlara ve öneme sahip virulans faktörleri konakta çeşitli patolojik olaylara yol açar. Organizmanın yayılmasını önleyen doğal immün sistemle bakteriyel çoğalmayla başlayan patolojik inflamasyon süreci arasında önemli bir denge söz konusudur. Dengenin hangi yöne kayacağı ve enfeksiyonun ciddi veya benign seyirli olacağı konak faktörleri kadar bakteri virulansı ile de ilişkilidir. Son birkaç dekatta *P. aeruginosa* virulansı ile ilişkili moleküler, hücresel ve hayvan çalışmaları yapılmış ve *P. aeruginosa* enfeksiyonları ile ilgili önemli bilgiler edilmiştir. *P. aeruginosa* esas olarak fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. Patojenik ve patolojik olmayan suşlar arasındaki temel farklılık, patojenik suşların virulans faktörleri üretebilme kapasitesidir. Virulans faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi kompleks bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır (48). *P. aeruginosa*'nın başlıca virulans faktörleri tablo-1'de özetlenmiştir.

Virulans faktörlerinin çoğunun ekspresyonu bazı çevresel uyarılara bağlıdır: Ortamdaki demir iyonu, nitrojen, ısı, ozmolarite gibi. Virulans faktörlerinin ekspresyonu genel olarak yüksek hücre dansitesine ulaşıncaya kadar çok belirgin değildir. Hücre dansitesine bağlı olarak ortaya çıkan quorum sensing (QS) (=çoğunluğu algılama) molekülleri virulans genlerinin kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynar (49).

#### **2.1.4.1. Patogenez**

*P. aeruginosa* enfeksiyonu, genellikle konak savunma mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu ortaya çıkar. Çeşitli virulans faktörlerinin katkısı ile septisemi, üriner enfeksiyon, akut veya kronik akciğer enfeksiyonu, endokardit, dermatit ve osteokondrit gibi enfeksiyonlara yol açar. Öncelikle bakteri; konak savunmasının ilk aşamasını oluşturan anatomik ve fizyolojik bariyerleri aşarak adezyonu ve kolonizasyonu gerçekleştirir, sonrasında bulunduğu bölgede çoğalarak yeterli sayıya ulaşmayı hedefler. Hedef sayıya ulaşmasını takiben lokal invazyon süreci başlar. Bu dönemde bakteri kontrol altına alınamazsa yaygın sistemik enfeksiyona yol açar (48, 49).

#### **2.1.4.2. Adezyon ve Kolonizasyon**

*P. aeruginosa* adezyonu 2 aşamalıdır: Primer adezyon ve Sekonder adezyon. Primer adezyonda bakteri epitele veya cansız yüzeye geri dönüşümlü, kolay ayrılabilir şekilde tutunur. Primer adezyonun gerçekleşmesi için çeşitli faktörlerin rolü vardır. Bakteri ve hücre yüzeyinin hidrofobisitesi, van der Waals gücü ve hidrodinamik etmenler bakterinin hücreye tutunmasını etkilemektedir. Sayılan faktörler arasında en önemli etmenin hidrofobisite olduğu gösterilmiştir (49). Deri ve mukozalarda; travma, ciddi yanık, deri bütünlüğünün bozulması, normal florada değişiklik, kemoterapiye bağlı nötropeni ve mukozal hasar, diabetes mellitus, kistik fibrosis, AIDS gibi immün sistemin hasarlı olduğu durumlarda ilk savunma mekanizmalarının yetersizliğine bağlı olarak bakterinin adezyonu kolaylaşır (48, 49).

Sekonder adezyon spesifik proteinler ve bu proteinlerin karşılıklı etkileşimi sonucu gerçekleşir. Bakteri yüzeyindeki piluslar, fimbriyalar veya fimbiller gibi ligandların epitel hücrelerindeki spesifik reseptörlere bağlanması ile oluşan geri dönüşümsüz adezyon aşamasıdır. *P. aeruginosa* fimbriyaları, bakteri yüzeyinde yer alan ince, kısa, düzgün çıkıntılardır. Ancak elektron mikroskopunda görülebilirler. Bakterinin yaşamı için gerekli değildirler, bakterinin çeşitli yüzeylere ve birbirine tutunması ile bu yüzeylerde üremelerinde rol oynar, küme veya film tabaka oluşturmalarını

sağlarlar. Ayrıca bakterinin ürettiği bazı proteazlar epitel yüzeyindeki fibronektini yıkarak adezin molekülleri ve pilusların yapışacağı reseptörlerin açığa çıkmasına yardımcı olurlar. *P. aeruginosa* pilusları ile siyalik asit içermeyen gangliyozyd (GM1) reseptörlerine tutunmaktadır. Bakteri tarafından üretilen nörominidaz enzimi gangliyozydlerdeki siyalik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşur (50). Sekonder adezyonun gerçekleşmesi ile birlikte bakteri çoğalmaya başlar ve konak savunma hücrelerinden korunmak amaçlı sayısı ile birlikte virulans faktörlerinin de salınımı artırmaya başlar. Bakterinin bu dönemde konak immun sistemi tarafından etkisizleştirilememesi sonucu kolonizasyon gerçekleşir. Kolonizasyon döneminde bakteri invazyon için uygun konak ortamının yanında yeterli sayıya ulaşmayı hedefler. Konak immun sisteminin zayıfladığı ve yeterli sayının elde edildiği dönemde ise bakteri QS moleküllerinin de etkisi ile bir birlik halinde hareket eder ve lokal invazyonu başlatır. Lokal invazyonu takiben bakteri konak savunmasının yetersiz kalması ile birlikte sistemik enfeksiyona yol açar (48-50).

#### 2.1.4.3. Virulans Faktörleri

**Tablo 1.** *Pseudomonas aeruginosa* 'ya Ait Virulans Faktörleri

Enzim ve Proteazlar	Adezyon Faktörleri	Pigmentler	Toksinler	Kapsül
Elastaz	Flajella, Fimbria, Piluslar	Piyosiyenin	Endotoksin	
Fosfolipaz C	Alginat	Piyoverdin	Ekzotoksin A	
Kollagenaz		$\alpha$ -oksifenazin	Ekzotoksin S	
Jelatinaz		Piyorubin		
Alkalın proteaz		Piyosin		
Nötral proteaz		Fluoresein		
Lökositidin				
Lesitinaz				

#### **2.1.4.3.1. Enzim ve Proteazlar**

Epitelyal yüzeye yapışarak kolonize olan *P. aeruginosa*'nın doğal bariyerleri geçebilmek için doku invazyonu yapmasında salgıladığı ekstraselüler enzimler ve toksinlerin rolü büyüktür. Bu yolla fizyolojik bariyerleri bozar, hücre yıkımı ile konakçıya zarar verir, organ fonksiyonlarını bozar. *P. aeruginosa*, değişik ekstrasellüler ürünler sentezleyip, hücre dışına salgılayarak ilk aşamada kolonize olmuş bakterinin doku hasarı oluşturması ve yayılmasına katkı sağlar. Histolojik olarak *Pseudomonas* enfeksiyonlarında dokuda yaygın olarak nekroz, mikroapse formasyonları ve damar yapılarında bozulma ve kanama gözlenmiştir (51). Bu doku değişikliklerinin oluşmasında *Pseudomonas*'ın ürettiği Elastazın yanında alkalın proteaz, fosfolipaz C, kollajenaz, lesitinaz, jelatinaz gibi ekstrasellüler proteazlar rol oynamaktadır (52).

##### **2.1.4.3.1.1. Elastaz**

Elastin akciğerlerin genişleyip daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturur. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde elastaz çok önemli rol oynamaktadır. Elastaz; bir metalloproteazdır, kollajeni, Immunglobülin (Ig) G, IgA ve komplemanı parçalar. Fibronektini yıkar ve mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak siliyer aktiviteyi engeller. Akciğerde sürfaktan A ve D'yi parçalar. Damar duvarındaki kollajenin yıkılması ve damar bütünlüğünün bozulması ile hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına, akciğerde alveol yapısının bozulmasına yol açar. *Pseudomonas* ve oluşan fırsatçı enfeksiyonda elastaz mikroorganizmanın epitelyal bariyer gibi doğal bariyerlerin bütünlüğünü bozacak doku invazyonu yapmasını sağlar. Ayrıca elastaz Interlökin (IL) -8 üretimini de uyararak proinflamatuvar etki gösterir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik aktivitesinden Las A proteinaz ve Las B elastaz sorumludur (53).

Las-A, 22-kDa ağırlığında, çinko içeren bir metalloproteazdır. Ayrıca bir ekstraselüler serin proteazıdır. Las-A elastindeki Gly-Gly-Ala zincirindeki Gly-Ala köprülerine bağlanarak elastolitik etki yapar. Elastin yanında fibrin ve kolajeni de hasara uğratar. Kendisi elastolitik aktiviteye sahip olduğu gibi elastaz ve diğer proteazların elastolitik etkisini artırır. Elastaz ile sinerjistik olarak çalışır. Las-A aynı zamanda stafilolitik proteazdır. *Staphylococcus aureus* hücrelerini hücre duvarında bulunan peptidoglisin-peptidoglikan köprülerini yıkarak lizise uğratar. Bu özellik Las-A aktivitesini göstermekte kullanılır (54). Las-B 33-kDa ağırlığında bir diğer çinko metalloproteazdır. Las-A'nın yıprattığı elastini parçalar. Las-B elastazın proteolitik aktivitesi oldukça fazladır (alkali proteazın yaklaşık 10 katı). Enfeksiyonun başlangıç aşamasında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum  $\alpha$ 1-proteaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar (55). Deneysel çalışmalarda intratrakeal *Pseudomonas* elastazı uygulanan tavşanlarda intraalveolar hemoraji geliştiği gösterilmiştir (56). Las-A ve Las-B mutant *P. aeruginosa* suşlarının epitel hücreye invazyonunun azaldığı 2003 yılında yapılmış bir çalışmada gösterilmiştir (57).

#### **2.1.4.3.1.2. Fosfolipaz C**

Hemolitik aktivitesine göre 2 tip fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidil kolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolin ve fosfatidil serini hidrolize eder. En önemli fonksiyonu akciğer enfeksiyonu sırasında majör akciğer sürfaktanı olan fosfatidil kolinin parçalanmasıdır. *P. aeruginosa*'nın akciğer epiteline adezyonunu kolaylaştırır ve sitotoksik aktivite göstererek lokal doku hasarına yol açar. Ek olarak konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılar (58).

### **2.1.4.3.1.3. Alkalın Proteaz**

*P. aeruginosa*'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. Kırkdokuz-kDA ağırlığında olup en iyi alkali pH'da aktivite gösterir. Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kornea enfeksiyonlarının patogenezinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (59). Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkalın proteaz tarafından eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*'nın invazyonunda rol alan diğer proteazlar da virulansa katkıda bulunur. Lökositin nötrofillere ve çoğu ökaryot hücreye toksik etki gösterir. Lesitinaz lesitini parçalayarak enfeksiyonun ilerlemesinde rol oynar (60).

### **2.1.4.3.2. Adezyon Faktörleri**

#### **2.1.4.3.2.1. Flajella, Fimbria ve Piluslar**

Flajella, fimbria ve pilusların temel fonksiyonu bakteri motilitesini sağlamaktır. Ayrıca geri dönüşümsüz adezyonun da ana basamağında rol oynarlar.

Motilite bakterinin simbiyotik ve patojenik özelliklerini göstermesi için gerekli bir fonksiyondur. Motilite sayesinde bakteri besin elemanlarına ulaşır, toksik maddelerden kaçır, konak hücrelerine translokasyon yapar, oluşturduğu koloni içerisinde yer değiştirir, biyofilm içinde hareket eder. Motilite için bakteri flagella ve pili oluşturmaları ve gereken enerjiyi sağlamalıdır (61).

Motilite bakteri fizyolojisinde oldukça ilginç ve önemli bir yer tutar. Bakteri hareketliliği ile ilgili çalışmalar üç farklı tip motilite olduğunu göstermiştir; swimming (yüzme), swarming (tırmanmak) ve twitching (seğirmek) (62). Bakterinin bu organellarla motilitesini gerçekleştirebilmesi için öncelikle bakterinin yüzeye tutunması ve biyofilm tabakası oluşturması gerekir (61, 62).

*P. aeruginosa* aynı polde yer alan tek flajellası ile hareketlidir ve birden fazla tip IV pili içerir (63).

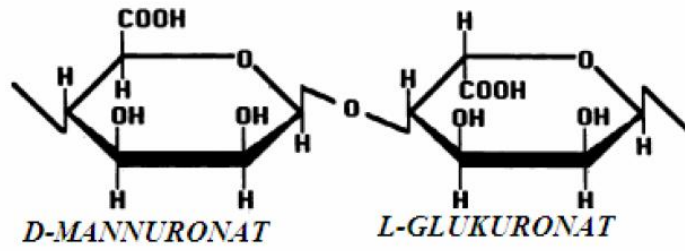
*P. aeruginosa*'nın hücre yüzeyi elemanlarından olan flajella bakterinin sıvı ortamdaki motilitesinden sorumludur (swimming). Flagella aynı zamanda swarming hareketinden de sorumludur. Hareket etme yeteneğine sahip bakterilerin sıvı ortamda yer değiştirmeleri flajellalarının dönerek hareket etmesi ile olur (64).

Bakterinin katı ve yarı katı yüzeylerde hareket etmesi için farklı mekanizmalar gereklidir. *P. aeruginosa*'nın katı yüzeydeki ilerlemesi twitching ile olur. Tip-IV pili ile sağlanır. Twitching sırasında pilus uzayarak yüzeydeki bir noktaya tutunur. Daha sonra kısalarak bakteriyi o noktaya doğru çeker ve hücrenin yüzey üzerinde ilerlemesi sağlanır. Pili aynı zamanda bakterinin epitelyal yüzeye yapışmasında da önemlidir, böylece virülansa katkıda bulunur (65, 66). Tip IV pili biyogenez ile ilgili yaklaşık 34 ayrı gen saptanmıştır ve bu genlerden herhangi birisinin mutasyonu pilisiz bakteri oluşumu ile sonuçlanmakta ve bakteri twitching hareketini yapamamaktadır. Tip-IV pili biyofilm oluşumunda adezyon ve mikrokoloni oluşumu için gereklidir. Tek bakterinin adezyonu ve bir bakteri tabakası oluşumundan sonra twitching motilitesinde mikrokoloni oluşumunda rol oynar (67).

Bakterinin yarı katı yüzeyde ilerlemesi swarming ile olur. Swarming yapan hücrelerin boyu normal haline göre uzar ve flajella yapısı değişir. Normal şartlarda tek polar flajellası olan *P. aeruginosa* swarming yaparken çift polar flajellaya sahiptir (68). Swarming flajella yapısındaki bu değişikliğe ek olarak tip-IV pili ve yüzey aktif madde olarak rhamnolipit sekresyonunu gerektirmekte, bunlardan birisinin eksikliği bakterinin bu tür motiliteyi yapamamasına neden olmaktadır (69).

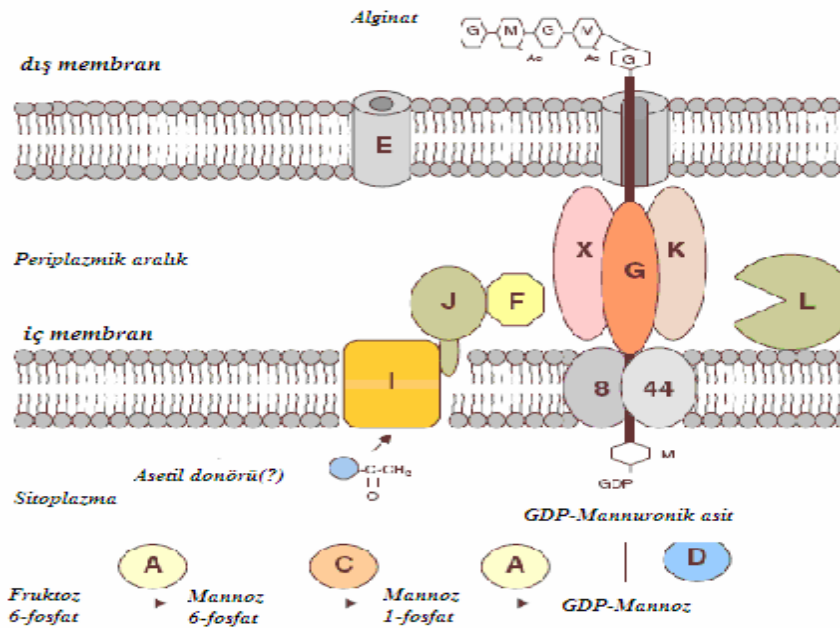
#### **2.1.4.3.2.2. Alginat**

*P. aeruginosa*'ya özgün virulans faktörlerinden bir tanesi alginattır. Hücre dışı mukoid bir madde olan alginat,  $\beta$  1-4 glikozit bağları ile birbirine bağlanmış olan D-mannuronat ve L-glukuronat kopolimeridir (Şekil-3). Alginat; kistik fibrozis, üriner enfeksiyonlar, biyoprotez ve doğal çevrede oluşan tedavisi güç, inatçı *Pseudomonas* enfeksiyonlarına neden olan bakteriyel biyofilmin yapısındaki matriks polimerde önemli rol oynar (70).



**Şekil 3.** Alginatın Kimyasal Yapısı (72)

Alginat biyofilm matriksi içinde hücrelerin bir arada kalmasını sağlayan önemli bir virulans faktörüdür. Bu matriks içinde bakterilerin konak savunmasından, lenfosit ve fagositlerden, solunum sisteminde epitelin siliyer aktivitesinden, antikor ve kompleman sisteminden korunmasını sağlar. Epitel yüzeyi üzerinde yer alan müköz tabakası bakterinin adezyonunu engelleyen bir savunma mekanizmasıdır. Özellikle solunum sistemini döşeyen epitelde bakteri girişini engelleyen faktörlerden biridir. Mukoid karakterdeki *Pseudomonas* suşlarının ürettiği bir ekzopolisakkarit olan alginat bakterinin bronşlardaki müköse yapışmasına yardımcı olur. Alginat üretimi ile birlikte bakterinin etrafında viskoz birjel oluşur. Alginat üreten bakterilerin oluşturduğu koloniler, alginat üretmeyen kolonilerden parlak görüntüleri ile kolaylıkla ayırt edilir (71).



**Şekil 4.** Alginat Sentezi (72)



Alginatın öncü molekülü guanosine difosfat (GDP) -mannuronik asittir. GDP-mannuronikasit 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 alt birimden 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. 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. Epimerizasyondan sonra mannuronat kalıntılarının bir kısmı AlgF, AlgJ ve AlgL gen ürünleriyle  $O_2$  ve/veya  $O_3$  pozisyonlarına asetillenir. O-asetilasyon sonrasında alginat kopolimeri, dış membran proteini AlgE boyunca hücre dışına taşınır (72, 73).

#### **2.1.4.3.3. Pigmentler (Piyosiyenin ve Pyoverdin)**

Piyosiyenin mavi renkli, kloroformda eriyen bir pigmenttir. *P. aeruginosa* tarafından üretilir, bakterinin fizyolojisinde ve patogeneğinde önemli rol oynarken, oluşturduğu mavi renk de tanı konmasında kolaylık sağlar (74). Piyosiyenin üretimi ortamdaki karbon ve azot kaynaklarından etkilenir. Ortamda düşük fosfat iyon konsantrasyonu ve yeterli sülfat iyonu varsa üretimi artar. Demir iyon konsantrasyonu da önemlidir. Düşük fosfat iyonu olan ortama, demir iyonu eklenmesi ile sentezi artar. Piyosiyenin, NADH (nikotinamid adenin dinükleotid) bağımlı oksijenin süperoksite veya hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eder ve böylece özellikle oksijenden zengin akciğer gibi organlarda ciddi doku harabiyetinde önemli rol oynar. Piyosiyenin, N-methyl-1-

hydroxyphenazine ve iki elektron alarak redüksiyona uğradığında renksiz lökopyosyanine dönüşür. Redüksiyon kapasitesi olduğu için *P. aeruginosa* metabolizmasında solunum için gereklidir (75). Piyosyanin'in piyoverdin ile birlikte 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 (76). Pyosyanin bakteri metabolizmasındaki bu önemli rolü yanında sitotoksik özelliği ile de virulansa katkıda bulunur. Pyosyaninin ökaryot hücrelerde hücre solunumunu engellediği, siliya aktivitesini bozduğu, epitel hücresi ve lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Pyosyanin otooksidasyon yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açmakta ve böylece sitotoksik etki göstermektedir (77).

#### **2.1.4.3.4. Toksinler (Ekzotoksin A ve Ekzoenzim S ve Endotoksin)**

*P. aeruginosa* nın ürettiği iki ekstrasellüler toksin, ekzoenzim S ve ekzotoksin A, sistemik enfeksiyon tablosunda rol oynar. Ekzoenzim S, adenzindifosfat ribozil transferaz görevi görür ve ökaryot konakçı hücresinde ADP (adenzindifosfat) molekülünü ribozilleyerek GTP (guanozin trifosfat) -bağlayıcı proteini modifiye eder. Bu özellikleri ile fagositik hücrelerin fonksiyonlarını bozar ve diğer organlarda yaptığı değişikliklerle *Pseudomonas aeruginosa* invazyonuna zemin hazırlar.

Ekzotoksin A ise tamamen difteri toksinine benzer şekilde konakçı hücresinde Elongasyon Faktör 2'yi ADP ribozilasyonuna uğratar. Hücre protein sentezi bozulur ve hücre ölümü oluşur. Ekzotoksin A' nın oluşturduğu hücre ölümü ve doku hasarı ile bir taraftan sistemik belirtiler ortaya çıkarken bir taraftan da bakterinin üreyip çoğalması için elverişli bir ortam oluştururlar. Ekzotoksin-A hücre dışı bir enzim olup *P. aeruginosa* suşlarının çoğu tarafından yapılır. Ekzotoksin A'nın lokal doku hasarı ve bakteriyel invazyonda rolü vardır. Ekzotoksin-S hücrelere sitopatik etki gösterir. Bu toksini salgılamayan suşlar yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlarında

daha az virülan aktivite gösterir. *P. aeruginosa* LPS lipit A, organizmanın biyolojik etkisini düzenler, endotoksin oluşumunu sağlayarak sepsise neden olur (78).

#### **2.1.4.3.5. Kapsül**

*P. aeruginosa* 'nın bazı koşullarda oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına slime

tabakası da denir. Bu yapı alginatla sonlanan tekrar eden polisakkarit polimerlerinden oluşur. Slime faktörün, konak immün sistemini etkileyerek bakterinin konak savunmasından korunduğu gözlemlenmiştir. Mikroorganizmanın nötrofil ve fagositlere karşı korumasını sağlar. Ayrıca bakteriyi opsonizasyondan ve kompleman sisteminden korur. Diğer taraftan monosit ve makrofajları stimüle eder. Lenfositler üzerine mitojenik etkilidir. T hücrelerinde agregasyona neden olur, monositlerden de Tümör Nekrozis Faktör (TNF) salgılanmasını artırır. Sonuç olarak sistemik dolaşımdaki septik şok mediatörlerinin artmasına sebep olarak *P. aeruginosa* 'ya bağlı septik şok patogenezinde önemli rol oynar (79).

## **2.2. BİYOFİLM**

### **2.2.1. Tanım**

İlk olarak 17. yüzyılda Lewenhoek'in dışından almış olduğu örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra, 1978 yılına kadar biyofilm varlığından bahsedilmemiştir. Burada bakterinin büyük bir kısmının biyofilm adı verilen besleyici bir oluşum içinde olduğu ve bakterinin yapışmış şekli ile serbest bulunan şekli arasında farklılık olduğu gösterilmiştir (80).

Yapılan mikroskopik gözlemlerde bakterilerin doğadaki sıvısal ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının %99.9 oranında biyofilm aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Artık günümüzde derin yer altı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir

(13). Biyofilm yıllardır endüstriyel bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere birçok kronik enfeksiyonda da rol olduğu gösterilmiştir. Aderans, antibiyotik direnci ve fagositozda önemli rolü olduğunun bilinmesi son yıllarda tıbbi önemini artırırken; bakterilerin birbirleri ile konuşarak bir topluluk oluşturmaları ve gen alışverişi aracılığıyla ortama adapte olmaları, tıbbi önemini daha da arttırmıştır (14). Costerson ve arkadaşları, biyofilmi; bakteri tarafından üretilen ve bakterinin canlı ya da cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarit yapısında bir "glikokaliks" tabakası şeklinde tanımlamıştır. Elder ve arkadaşları ise mikroorganizmaların eksopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik olduğu yönünde bir tanımlama ortaya koymuştur. Günümüzde ise en yaygın kabul gören tanım; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (81). Bakteriler koni veya mantar görünümünde birbirlerine ve yüzeylere yapışmış mikrokoloniler şeklinde bulunur. Mikrokoloniler; primitif bir dolaşım sistemi gibi çalışan su kanalları ile çevrelenmiş durumda olup bu sistem; beslenme, atıkların atılması ve bakteriler arasındaki iletişimi sağlamaktadır (82).

### **2.2.2. Biyofilm Oluşumu**

Biyofilm oluşumu ve oluşumunu kontrol eden moleküler mekanizmalar, türlere hatta aynı türlerin farklı suşları arasında bile farklılık göstermektedir (83).

Genel biyofilm oluşumu 5 aşamada gerçekleşir.

- 1- Geri dönüşümlü yapışma
- 2- Geri dönüşümsüz yapışma
- 3- Biyofilm iskeletinin oluşumu
- 4- Mikrokolonilerin oluşumu
- 5- Hücrelerin biyofilm içerisine dağılması

### **2.2.2.1. Geri Dönüşümlü Yapışma**

Geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanma şekli olup, bakteri ve yüzey arasında oluşmaktadır. Bu yapışma şeklinin gerçekleşmesi için öncelikle bakteri ve yüzey arasında yeterli yakınlığın (<1nm) oluşması gerekmektedir. Uygun mesafede yaklaşma gerçekleştikten sonra her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak yapışma gerçekleşir. Bu güç; elektrostatik ve hidrofobik ilişki, van der Waals bağlarının gücü, ısı ve hidrodinamik güç şeklinde olmaktadır. Bakterilerin büyük çoğunluğu ve cansız yüzeyler negatif elektrik yüküne sahip olup birbirleri için itme gücü oluştururlar. Bakteri ve yüzeyler arası primer adansta en önemli etkinin hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir (83, 84).

### **2.2.2.2. Geri Dönüşümsüz Yapışma**

Yapışmanın, bakteri yüzeyindeki piluslar, fimbrialar veya fibriller gibi ligandların; ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan spesifik, geri dönüşümsüz aşamasıdır. Biyofilmin olgunlaşması, bakterinin yüzeye geri dönüşümlü olarak yapışması ile başlar. Örneğin, tip IV pili defektif mutant *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm formasyonu mikrokoloni aşamasını geçememektedir (85). Ayrıca *E. coli*'ye bağlı gelişen üriner sistem veya yabancı cisim enfeksiyonlarında, oluşan biyofilm yapısının 3 boyutlu formasyonu için tip I fimbria varlığı gereklidir (86).

### **2.2.2.3. Biyofilm İskeletinin Oluşumu ve Mikrokolonilerin Oluşumu**

Biyofilm esas olarak mikroorganizma ve EPS'den oluşur. Mikroorganizma yüzeye adezyonunu tamamlarken bir yandan da EPS üretimine başlar. Biyofilm içerisindeki karbon kaynağının %50-90'ını oluşturur. Türe göre kimyasal ve fiziksel özellikleri değişmekle beraber temel olarak polisakkaritten oluşur. Genel olarak gram negatiflerde polisakkarit yapısı nötral veya polianyoniktir. EPS, yapısı içerisindeki hidrojen bağları sayesinde fazla miktarda suyu bünyesinde barındırabilir. EPS hidrofobik olabilir ancak genellikle hem hidrofobik hem de hidrofilik karakterdedir.

EPS'nin biyofilm yapısının temel iskeletini oluşturmasının yanında diğer bir önemi ise yapısında bir çok molekölü barındırabilmesi (metal iyonlar, katyonik bileşikler, DNA, protein, lipid, fibrin, eritrosit...) ve buna bağlı olarak mikroorganizma için yaşanabilir bir mikroçevre oluşturmasıdır (87).

#### **2.2.2.4. Hücrelerin Biyofilm İçinde Dağılması**

Bakteriler oksijen kullanımı ve antibakteriyel direnç açısından tabakalı bir yerleşim gösterir. Tabakalı yapının altında kalan hücreler diğerlerine nazaran daha stabildir. Biyofilmler, genel olarak mantarimsı görünümde olup tabanında ağırlıklı olarak stasyonel fazdaki bakteriler bulunurken yüzeye doğru bakteri dağılımı seyrelmektedir. Yüzeyde daha çok difüzyona izin veren kanallar, metabolik olarak daha aktif bakteriler, konak hücre parçaları, fibrin artıkları vb. maddeler bulunmaktadır. Bakteriler bu yapı içerisinde uygun ortamın gelişmesi halinde özel bir iletişim sistemi ile haberleşerek rahatlıkla stasyonel evreden çıkarak planktonik forma geçebilmekte ve oluşmuş biyofilm içerisinde koparak vücudun başka bölgelerine ulaşabilmektedir (88, 89).

#### **2.2.3. Biyofilmlerin Önemi**

Biyofilm oluşumunun mikroorganizmalar ve konak açısından incelenbilir. Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak herşeyden önce ciddi bir savunma sistemi geliştirmektedir. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi birtakım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilm içindeki mikroorganizma; besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı serbest yaşayan bakterilere göre daha dirençlidirler. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan EPS (bulunduğu bakteriyi çekim alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan, antibiyotik etkisinden korur) savunmada önemli rol oynar (90). Konak için, biyofilmlerin oluşturduğu savunma sisteminin bir diğer önemi ise biyofilm içerisindeki

mikroorganizmanın antimikrobiallere karşı toleransının planktonik formlarına göre 500-1000 kat kadar fazla olmasıdır (15). Buna bağlı olarak patogenezinde biyofilmlerin rol aldığı hastalıklarda antimikrobiyal dirence bağlı olarak ciddi tedavi zorlukları ortaya çıkmaktadır. Biyofilmlere bağlı gelişen antimikrobiyal direncin nedeni birtakım mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır:

1 - Moleküler Filtre: Biyofilmi çevreleyen EPS etkin bariyer oluşturarak, kimyasal reaktiflerin, biosidlerin, fagosite edici ajanların penetrasyonunu kısıtlar. Bu mekanizmanın özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisinin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir (91). Seftazidim, piperasilin gibi beta-laktam antibiyotiklerin alginat jelden penetrasyonu gentamisin ve tobramisin gibi antibiyotiklerden daha hızlı olmaktadır (92).

Siprofloksasinin *P. aeruginosa*'ya penetrasyonu normalde 40 saniye iken aynı genetik yapıya sahip biyofilm oluşturmuş forma penetrasyonunun 21 dakika olması gibi çalışmalar biyofilmin bariyer fonksiyonunu destekleyen en önemli bulgulardandır. Diğer taraftan genel olarak anlaşılmıştır ki, penetrasyon kısıtlaması başlangıçta biyofilm 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, antibiyotigin öldürme işlemi devam eder. Başka bir deyişle, doz artımı yapılarak biyofilm penetrasyon kısıtlamasının önüne geçmek mümkün olabilmektedir (93).

2 - Mikroorganizmaların Büyüme/Çoğalma Hızlarındaki Değişiklikler: Bakterilerin büyüme oranlarındaki değişiklikler antibiyotik cevaplarını da değiştirmektedir. Biyofilm içindeki bakterilerin büyüme hızları planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Durağan fazdaki Gram negatif bakterilere sadece florokinolonların aktif olabildiği gösterilirken diğer bir çalışmada beslenmesi zayıflatılarak büyüme oranları düşürülen *S. aureus*'lara hiçbir antibiyotigin yeteri kadar etkili olamadığı gösterilmiştir. Ayrıca biyofilm yüzeyindeki bakterilerin besin ve oksijene rahat ulaşabilmesi, tabana yakın bakterilerin buna bağlı olarak daha

yavaş üremesi veya dorman fazda olması da biyofilm içerisinde heterojenite sağlamakta ve antimikrobiyal duyarlılık farklılıklarına yol açmaktadır (17).

3 - Mikroçevrenin Antibiyotik Aktivitesine Etkisi: Biyofilm oluşumu için gerekli pH, pCO<sub>2</sub>, 2 değerli katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, primidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir. Biyofilm oluşumunu kolaylaştıran bu mikroçevre değişkenleri özellikle aminoglikozit, tetrasiklin ve makrolidlerin antibakteriyel etkisini negatif yönden etkileyerek antibiyotik direncini oluşturmaktadır. Ayrıca mikroçevre değişikliklerine bağlı mikroorganizmalarda da fenotipik varyantlar ortaya çıkabilmektedir. Mikroorganizma çevreye uyum sağlayabilirken hem metabolik açıdan değişikliğe uğramış organizmanın duyarlılığı değişmekte hem de ortamdaki metabolitlerin kullanıma bağlı konsantrasyonu değişmektedir. Buna bağlı olarak da anti mikrobiyal etkinlik de olumsuz yönde etkilenebilmektedir (16).

4 - Quorum - Sensing (Çoğunluğu Algıma): Quorum-sensing, biyofilm içi bakterilerin birbirleriyle haberleşerek virulans faktörleri üretim özelliklerinin düzenlenmesini sağlayan bir “çoğunluğu algılama” yeteneğidir. Açıl-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 (94).

Mikroorganizmanın konak ile temel etkileşimi olan adezyon ve sonrasında kolonizasyonu gerçekleştirmesinde biyofilm oluşumu önemli bir avantaj sağlamaktadır. Mikroorganizma; yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışır. Aderans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliklerine göre biyofilm yapımına başlarlar (95).



Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar ve çok hücreli organizmalar arasında birçok benzerlik vardır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar kendi çevrelerini hissedebilirler ve bu onlara kendi metabolik aktivitelerini buna göre ayarlama olanağı sağlarlar. Bu şekilde yaşanabilir bir çevre ve topluluk oluşturma fırsatı elde ederler. Bu mikroorganizmalar buldukları ortamda elde edilebilir maddeleri maksimum oranda kullanırlar ve böylece tehlikeli şartlardan kendilerini koruyabilirler. Biyofilm içerisinde çoğaldıkça, biyofilm içi gen ekspresyon değişiklikleri meydana gelerek fenotipik heterojenite sağlanır, bu da biyofilm içinde tıpkı çok hücreli organizmalarda gözlenen hücresel farklılaşma gibi özelleşmeyi ve iş bölümünü sağlar (96).

Biyofilmler, endüstri alanında yıllardır sorun olarak karışımıza çıkarken son yıllarda tıbbi alanda da özellikle yabancı cisim kullanımının artması ve ortalama ömrün uzaması ile birlikte kronik hastalıkların giderek önemli bir sağlık sorunu haline gelmesiyle gündeme gelmiştir. Ayrıca nativ kapak endokarditi, otitis media, kronik tonsillit ve kistik fibrozisli hastalarda kolonizasyon gibi sorunlara yol açmaktadır. Tüm sentetik medikal implantlarda da (İntravasküler kataterler, protez kalp kapakları, pacemaker, ortopedik implantlar, intrauterin araçlar, üriner kataterler, endotrakeal tüpler, kontak lensler...) biyofilm oluşabildiği bilinmektedir (97).

Enfekte biyomedikal implantlarda, konakçı tarafından kompleman, fibrinojen, fibronektin, glikozaminoglikan gibi matriks proteinleri veya inflamatuvar cevap proteinlerinin indüklenmesinde biyofilm önemli rol oynamaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilere karşı makrofaj fagositik aktivitesinin veya opsonik antikorların yetersizliği, mikroorganizmanın ortamdaki temizlenmesini engellemektedir. Çevreden gelen streslerin artması ve quorum-sensing moleküllerinin etkisi ile biyofilm, içindeki bakteriyi kopartabilmekte ve septik embolilerle enfeksiyonun yayılmasına yol açabilmektedir (98). Tıbbi açıdan önemli biyofilm oluşturan bazı mikroorganizmalar Tablo-2 de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Medikal İmplantlardan İzole Edilen Biyofilm İlişkili Mikroorganizmalar

İmplant	Organizma
Santral Venöz Kataterler	Koagulaz-negatif stafilokoklar, <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>
Prostetik Kalp Kapakları	Viridans Streptokoklar, Koagulaz Negatif Stafilokoklar, Enterokoklar, <i>S. aureus</i>
Üriner katater	<i>S. epidermis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. mirabilis</i>
Kalça protezleri	Koagulaz Negatif Stafilokoklar, Hemolitik Streptokoklar, Enterokoklar, <i>P. mirabilis</i> , <i>Bacteroides</i> türleri, <i>S. aureus</i> , Viridan Streptokoklar, <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Intrauterin araçlar	<i>S. epidermis</i> , <i>Corynebacterium</i> türleri, <i>S. aureus</i> , <i>Micrococcus</i> türleri, <i>Lactobacillus plantarum</i> , group B Streptokoklar, <i>Enterococcus</i> türleri, <i>C. albicans</i>

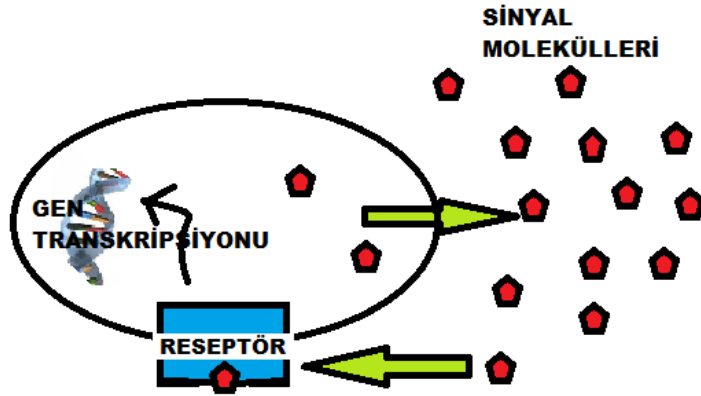
Donlam RM. Biofilm formation: A clinically relevant process. Clin Inf Dis. 2001; 33: 1387-1392

### 2.3. QUORUM-SENSING (QS) = ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA

Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile birbirleri ile haberleşmeleri ve iletişim kurmalarıdır. QS sözcük olarak bir oturma veya toplantı için gerekli olan en az birey sayısının bir araya gelmesi anlamına gelmektedir. Biyoloji açısından ise, bir bakteri topluluğunda birey sayısı belli bir düzeye ulaştığında ortaya çıkan özel bir tip hücrelerarası iletişim anlamına gelir (99).

QS; bakterilerde pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar; kümeleşme (swarming), hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virülans (ekzoenzim ve proteaz üretimi) gibi. Bu düzenlenme sonucunda bakteri ortamdaki besin maddelerinin daha rasyonel kullanımı, bulunduğu ortama uyum sağlama, çevresel etkenlere karşı korunma, aynı ortamdaki diğer mikroorganizmalarla yarışma veya konağın savunma mekanizması ile mücadele etme, popülasyondaki birey sayısını ortamın gereklerine göre kontrol etme gibi fonksiyonları yerine getirme olanağı bulur. Bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile genetik mekanizmalar harekete geçer ve yeni davranışlar ortaya çıkar (100).

QS; bakterinin bir sinyal molekülü sentezlemesi, ekstrasellüler ortama salması, eşik değer konsantrasyonuna ulaştığında onu algılamak üzere uygun reseptör ile bir kompleks oluşturması ve gen transkripsiyonu ile toplu bir yanıt geliştirmesidir. QS sistemi bakterinin popülasyon içinde yoğunluğunu saptamasını sağlayan bir sistemdir ve bakteri bu bilgiyi kullanarak uygun genetik materyalini kontrol eder (99, 100) (Şekil 4).



Şekil 5. Quorum-Sensing Sisteminde Reseptör Spesifik Molekül İlişkisi

Biyofilmlere bağlı enfeksiyonların büyük oranla kronikleştiği bilinmektedir. Biyofilm oluşumunun önemli bir komponentinin de QS sistemleri olduğu bilinmektedir. N-açil-homoserin-lakton (AHL) sinyal molekülü bazlı sistemler, üzerinde en fazla çalışılan sinyal sistemleridir. Yapılan bir çalışmada 70'ten fazla Gram negatif bakterinin AHL sistemine sahip olduğu rapor edilmiştir (101). QS sistemi Gram negatif bakterilerde fonksiyonel açıdan geniş bir yelpazede kontrol mekanizması olarak görev alır. *V. cholera*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* bakterilerinde virulans genlerin ekspresyonu; *P. aeruginosa* ve *S. liquefaciens* bakterilerinde kümeleşme (swarming) için yüzey motilite gen ekspresyonu gibi (102-104). QS sistemleri Gram pozitif bakterilerde de tanımlanmıştır. AHL yerine genellikle 5-17 amino asit uzunluğunda küçük peptidler sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır (105). Örneğin; *B. subtilis*'te sporulasyon, *E. faecalis* ve *S. aureus*'ta da virulans gen ekspresyonunu sağladığı gösterilmiştir (106, 107). Bir diğer QS sistemi ise Gram negatif ve pozitiflerde bulunan otoindükleyici moleküllerin aracılık ettiği otouyarıcı

QS sistemidir (108). *P. aeruginosa* hücre-hücre iletişimi konusunda en fazla araştırılan bakteridir. İlk olarak 1990'ların sonunda QS sisteminin virulans kontrolünde rolü olduğu rapor edilmiştir (109).

*P. aeruginosa* temel olarak 2 sistem üzerine kurulmuştur. *las* ve *rhl* genleri tarafından kodlanan sırası ile *Las I, R* ve *Rhl I, R* sinyal üretici ve reseptör proteinleri sistemin temel bileşenleridir. *LasI* tarafından 3-oxo-C12-HSL sinyal molekülü üretilir ve spesifik reseptörü olan *LasR* tarafından algılanır. *RhlI* tarafından ise C4-HSL sinyal molekülü üretilir ve *RhlR* spesifik reseptörü tarafından algılanır (110, 111). Hücre yoğunluğunun artması ile beraber *las* geni aktive olarak *LasI* 3-C12-oxo-HSL sentezini başlatır. 3-oxo-C12-HSL molekülü hücre dışına eflüks pompaları ile atılır. Hücre dışında yeterli birikime ulaşması halinde spesifik reseptörü olan *LasR* düzeyi artar ve sinyal molekülü ile birleşerek bir kompleks oluştururlar. Ayrıca 3-oxo-C12-HSL *RhlR* reseptörüne de bağlanabilmekte ve gen ekspresyonuna yol açabilmektedir. *Rhl* sistemi *Las* sisteminin kontrolünde çalıştığı düşünülmektedir (112). 3-oxo-C12-HSL molekülünü algılayan bir diğer reseptör ise *QscR* reseptörüdür. Sinyal molekülü belli bir eşik düzeye ulaştığı zaman *QscR* ile bir kompleks oluşturarak *LasR* ve *RhlR* inhibisyonunu gerçekleştirir. *QscR* mutant suşların hipervirulan olduğu rapor edilmiş olup yüksek düzeyde *LasR* ve *RhlR* ekspresyonu tespit edilmiştir (113). *P. aeruginosa* QS sisteminin başka bir reseptörü olan *VqsR* ve 3-oxo-C12-HSL ile oluşan kompleksin siderofor oluşumu ve antibiyotik toleransında rolü olduğu gösterilmiştir (114). *Rhl* sistemi *Las* sistemine benzer şekilde çalışmaktadır. *Rhl* sisteminin sinyal molekülü C4-HSL'dür. Bu molekül kısa bir açıl zincirine sahip olduğundan hücre içi-dışı 2 yönlü transferi serbest difüzyonla gerçekleşir. *Rhl* sistemi *Las* sisteminin kontrolünde çalışmasına karşın özellikle beslenme koşulları değiştiğinde *Las* sisteminden bağımsız çalışabilmektedir. *Rhl* sisteminin en önemli tetikleyicisi fosfor azlığıdır (115, 116). 3-oxo-C12-HSL ve C4-HSL dışında 3. bir sinyal molekülü de *Pseudomonas* Sinyal (PQS) molekülüdür. *pqsABCDE* operonunda *pqsh* geni tarafından kodlanmaktadır (117). PQS, 2-heptil-3hidroksil-4-kinolon yapısındadır. Eksojen olarak da üretilebilmektedir. Hücreler arasında 2-heptil-4-kinolon (HHQ) şeklinde dolaşır ve hedef hücre içerisinde PQS'e çevrilir (118). PQS logaritmik üreme fazında da sentezlenmektedir ancak pik düzeye geç stasyonel fazda ulaşır. PQS üretimi *PqsR*

reseptörü ile kontrol edilir. PqsR, 3-oxo-C12-HSL ile kompleks oluşturduğunda (yani sinyal molekül konsantrasyonu arttığında) PQS üretimi artarken C4-HSL varlığında üretimi azalmaktadır (119). PQS *P. aeruginosa*'nın geç stasyonel fazda üreyebilmesi için gerekli bir moleküldür. Ayrıca elastaz, ramnolipid, lektin ve pyosiyenin sentezinde de önemli bir role sahiptir (120).

*P. aeruginosa*'nın biyofilm yapısı mantar şeklindedir ve sağlam bir biyofilm iskeleti oluşturmak için QS kontrolüne ihtiyacı vardır. Biyofilm mutant suşlarla yapılan çalışmalarda bakterinin yassı bir iskelete sahip labil bir biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise QS mutant suşlar ve QS mutant olmayan daha az sayıda bakterilerin oluşturduğu biyofilm incelenmiş, biyofilm yapısı içerisinde mutant suşların besinlere kolay ulaşabilmesi için yüzeyde ve planktonik şekilde yerleştiği ve zemindeki bakterilerin ise stasyonel fazda olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm dayanıklılığının ise daha düşük olduğu rapor edilmiştir (121, 122).

#### **2.4. AMBROKSOL YAPI VE ETKİ MEKANİZMASI**

Bromeksinin aktif bir metabolitidir. Kimyasal yapısı trans-4-2 amino 3, 5 dibromobenzil-amino-siklo-hekzanol-hidroklorid şeklindedir.

Ambroksolün etkilerini 6 başlık altında özetlenebilir.

(i) Mukolitik ve mukokinetik etkilidir (123)

Yapılan hayvan çalışmalarında (fare, kurbağa, köpek...) ambroksolün; siliyer aktiviteyi artırarak, mukus viskozitesinde azalmaya ve yumuşamaya neden olara mukosiliyer klerensi artırdığı görülmüştür. Ayrıca, solunum sisteminde sekresyon stimülasyonu ile mukus atılımını artırmaktadır (124).

(ii) Akciğerlerde alveol hücreleri tarafından sentezlenen doğal sürfaktan sentezini ve salgılanmasını artırır.

Etki mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Sürfaktan, fosfolipid ve proteinden oluşan, akciğerler için yaşamsal önemi olan bir maddedir. Alveolün hava ile temas eden yüzünü ince bir film şeklinde örter ve alveollerin gerilme durumuna göre çeperin yüzey gerilimini dönüşümlü olarak değiştirerek alveol çeperinin yapışmasını ve boşluğun kapanmasını önler. Artmış sürfaktan sentezi, mukus viskozitesinde azalmaya neden olarak mukusun taşınmasını hızlandırır. Ambroksolün sürfaktan sentezini arttırdığı, çeşitli hayvan çalışmalarında ve insan tip II alveoler hücre kültürlerinde gösterilmiştir (125). Ambroksol özellikle tip II alveoler hücrelerin matürasyonunu sağlayarak, sayısını artırarak ve sürfaktan sentezini ve sekresyonunu stimüle ederek ortamdaki sürfaktanı arttırmaktadır. Öte yandan alveoler lizozimal fosfolipaz A'yı inhibe ederek sürfaktan yıkımını da inhibe etmektedir (126).

(iii) Hava yolu mukozası üzerindeki epitel hücrelerinden Na<sup>+</sup> absorpsiyonunu inhibe eder. Bu yolla hava yolu yüzeyindeki sıvıda su bileşenini arttırmakta ve mukus viskozitesini azaltmaktadır (127).

(iv) Antioksidan etkilidir. Reaktif serbest oksijen radikallerinin çeşitli akciğer hastalıklarında oksidatif hasara yol açarak önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ambroksol, bu bileşenleri doğrudan ortamdaki temizleyebilir; bunun yanı sıra radikallerin sentez ve salgılanmasını inhibe edebilir (128). Ambroksol'ün doğrudan antioksidan etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte yapısında bulunan NH<sub>2</sub> ve OH grupları ile elektron aktarımını sağlayarak yükseltgediği ve bu yolla akciğer dokularını klinik olarak koruduğu düşünülmektedir (129). N-asetil sistein (NAC) ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, ambroksolün anti-OH etkisinin ve anti-O<sub>2</sub> kapasitesinin NAC'den daha fazla olduğu, HOCl'ü aynı derecede etkiledikleri gösterilmiştir (130).

(v) Akciğerler üzerinde antiinflamatuvar etkilidir.

Ambroksolün antiinflamatuvar etkisi; hem antioksidan etkisi hem de sitokin salınımı inhibisyonuna bağlıdır (131). Ambroksol alveoler makrofaj ve PMN'deki fosfolipaz A aktivitesini azaltır. Buna bağlı olarak ambroksolün bu hücrelerden sitokin salınımını inhibe ettiği düşünülmektedir (132). Fizyolojik konsantrasyonlarda

polimorfonükleer lökosit kemotaksisini inhibe eder, periferik kandaki mononükleer hücrelerden IL-1 ve TNF- $\alpha$  sentezini inhibe eder, hem periferik kan hem de bronkoalveoler lavajdaki (BAL) mononükleer hücrelerden IL-2, interferon (IFN) -  $\alpha$  ve TNF-  $\alpha$  sentezini inhibe eder (133). Ambroksol ile NAC'nin antiinflamatuvar etkilerini karşılaştırmaya yönelik yedi sağlıklı kişi BAL sıvısından elde edilen alveoler makrofaj kültüründen yapılan çalışmada; her iki ilacın sitokin sekresyonuna farklı yönden etkidiği gösterilmiştir. NAC IL-10 ve IL-12 sekresyonu, IL-12/IL-10 oranını etkilemeden arttırırken; ambroksol IL-10 sekresyonu arttırmaksızın IL-12 sekresyonunu arttırır, IL-12/IL-10 oranını arttırır. Sonuçlar göstermiştir ki; NAC inflamatuvar durumlarda alveoler makrofajlardan IL-10 ve IL-12 sentezini dengeli bir şekilde sağlayarak immün cevapta rol alır; ambroksol ise IL-12 yönünde bir artış sağlayarak, Th-1 hücre gelişimini kolaylaştırarak hücresele immün cevap yoluyla antiinflamatuvar cevapta rol alır (131). Ambroksol tip II alveoler hücrelerden fosfotidilkolin sentezini arttırarak bronşiyal hiperreaktiviteyi azaltır. Lisofosfotidilkolin (LPC) astmatik olgularda artar. LPC beta-adrenerjik reseptörlerin azalmasından, hücre içine  $Ca^{++}$  ve  $Na^+$  girişinden ve ATPaz stimülasyonundan sorumludur. Ambroksolün LPC'yi azaltarak hiperreaktiviteyi azalttığı düşünülmektedir. Öte yandan; sekresyonun yapısındaki değişikliklerle irritan reseptörlerin uyarılabilmesi de azalmaktadır, bu da bronş hiperreaktivitesinin azaltılmasında etkili olmaktadır (134). Ambroksol, IgE ile stimüle edilen bazofillerden histamin, IL-4, IL-13 salınımını doz-bağımlı olarak inhibe eder. Gibbs ve arkadaşları bazofil aktivasyonunda serbest radikallerin etkili olduğunu; bu serbest radikalleri yok eden ilaçların allerjik inflamasyonda etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (135).

(vi) Antibiyofilm etkinliği vardır. Antibiyofilm etkinliği yönünde kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Fang Li ve arkadaşları, 2008 yılında ambroksolün *P. aeruginosa* matür biyofilm tabakası üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada ambroksolün, *P. aeruginosa* biyofilm tabakasının temel iskelet yapısını oluşturan alginat sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan GDP-D-mannoz dehidrogenaz enzim sentezini ve aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Alginat sentezinde önemli rolü olan AlgU operonu tarafından kodlanan sigma 2 faktörünü inhibe eden anti sigma 2'yi kodlayan mucA gen ekspresyonunu da arttırdığı rapor edilmiştir (136). Bir

başka çalışmada ise fareler *P. aeruginosa* biyofilm tabakası ile kaplı endotrakeal tüp takılmış ve farelere ambroksol tedavisi verilmiş. Ambroksol tedavisi alan ve kontrol grubunda 4. ve 7. günlerde tüpler üzerindeki biyofilm tabakaları incelenmiş. Ambroksol ile tedavi alan grupta bakteri miktarının daha az olduğu ve biyofilm maturasyonunun ise tam olarak sağlanamadığı rapor edilmiştir (137).

Ambroksolün farmakokinetik özellikleri konusunda bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Lee ve arkadaşları 24 sağlıklı gönüllü erkekte, 30 mg iki farklı ambroksol preparatının oral olarak alınımından sonra plazma konsantrasyonu değişimini kromotografik olarak değerlendirmişlerdir. Ambroksolün yarılanma ömrü yaklaşık olarak 10 saat olarak bildirilmiştir (138, 139).

## **2.5. KOLİSTİN (POLİMİKSİN E)**

Polipeptid yapılı antibiyotiklerdendir. Bu kompleks bir yapıdır. Fazla polar olan peptid grubu bir yağ asidine bağlanmıştır. Bu nedenle moleküllerinde hidrofilik ve lipofilik nitelikte iki ayrı grup bulunur. Deterjan özelliği bulunan yüzeyde aktif maddelerdir. Bakteri hücresinin sitoplazmik membranının permeabilitesini artırmak suretiyle bakterisid etki yaparlar. Diğer bir bakterisid antibiyotik grubu olan penisilinlerden farklı olarak, gelişmesini tamamlamış ve üremesi durmuş bakterileri de yok ederler. Tedavi edici dozlarda sistemik olarak verildikleri taktirde konak hücreleri üzerinde de toksik etkisi vardır. Konak hücresi ile bakteri arasında fazla seçicilik göstermezler. Bin dokuz yüz elli yılında Japonya’da *Bacillus colistinus*’tan Polimiksin-E diğer adıyla kolistin elde edilmiştir. Polimiksin kimyaca, bir amid bağı ile metil- 6-oktanoik aside bağlanmış bir dekaeptittir. Dekapeptid’in yedi amino asidi bir halka oluşturur ve bu halkaya diğer üç amino asidin yaptığı lineer zincir bağlanır. Polimiksin B ve Polimiksin E arasında tek aminoasit farkı vardır (140, 141). Kolistinin klinik kullanıma 1970’li yıllarda ABD ve Avrupa ülkelerinde girmiştir. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ilk olarak 1970 yılında yayımladığı önerilerde kolistin için duyarlılık sınırları vermiş ancak 1981 yılından itibaren kullanımı artık neredeyse yok denecek kadar azaldığı için rutin duyarlılık kriterlerinden geri çekmiştir (142). Kullanımının dramatik olarak azalmasının nedeni



bu ilaca karşı gelişen antimikrobiyal direnç değil, ilacın indüklediği nefrotoksisite ve nörotoksisitedir. Ayrıca, 80’li yıllardan itibaren daha etkin ve yan etki insidansı ciddi oranda az olan 3. kuşak sefalosporinlerin ve takip eden yıllarda mükemmel antibakteriyel etkinlikleri ile karbapenemlerin kullanıma sunulması kolistinin tamamen kullanımdan kalkmasına yol açmıştır (143). Kolistinin antibakteriyel spektrumu oldukça dardır. Sadece Gram negatif aerobik basillere karşı etkilidir. En etkin olduğu türler *Shigella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*’dir. Anaerobik ajanlara karşı ise etkisizdir.

Kolistin, sülfat veya metilsülfat tuzu şeklinde kullanılır. Son şekline “kolistimetat-sodyum” adı verilir. Sülfat tuzu oral yoldan, kolistimetat ise parenteral yoldan kullanılır (140, 141).

Kolistinin klinik kullanımı, özellikle çoklu dirençli non-fermentatif ajanların neden olduğu ve klasik tedavilere cevap alınamayan olgularla sınırlıdır. Kistik fibrozis hastalarında sık tekrarlayan *Pseudomonas spp.* ve *Burkholderia spp.* türü bakterilerin neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları, kolistinin en sık kullanıldığı alanlardır. Oral yolla alındığında gastrointestinal kanaldan çok az absorbe olur. Bu yoldan barsak antiseptiği olarak da kullanılır. Kolistimetat’ın intramüsküler injeksiyon yerinden absorpsiyonu ve böbrekten atılımı yavaştır. Duyarlı bakterilere bağlı enfeksiyonlarda 75-150 mg dozunda intravenöz yoldan yavaş infüzyonla verilir (143).

Parenteral uygulamada, görme bozukluğu, ağız etrafında ve bazen ekstremitelerin uç kısımlarında parestezi gibi nörotoksik semptomlara neden olabilmektedir. Özellikle böbreklerin toplayıcı sistem, glomerül epiteli ve papiller hücrelerine olan zararlı etkilerinden dolayı nefrotoksik olarak kabul edilir. Günlük mutad dozlarda verilse bile albuminüri, silendirüri, hematüri, kan üre azot seviyelerinde artış yapabilir. Bu belirtiler genellikle tedavinin 4-5’inci günü ortaya çıkar. Böbrekte yaptığı patolojik lezyonlar akut tübüler nekroz veya interstisyel nefrit şeklinde olabilir. Histamin açığa çıkması nedeniyle yüz, boyun ve göğüs bölgesinde diffüz makulopapüler döküntülere (Flushing reaksiyonu) neden olabilir. Nöromüsküler blokaj ve buna bağlı solunum felci yapabilir. Bu durum kalsiyum glukonat injeksiyonu ile geri

döndürülebilmektedir. Nefrotoksik ve nörotoksik yan etkilerin kalıcı olup-olmadığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır (144). Kolistin, bakteri hücrelerine “self-promoted uptake” sistemi ile alınır ve LPS üzerine bağlanarak aktivitesini gösterir. Sadece Gram negatif bakterilere etkili olmasının moleküler mekanizması LPS molekülüne spesifik olarak çalışmasına bağlıdır. Nonfermentatif ajanlarda kolistin direncinin dış membran proteinlerinden olan OprH’ın mutasyonu sonucu ilacın bakteri LPS’si üzerindeki bağlanma bölgesinin Mg<sup>++</sup> iyonlarınca bloklanması sonucu geliştiği gösterilmiştir (145). Bu mekanizmanın aktivasyonu ile sadece kolistin direnci değil, polimiksin, aminoglikozit ve EDTA gibi antibakteriyel ajanlara da direnç ortaya çıkmaktadır (146).

### III. GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalara ait; balgam ve derin trakeal aspirat (DTA) örneklerinden Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarında izole ve identifiye edilen 27 *P. aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alındı. *P. aeruginosa* suşları balgam ve DTA örneklerinden izole edildikten sonra tek koloni pasaj ile çoğaltıldı. Çalışmada kullanılan kontrol suşu *P. aeruginosa* (PAO1, ATCC 15692)'dan sağlandı. Tüm izolalarda CLSI kriterlerine uygun şekilde E-test yöntemi ile kolistin minimum inhibitör konsantrasyon (MİC) değerleri çalışıldı. 27 *P. aeruginosa* suşunun tamamı kolistine duyarlı olduğu tespit edildi. Balgam ve DTA örneklerinden izole edilen 27 *P. aeruginosa* suşunun kliniklere göre dağılımı tablo 3'te sunulmuştur.

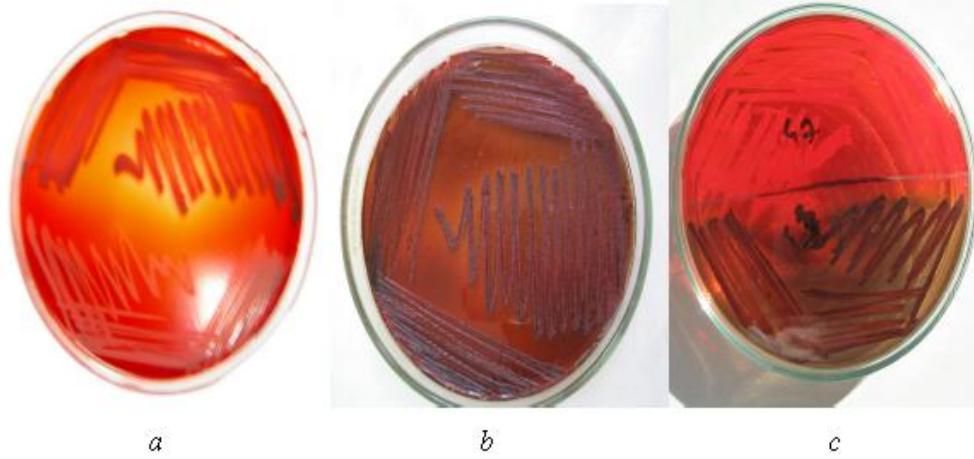
**Tablo 3.** *P. aeruginosa* İzolatlarının Kliniklere Göre Dağılımı

Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)	Bakteri Sayısı (n=27)
Kardiyoloji YBÜ	3
Nöroloji YBÜ	3
Beyin Cerrahisi YBÜ	5
Göğüs Cerrahisi YBÜ	5
Genel Cerrahi YBÜ	4
Anestezi ve Reanimasyon YBÜ	4
Acil YBÜ	3

#### 3.1. BİYOFİLM OLUŞTURAN BAKTERİLERİN SEÇİLMESİ

Kongo kırmızılı agar besiyeri litrede 10 g agar, 50 g sukroz, 37 g Beyin-Kalp infüzyon buyyonu ve 0.8 g Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlandı. Bu besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkubasyon sonrası koloni morfolojisi ve fenotipik özelliklerine göre koyu kırmızı siyah renkli koloniler biyofilm oluşumu pozitif, pembe veya sadece ortası siyah çevresi pembe koloniler zayıf pozitif olarak değerlendirildi. 24'üncü saatte

yapılan değerlendirmede 15 *P. aeruginosa* suşunda biyofilm oluşumu gözlemlendi. Biyofilm oluşturan her bir *P. aeruginosa* suşu 1'den 15'e kadar numaralandırıldı.



**Şekil 6.** Biyofilm oluşumunun Kongo Red Agar yöntemi ile değerlendirilmesi

[a-biyofilm negatif, b- biyofilm pozitif, c-biyofilm negatif (üst) ve biyofilm pozitif (alt)]

### 3.2. ENDOTRAKEAL TÜPLERİN (ETT) HAZIRLANIŞI

Steril ETT'ler her bir bakteri için 16 parça kullanılacak şekilde steril şartlarda 1'er cm uzunluğunda bölündü. Bölünen her 1 cm'lik parça 4'erli gruplar halinde sıvı besiyerlerine atıldı. Her tüpten ek olarak 1 cm'lik parça kontaminasyonu değerlendirmek amacı ile kanlı besiyerine roll-plate yöntemi ile ekildi.

### 3.3. BESİYERLERİNİN HAZIRLANIŞI

Her bir bakteri için 1 adet kontrol (99 ml), 1 adet kolistinli (98 ml), 1 adet ambroksollü (98 ml), 1 adet kolistin ve ambroksollü (97 ml) olmak üzere 4 adet brain heart infüzyon sıvı besi yeri seti hazırlandı.

Her besiyerine 1 cm'lik 4 adet ETT parçası ve Mcfarland 1 konsantrasyonunda 1 ml bakteri süspansiyonu konularak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

24 saatlik inkübasyon sonrası 1. besiyerinde 8 µgr/ml konsantrasyonunda (147) kolistin olacak şekilde olacak şekilde 1ml'lik kolistimetat Na solusyonu ilave edildi.

2. besiyerine 2,5 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 1 ml'lik ambroksol (136) ilave edildi. Üçüncü besiyerine 8 µgr/ml konsantrasyonunda kolistin ve 2,5 mg/ml konsantrasyonunda ambroksol olacak şekilde 1'er ml'lik kolistin ve ambroksol ilave edildi. Dördüncü besiyeri kontrol grubunu oluşturduğu için kolistin veya ambroksol ilave edilmedi. Tüm besi yerleri 37°C'de inkübe edilerek 24., 48., 72. ve 96. saatlerde ETT üzerinde biyofilm oluşumu ve biyofilm içindeki bakteri sayısı açısından değerlendirildi. Bakteri sayımı kültür metodu koloni sayım tekniği ile yapıldı.

### **3.4. BAKTERİ SAYIMI**

Yirmidördüncü saatte her bir bakteri için 4 besiyerinden oluşan setten; ambroksol, kolistin, ambroksol+kolistin ve kontrol besiyerlerinden 1'er adet 1 cm'lik ETT parçası steril olarak çıkarıldı. ETT parçası planktonik bakterileri uzaklaştırmak amacı ile 3 kez 5 ml steril distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra tüp parçası, üzerinde biyofilm oluşturan aderan bakterileri tüpten ayırmak amacı ile 5ml %0,5'lik Tween80 çözeltisi içerisine atılarak 15 saniye vortekslendi. Elde edilen çözülden 0,5 ml örnek alınarak 4,5 ml pepton tamponlu solusyon (PBS) ile karıştırıldı ve 1/10 oranında 4 kez dilue edildi. Her dilusyon için 3 adet kanlı besiyeri kullanılarak 0,1 ml inokulum ekim yapılarak standart L tipi tek kullanımlık öze ile yayıldı. Kanlı besiyerleri 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından koloni sayım tekniği ile bakteri sayısı tespit edildi.

Aynı işlemler her bir bakteri ve besiyeri seti içindeki 4 adet ETT parçası için 48., 72. ve 96. saatlerde tekrar edildi.

### 3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler için SPSS 11.5 programı kullanılmıştır. Ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız grupların karşılaştırılmasında parametrik test varsayımlarının sağlanıp sağlanmama durumu ShapiroWilk ve KolmogorovSmirnov testleri ile incelenmiş ve varsayımların sağlanmadığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre, bağımsız ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizinin parametrik olmayan karşılığı olan Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Ayrıca grupların ayrı ayrı zaman noktaları arasındaki ölçümleri bakımından farklılığın araştırılmasında Wilcoxonsignedrank test kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran ve frekansları, nicel değişkenlerde ise ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

## IV. BULGULAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarına Şubat 2010 - Haziran 2010 tarihleri arasında gelen, yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan alınmış balgam ve DTA örneklerinden izole edilmiş 27 *P. aeruginosa* suşu çalışmaya alındı. İzolatların YBÜ'lerine göre dağılımı; %18,5 Beyin Cerrahisi YBÜ, %18.5 Göğüs Cerrahisi YBÜ, %15 Genel Cerrahi YBÜ, %15 Anestezi ve Reanimasyon, %11 Kardiyoloji YBÜ, %11 Nöroloji YBÜ ve %11 Acil YBÜ, şeklinde idi. Biyofilm oluşumu saptanmayan 12 izolat çalışma dışı bırakıldı.

On beş *P. aeruginosa* suşu; ETT üzerindeki matür biyofilmlerden sonikasyon yöntemi ile ayrıldıktan sonra ambroksol, kolistin, kolistin+ambroksol içeren besiyerlerinde ve kontrol besiyerlerinde 4 gün inkübe edilerek bakteri ekiminden sonraki 24., 48., 72. ve 96. saatlerde, koloni sayım işlemi yapılmak üzere kanlı besiyerlerine yayma işlemi yapıldı.

Ambroksol ve kolistin *P. aeruginosa* matür biyofilmi üzerine etkinliği bakımından 4 grup (ambroksol, ambroksol+kolistin, kolistin, kontrol) arasında fark olup olmadığı; 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki biyofilm içerisindeki bakteri sayıları temel alınarak karşılaştırıldı (Tablo 4).

Sonuç olarak 4 grup arasında, 4 farklı zaman noktasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi.

Ambroksol grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $3.4 \times 10^5$  kob/ml; 48. saatte  $4.7 \times 10^3$  kob/ml; 72. saatte  $1.6 \times 10^2$  kob/ml ve 96. saatte  $1.4 \times 10^2$  kob/ml düzeyinde üreme tespit edildi. Ambroksol grubunda, matür biyofilm üzerine etkinlik zamana göre değerlendirildiğinde 24. -48. saatlerdeki etkinliği arasında fark olmadığı ( $p \geq 0.05$ ) gösterildi (Grafik 1). Yirmidördüncü ve 48. saatlere göre 72. ve 96. saatlerde etkinliğinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ) (Grafik 2).

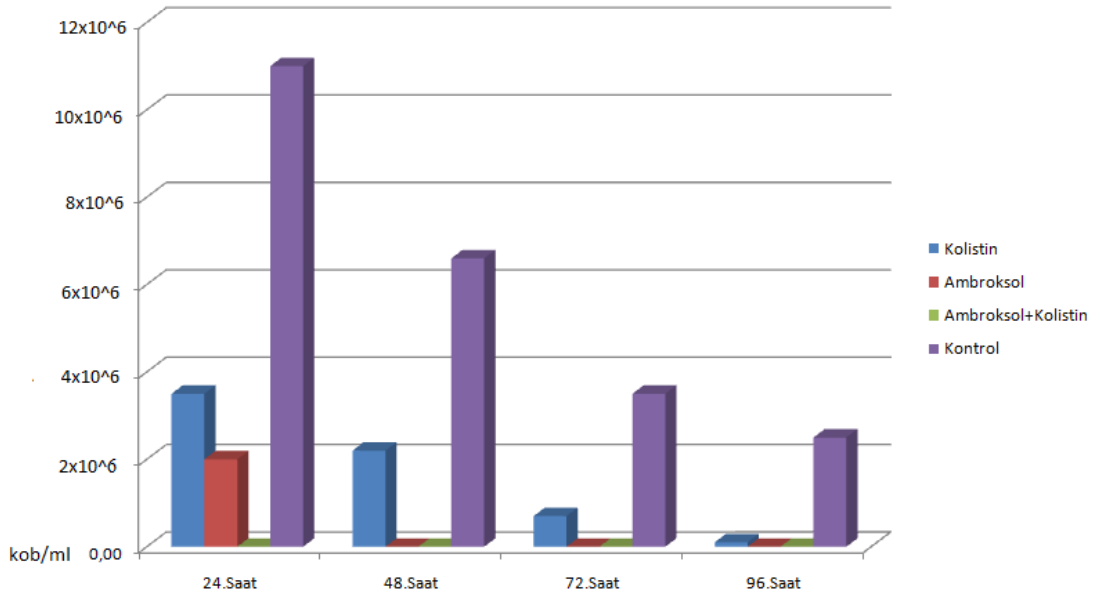
Kolistin grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $3.5 \times 10^6$  kob/ml; 48. saatte  $2.3 \times 10^6$  kob/ml; 72. saatte  $2.6 \times 10^6$  kob/ml ve 96. saatte  $2.9 \times 10^5$  kob/ml düzeyinde üreme tespit edildi. Kolistin grubunda, matür biyofilm üzerine etkinlik zamana göre değerlendirildiğinde 24.-48. saatlerdeki etkinliği arasındaki fark anlamlı iken ( $p \leq 0.05$ ) 48.-72. saatlerdeki etkinliği arasında fark olmadığı ( $p \geq 0.05$ ) gösterildi. Doksanaltıncı saatte ise etkinliğinin kontrole göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ) (Grafik 1).

Ambroksol+kolistin grubunda matür biyofilm içinde 24. saatten itibaren biyofilm içerisindeki bakteri sayısının  $10^3$  kob/ml'nin altında olduğu tespit edildi. Ambroksol+kolistin grubunda, matür biyofilm üzerine etkinlik zamana göre değerlendirildiğinde 24.-48., 24-72., 24-96., 48-72., 48-96. ve 72.-96. saatlerdeki etkinliği arasında fark olmadığı ( $p \geq 0.05$ ) gösterildi (Grafik 1).

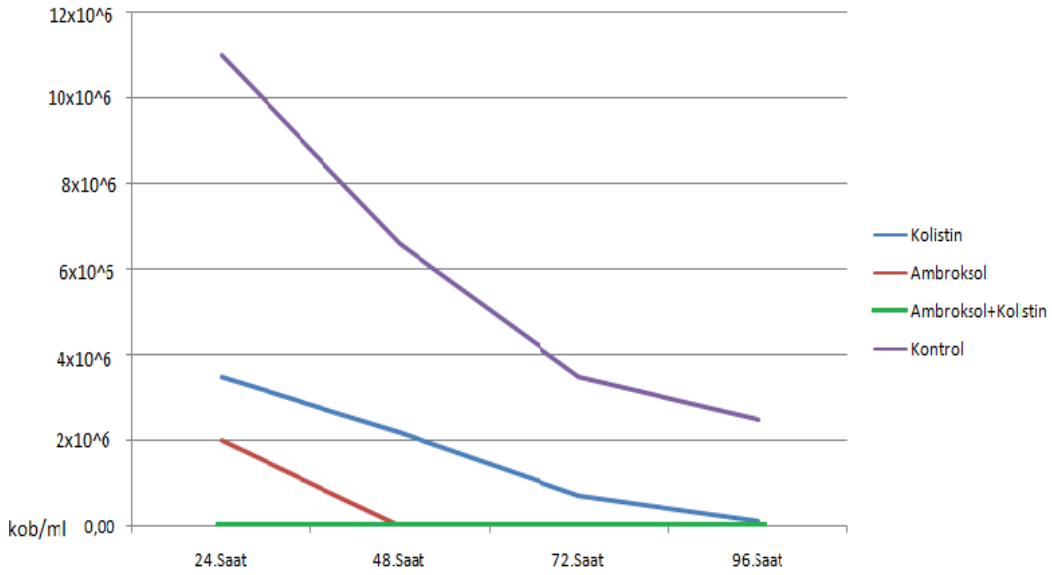
Kontrol grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $2.7 \times 10^7$  kob/ml; 48. saatte  $2 \times 10^7$  kob/ml; 72. saatte  $1.3 \times 10^7$  kob/ml ve 96. saatte  $1 \times 10^7$  kob/ml düzeyinde üreme tespit edildi (Grafik 2).

Ambroksol, Ambroksol+kolistin, kolistin ve kontrol grupları arasında etkinlik bakımından yapılan kıyaslamada; 24. saatten itibaren ambroksol + kolistin kombinasyonunun en yüksek etkinliğe sahip olduğu gösterildi.





**Grafik 1.** Kolistin, ambroksol ve kombinasyonlarının zamana göre bakteriyel koloni sayıları üzerine karşılaştırmalı etkileri



**Grafik 2.** Kolistin, ambroksol ve kombinasyonlarının bakteriyel koloni sayıları üzerine etkileri

**Tablo 4.** Kolistin, Ambroksol ve Kombinasyonlarının Bakteriye Koloni Sayıları Üzerine Etkileri

Grup	24.Saat		48.Saat		72.Saat		96.Saat	
<b>Ambroksol (n= 15)</b>								
Ortalama bakteri sayısı (kob/ml)	340x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	40x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	1.6x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	0,14x10 <sup>3</sup>	P≤0.05
Ortanca	2x10 <sup>2</sup>	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Minimum bakteri sayısı	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Maksimum bakteri sayısı	5100x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	70x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	2.4x10 <sup>3</sup>	P≤0.05	0.22x10 <sup>2</sup>	P≤0.05
<b>Kolistin (n = 15 )</b>								
Ortalama bakteri sayısı (kob/ml)	3.5x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.3x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.6x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.9x10 <sup>5</sup>	P≤0.05
Ortanca	3, 5x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.2x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	0.7x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	0.1x10 <sup>6</sup>	P≤0.05
Minimum bakteri sayısı	1.5x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	7x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	2.2x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	0.41x10 <sup>5</sup>	P≤0.05
Maksimum bakteri sayısı	1.6x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	1x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	2.5x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	0.11x10 <sup>7</sup>	P≤0.05
<b>Kolistin + Ambroksol (n=15)</b>								
Ortalama bakteri sayısı (kob/ml)	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Ortanca	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Minimum bakteri sayısı	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Maksimum bakteri sayısı	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
<b>Kontrol (n=15 )</b>								
Ortalama bakteri sayısı (kob/ml)	2.7x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	2.0x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	1.3x10 <sup>7</sup>	P≤0.05	1.0x10 <sup>7</sup>	P≤0.05
Ortanca	11x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	6.6x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	3.5x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.5x10 <sup>6</sup>	P≤0.05
Minimum bakteri sayısı	3.3x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	2.2x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	1.5x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	2.0x10 <sup>5</sup>	P≤0.05
Maksimum bakteri sayısı	1.5x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	1.3x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	8.2x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	6.3x10 <sup>8</sup>	P≤0.05
<b>Total (n=60 )</b>								
Ortalama bakteri sayısı (kob/ml)	7.7x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	5.6x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	4.0x10 <sup>6</sup>	P≤0.05	2.5x10 <sup>6</sup>	P≤0.05
Ortanca	1.5x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	0.7x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	0.1x10 <sup>5</sup>	P≤0.05	0.02x10 <sup>5</sup>	P≤0.05
Minimum bakteri sayısı	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05	0	P≤0.05
Maksimum bakteri sayısı	1.5x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	1.3x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	8.2x10 <sup>8</sup>	P≤0.05	6.3x10 <sup>8</sup>	P≤0.05

Yirmidördüncü ve 96. saatlerdeki maksimum ve ortalama bakteri sayılarına bakıldığında sırası ile ambroksol grubunda 24. saatte 5100x10<sup>3</sup>, 340x10<sup>3</sup>, 96. saatte

0,22x10<sup>3</sup>, 0,14x10<sup>3</sup> kob/ml; kolistin grubunda 24. saate 1,6x10<sup>7</sup>, 3,5x10<sup>6</sup>, 96. saatte 0,11x10<sup>7</sup>, 2,9x10<sup>5</sup> kob/ml; kontrol grunda 24. saate 1,5x10<sup>8</sup>, 2,7x10<sup>7</sup>, 96. saatte 6,3x10<sup>8</sup>, 1,0x10<sup>7</sup> kob/ml idi. Kolistin + ambroksol grubunda ise 24. saatten itibaren üreme olmadığı tespit edildi.

Çalışmada kolistin, ambroksol ve kombinasyon grubunda tüm zaman dilimlerinde biyofilm içindeki canlı bakteri sayısı temel alındığında her 3 grubun da antibiyofilm etkinlik yönünden kontrolden üstün olduğu gösterilmiştir (Grafik 1 ve 2).

## V. TARTIŞMA

Biyofilm oluşumu mikroorganizmalar için önemli bir savunma mekanizmasıdır. Kan akımı, tükürük gibi fiziksel yıkama gücüne karşı dayanıklı olması, mikroorganizmalar için ideal bir üreme ve besin ortamı sağlamasının yanında; fagositozdan, dezenfektan ve antibiyotik etkilerinden de korunmalarını sağlar (14). Biyofilm içerisindeki sesil bakteriler planktonik bakterilere kıyasla antibiyotiklere 500-1000 kat daha dirençlidirler (15). Direnç gelişimi; biyofilmi çevreleyen EPS'lerin bariyer etkisi (moleküler filtre), biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların çoğalma hızlarındaki değişiklikler, biyofilm içerisindeki mikroçevrenin antibiyotiklerin etkisini azaltması ve mikroorganizmalar arası iletişimi sağladığı düşünülen quorum-sensing sistemi gibi mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır (91-96, 100).

Biyofilmlerin klinikteki asıl önemi kronik enfeksiyonlara neden olmasının yanında, tedavi süresinin uzamasına ve tedavi güçlüğüne yol açmasıdır. Bunun yanında tedavi amaçlı kullanılan antibiyotığın biyofilm içindeki bakterilere etkiyebilmesi için yüksek dozlarda kullanılması gerekmektedir (15, 16). Bilindiği gibi yüksek dozlarda uzun süreli uygulanan tedavilerde de yan etki sıklığı artmakta, zaman zaman tedavi değişikliğine hatta tedavinin kesilmesine gerek duyulmaktadır.

İmmünespresif ajanların kullanımının artması, yabancı cisim implantasyon uygulamalarının yaygınlaşması ve ortalama insan ömrünün uzaması ile birlikte kronik hastalıkların artması da yine biyofilm ilişkili enfeksiyonların sık görülmesine sebep olur (87, 90).

Tıbbi olarak önem taşıyan biyofilm oluşturan bakteriler arasında *P. aeruginosa*; hastane içinde salgınlara yolaçabilmesi, mortalitesi yüksek olan enfeksiyonlara yol açabilmesi, hızlı direnç geliştirmesi ve çoklu ilaca direnç geliştirebilmesi, tedavisi zor ve uzun süre gerektiren enfeksiyonlara yol açması nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir (148-151).

*P. aeruginosa*, immün yetmezliği olan, uzun süre antibiyotik kullanan ya da radyoterapi alan, malign ya da metabolik hastalığı bulunan, yaşlı, Human Immundeficiency Virus (HIV) ile enfekte, kistik fibrozisli, geniş ağır yanıklı kişilerde en önemli fırsatçı enfeksiyon etkenlerinden biridir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (152).

Değişik çalışmalarda hastane kaynaklı enfeksiyonların %8-25'inde *P. aeruginosa* sorumlu tutulmuştur. Bu bakteri hastanelerde nemli ortamlardan ve hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan sıklıkla izole edilir ve özellikle yoğun bakım ünitesi ve nütropenik hastaların izlendiği birimler için daha da önem kazanmaktadır (149, 152).

*P. aeruginosa* insanda farklı anatomik bölgelerde farklı koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Enfeksiyon gelişiminde konak hücre yanıtı yanında bakteriye ait çeşitli virülans faktörlerinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Bu virülans faktörleri arasında kirpik, pilus, LPS, alginat, piyosiyenin, piyoverdin, proteaz, elastaz, fosfolipaz C, ekzoA, ramnolipid ve biyofilm yer almaktadır (152).

*P. aeruginosa* mevcut virülans faktörleri ile ilişkili olarak ağır seyirli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu enfeksiyonlar arasında pnömoni (nütropenik hastalarda, mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda, kistik fibrozisli hastaların alevlenmelerinde ve HIV enfeksiyonunu da içeren (CD4<50 mm<sup>3</sup>)), bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardaki bakteriyemiler, yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonları, malign otitis media (diabetik hastalarda ve yüzücü kulağında), komplike menenjit (intrakraniyal cerrahi, kafa travması, intraventriküler shunt ve BOS sızıntısı ile ilişkili) ve beyin abseleri, penetran yaralanma ve intraoküler cerrahi sonrası ortaya çıkan göz enfeksiyonları ve endoftalmit ile birlikte olan keratit, hematojen yayılım veya penetre edici travma veya cerrahi ile ilişkili komşu bir odağın yayılımı sonucu oluşan septik artrit ve osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları; primer veya ektima gangrenosum, subkutan nodüller, selülit, abse, veziküller, püstüler veya makülopapüler lezyonlar, büller veya nekrotizan fasiit ve gangren gibi ortaya çıkan metastatik odaklar, intravenöz ilaç kullananlarda doğal kapak endokarditi ve prostetik kapak endokarditi sayılabilir (153).

*P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonlarının en önemli özelliği kronisite göstermesi ve mikrobiyolojik eradikasyonunun son derece güç olmasıdır. Bunun temel nedeni mikroorganizmanın akciğer dokusunda kolaylıkla biyofilm tabakası oluşturması ve böylelikle konak savunma mekanizmalarının yanında biyofilm içindeki bakteriye tedavi amaçlı kullanılan antibakteriyellerin etkisinin yetersiz kalmasıdır. Özellikle yapısal bozukluğu olan hastalarda ve mekanik ventilasyon desteği ihtiyacı olan hastalarda *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonu oldukça siktir. Yapılan bir çalışmada ventilatör ilişkili pnömonilerin %21.8'inde *P. aeruginosa* etken patojen olarak tespit edilmiştir (154). Erişkin kistik fibrozisli hastaların ise %80'inin *P. aeruginosa* ile enfekte olduğu bildirilmiştir (155).

*P. aeruginosa*'da AHL aracılı hücreden hücreye sinyal iletimi, çeşitli ekstrasellüler virölans faktörlerinin salınımının kontrolünün düzenlenmesinde ve biyofilm oluşumunda önemlidir. Sentezlenen bu moleküller *lasI* ve *rhII* genleri olmak üzere 2 otoindükleyici sentez geni ile bağlantılıdır. AHL molekülleri kistik fibrozisli hastaların akciğer sekresyonlarında saptandığı gibi in vitro *P. aeruginosa* biyofilm modelinde ve üretral kateterlerde de saptanmıştır (156).

Bu alışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-İ Sina Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarı'nda balgam ve DTA örneğinden tanımlanan toplam 15 *P. aeruginosa* suşunda in vitro şartlarda ETT üzerinde oluşturulan matür biyofilm üzerine kolistin ve ambroksolün tek başlarına ve kombine etkinlikleri değerlendirildi. Kolistin ve ambroksolün etkilerinin kontrole kıyasla tek başlarına ve kombine kullanımlarında matür biyofilm üzerine kontrolden üstün olduğu gösterildi ( $p \leq 0,05$ ).

Kolistinin biyofilm üzerine tek başına etkinliğinin tek başına ambroksolüne kıyasla daha yetersiz olduğu ve maksimum etkinliğine ancak 96. saatte ulaşabildiği gösterilmiştir. Kolistin dar spektrumlu bir antibakteriyel olmasına karşın özellikle hastane kökenli çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkili olmasından ötürü sıkça kullanılmaktadır. VİP, kistik fibrozis ve enfekte broşekatazi gibi patogenezinde biyofilmlerin rol oynadığı enfeksiyon hastalıklarında; bilindiği gibi

etken patojenin, biyofilm içerisinde iken planktonik formlarına göre antibakteriyellere olan duyarlılığın naza olduğu bilinmektedir (157).

Çalışmaya alınan 15 *P. aeruginosa* suşunun ETT üzerinde oluşturduğu matür biyofilme kolistin tek başına antibiyofilm etkinliğinin kontrolden üstün olduğu ancak ambroksol ve kombinasyon uygulamasına göre yetersiz olduğu tespit edildi. Kolistin matür biyofilm üzerine en yüksek etkinliğinin ise 72.-96. saatte elde edildiği tespit edilmiştir. Kolistin biyofilm etkinliğini değerlendiren kısıtlı sayıda çalışma vardır. Cai Y ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada *P. aeruginosa* matür biyofilmi üzerine anlamlı etkinliğinin 8 µgr/ml konsantrasyonunda elde edildiği; 24. ve 48. saatlerde antibiyofilm etkinliğinin yetersiz olduğu belirtilmiştir (147). Cai Y ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolistin 24. ve 48. saatlerdeki etkinliğinin düşük olması kolistin biyofilm oluşumunun başlangıç aşamasına etkisinin yetersiz olması ve ancak matürasyonu tamamlanmış biyofilm içerisindeki bakterilere etkinlik gösterebilmesi ile açıklanmaktadır. Haagensen ve arkadaşları kolistin *P. aeruginosa*'nın mantar şekline benzer biyofilm yapısı içerisindeki bakteriler üzerine etkinliğini değerlendirmiş ve kolistin biyofilm tabanında yer alan; daha az aktif olduğu bilinen bakterilere, yüzeye yakın olan bakterilere göre daha fazla etki olduğunu göstermiştir (158). Çalışmamızda kolistin anlamlı etkinliği 72. saatte ulaşması mevcut çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Ambroksol bromeksinin aktif bir metabolitidir. Mukolitik ve mukokinetik etkilidir (123). Akciğerlerde alveol hücreleri tarafından sentezlenen doğal sürfaktan sentezini ve salgılanmasını artırır (125). Hava yolu mukozası üzerindeki epitel hücrelerinden Na<sup>+</sup> absorpsiyonunu inhibe eder. Bu yolla hava yolu yüzeyindeki sıvıda su bileşenini arttırmakta ve mukus viskozitesini azaltmaktadır (127). Akciğerler üzerinde antiinflamatuvar etkinliğinin yanında antibiyofilm etkinliğinin de üzerinde durulmaktadır (131). Ambroksolün *P. aeruginosa* biyofilmi üzerine etkinliğini değerlendiren kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Ambroksolün mukoid *P. aeruginosa* suşu biyofilmi üzerine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada 2, 5 mg/ml konsantrasyonunda *P. aeruginosa* matür biyofilm yapısını bozduğu ve kolay parçalanmasını sağladığı gösterilmiştir (136). *P. aeruginosa*'nın önemli bir virulans faktörü olan alginat sentezini inhibe ederek matür biyofilm oluşumunu engellemekte

ve antibakteriyellerin biyofilm üzerine etkinliğini arttırmaktadır. Çalışmamızda ambroksolün tek başına uygulandığında etkinliğinin 24. saatten itibaren biyofilm içerisinde yaşayan bakteri sayısını anlamlı oranda azalttığı ve 96. saatte de etkinliğinin devam ettiği gösterildi. Fare modellerinde yapılmış bir başka çalışmada mukoid *P. aeruginosa* biyofilmi ile kaplanmış endotrakeal tüpler kullanılarak fare akciğerlerinde pnömoni oluşturulmuş. Entübasyonun 2. Gününden itibaren 22,5 mg/kg dozunda günde bir kez intravenöz yolla ambroksol verilmiş. Tedavinin 4. ve 7. günlerinde yapılan değerlendirmelerde; ambroksol ile tedavi edilen grupta biyofilm tabakasının daha ince olduğu ve yaşayan bakteri sayısının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Fare akciğerlerinde yapılan histopatolojik incelemelerde ambroksol ile tedavi edilen grupta akciğer dokusunda daha fazla bakteri yükü olduğu tespit edilmiş. Ambroksolün biyofilm yapısını parçalayarak serbest bakteri sayısını arttırdığı ve buna bağlı olarak akciğer dokusuna ulaşan bakteri sayısının da arttığı belirtilmiştir. Çalışmada tedavi amaçlı ambroksol kullanımının antibakteriyellerin etkisini arttırabileceği düşünülmekte ve antibakteriyeller ile kombine kullanımının uygun olacağı bildirilmektedir (159).

Biyofilm varlığında bakterilerin persistansının kolaylaştığı ve tedavisinin daha zor bir hal aldığı bilinmektedir. Buna bağlı olarak anti biyofilm stratejiler geliştirilmesi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bir çok çalışmada biyofilm matriksinin parçalanması hedeflenmiştir. Donelli ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada stafilokok biyofilmi için anahtar görevi gören N asetil 1,6 glukozamin bileşiğinin dispersin B (çözünür  $\beta$ -N glukozaminidaz) tarafından parçalanarak matür biyofilm oluşumunun önlenebileceği belirtilmektedir (160).

Chaignon ve arkadaşları ortopedik implant yüzeyinde in vitro şartlarda proteinaz K, tripsin, pankreatin ve dispersin B enzimlerinin biyofilm yapısını bozduğunu göstermiştir. Her iki çalışmada da biyofilm yapısının tek başına bozulmasının tedavide yeterli olmayacağı vurgulanmaktadır. Bu nedenle antimikrobisidallerin de antibiyofilm stratejileri içinde yer alması gerektiği ve patogenezinde biyofilm yapısının rol oynadığı enfeksiyonlarda kullanım şekillerinin ve etkinliklerinin değerlendirilmesi gündeme gelmiştir (161).



N-asetil sistein (NAC), antibiyotik özelliğinde olmayan ancak antimikrobiyal özellik taşıyan mukolitik bir ajandır. Yapılan çalışmalarda konsantrasyona bağlı olarak biyofilm yapısını parçaladığı ve yüksek konsantrasyonlarda antibakteriyel etkiye de yol açtığı gösterilmiştir. Biyofilm matriksini parçalamaya yönelik konsantrasyonların yüksek olması; intra venöz veya oral kullanımlarında etkin serum konsantrasyonlarına ulaşamaması nedeniyle lokal kullanımı önerilmektedir (162). Bir başka çalışmada *S. aureus*, *S. epidemidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *P. vulgaris* biyofilmleri üzerine NAC'ın tek başına ve siprofloksasin ile kombine kullanımının etkinliği değerlendirilmiştir. Hem NAC'ın hem de siprofloksasinin biyofilm üzerine etkinliklerinin doza bağlı olduğu gösterilmiş olup kombine kullanımlarının monoterapiden üstün olduğu gösterilmiştir. Çalışmada *P. aeruginosa* biyofilmi içindeki canlı bakteri yükünü tek başına NAC, MİC düzeyinde uygulandığında %68,2, siprofloksasin %81,4 oranında azalttığı belirtilmektedir. Kombine kullanımlarında ise canlı bakteri sayının %96 azalttıkları gösterilmiştir (164). Başka bir çalışmada ise *K. pneumoniae* biyofilm formasyonuna amikasin, tobramisin ve kolistin subinhibitör konsantrasyonlarda etkileri değerlendirilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonlarının yarısı konsantrasyonlarda uygulandıklarında amikasinin %21,2, tobramisinin %25,1 ve kolistin %7,4 oranında biyofilm formasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (165).

VİP, *P. aeruginosa*, özellikle geç dönemde gelişen enfeksiyonların önde gelen patojenlerindedir. VİP patogenezinde endotrakeal tüp üzerinde gelişen biyofilm tabakası, anahtar rol oynamaktadır. *P. aeruginosa* tedavisinde son yıllarda çoklu ilaca direnç geliştirmesi nedeniyle kolistin kullanımı giderek artmıştır. Çoklu ilaca dirençli, kolistin duyarlı *P. aeruginosa*'ya bağlı VİP tedavisinde tek başına kolistin tedavisi; ETT üzerindeki biyofilm varlığı, akciğer dokusuna ve plevral kaviteye geçişinin zayıf olması nedeniyle yeterli değildir (165).

Kolistin ve ambroksolün birlikte uygulanması halinde 24. saatten itibaren antibiyofilm etkinliğinin başladığı ve 96. saatte de devam ettiği tespit edildi. Kolistinin tek başına uygulanması durumunda 48. ve 72. saatlerde kombinasyon grubuna göre yeterli etkinlik sağlayamadığı gösterildi. Bu durum ambroksolün biyofilm oluşumunu engellemesi ve matür biyofilmi parçalayarak bakterinin

kolistinin etkilerine açık hale gelmesini sağladığı, antibakteriyel etkinliğini azaltacak mikroçevre oluşumunu engellediği ve biyofilmin moleküler filtre etkisini azaltması ile açıklanabilmektedir.

## VI. SONUÇ

Biyofilmler yıllardır endüstriyel bir sorun olarak karşımıza çıkarken özellikle yabancı cisimlerin tıpta kullanımının artması ile birlikte enfeksiyon hastalıkları açısından önemi gündeme gelmiştir. Özellikle çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiklerin biyofilm içindeki bakterilere yeterli etkisinin olmayışı ve enfeksiyonların kronikleşmesini önleyememesi nedeni ile antibiyofilm etkinliği olan ajanların araştırılması ve antibakteriyellerin biyofilmler içindeki farmokokinetiğinin yeniden gözden geçirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Ambroksolle birlikte N-asetil sistein, EDTA, furanon türevleri gibi ajanların temel kullanım alanlarının dışında antibiyofilm etkinliklerinin de olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ventilatör ilişkili pnömoni, enfekte bronşiektazi ve kistik fibrozis gibi kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonu ve enfeksiyon atakları ile seyreden hastalıklarda ambroksolün antibakteriyel ajanların yanında kullanılması; kolistin biyofilm üzerine etkinliğini artırmak amaçlı kullanılmasının faydalı sonuçlar doğuracağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca biyofilm matriksini parçalayan ajanların tek başına kullanımlarının planktonik bakteri sayısını artıracığı ve mevcut enfeksiyonun progresyonuna yol açabileceği göz önünde tutulduğunda tedavi stratejileri geliştirirken antibiyofilm bir ajanla antibakteriyel ajanların kombinasyonunun klinikte tercih edilmesinin gerektiği düşünülmektedir. Diğer bakteriler ve farklı antibakteriyel ajanlarla olan etkinliğinin değerlendirilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## VII. ÖZET

Bu çalışmada kolistin ve ambroksolün in vitro şartlarda ETT yüzeyinde oluşturulmuş *P. aeruginosa* biyofilmine etkinliği değerlendirilmiştir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi YBÜ’de yatan hastalara ait; balgam ve DTA örneklerinden Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarında izole ve tanımlanarak 27 *P. aeruginosa* çalışma kapsamına alındı. Biyofilm oluşumu Kongo Red Agar besiyeri ile tespit edildi. Kongo Red Agar besiyerinde yapılan koloni morfolojisi ve fenotipik değerlendirme sonucu 15 *P. aeruginosa* suşunun biyofilm üretebildiği tespit edildi. Biyofilm üreten suşlar kullanılarak elde edilen bakteri suspansiyonları hazırlandı. Steril şartlarda 1cm’lik parçalara ayrılmış ETT ile birlikte, her suş için 4 ayrı Brain Heart İnfusion sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. Bir günlük inkübasyon sonrası her suş için hazırlanmış olan 4 besiyerine kolistin, ambroksol, kolistin + ambroksol ayrı ayrı eklendi. Bir adet besi yeri kontrol amaçlı kullanıldı. Eklenen ajanlarla birlikte bakteriler ve ETT tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde her bir besiyerinden alınan ETT parçaları steril distile su ile yıkandıktan sonra %0,5 Tween80 sıvılarında vortekslendi ve oluşan suspansiyon dilue edilerek kanlı besi yerlerine ekildi. Bir günlük inkübasyon sonrası koloni sayım yöntemi ile bakteriler sayıldı.

Ambroksol grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $3.4 \times 10^5$  kob/ml; 48. saatte  $4.7 \times 10^3$  kob/ml; 72. saatte  $1.6 \times 10^2$  kob/ml ve 96. saatte  $1.4 \times 10^2$  kob/ml düzeyinde üreme tespit edildi. Kolistin grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $3.5 \times 10^6$  kob/ml; 48. saatte  $2.3 \times 10^6$  kob/ml; 72. saatte  $2.6 \times 10^6$  kob/ml ve 96. saatte  $2.9 \times 10^5$  kob/ml düzeyinde üreme mevcuttu. Ambroksol+kolistin grubunda matür biyofilm içinde 24. saatten itibaren biyofilm içerisindeki bakteri sayısı  $10^3$  kob/ml’nin altında izlendi. Kontrol grubunda matür biyofilm içinde 24. saatte  $2.7 \times 10^7$  kob/ml; 48. saatte  $2 \times 10^7$  kob/ml; 72. saatte  $1.3 \times 10^7$  kob/ml ve 96. saatte  $1 \times 10^7$  kob/ml düzeyinde üreme tespit edildi. Elde edilen sonuçlarda kolistin tek başına biyofilm üzerine etkinliğinin kontrolden fazla olduğu ancak ambroksolden daha az olduğu gözlemlendi.

Ambroksol ve kolistinin birlikte kullanılması halinde ise biyofilm etkinliğinin maksimuma ulaştığı gösterildi. Bu etkinin ambroksolün biyofilm yapısını ve maturasyonunu bozarak kolistinin biyofilm içerisine geçişini ve antibakteriyel etkinlik için uygun mikroçevre oluşumuna bağlı olduğu dşnld.

Çalışmanın sonucunda kronik enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde antibiyofilm strajilerin geliştirilmesi gerektiği, özellikle çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında kolistin tedavisine ek olarak antibiyofilm etkinliği olan bir ajanın kullanılmasının uygun olacağı kanısına varıldı.

## VIII. SUMMARY

This study has evaluated the impact of colistin and ambroxol on *P. aeruginosa* biofilm, formed on ETT under in vitro conditions.

Twenty-seven *P. aeruginosa* which has been isolated and identified in Clinical Microbiology and Infectious Diseases Laboratory through samples of sputum and DTA belonging to the inpatients in Ankara University Medical Faculty Ibn-i Sina Hospital ICU (intensive care unit), has been taken as the scope of this research. Biofilm formation has been determined with Congo Red Agar medium. It has been determined that 15 *P. aeruginosa* strains could produce biofilm in consequence of colony morphology and phenotypic evaluation in the Congo Red Agar medium. Bacteria suspensions obtained by using the strains producing biofilm have been prepared. Four separate Brain Heart Infusion liquid for each strain with ETT cut into 1 cm pieces in the sterilized conditions have been inoculated to the mediums. Colistin, ambroxol, colistin + ambroxol separately have been added to the 4 mediums prepared for each strain after diurnal incubation. One medium has been used for control purposed. Bacteria and ETT with addition agents have been put for the incubation again. ETT pieces taken from every medium at 24., 48., 72. and 96. hours. They have been made vortex in the liquid of 0, 5 % Tween80 after being washed with sterilized distilled water and suspension consisted has been inoculated to the blood agar medium by diluting. Bacteria has been counted by colony counting method after diurnal incubation.

The reproduction into the mature biofilm in the group of ambroxol has been determined at a level of  $3.4 \times 10^5$  cfu/ml at 24. hour;  $4.7 \times 10^3$  cfu/ml at 48. hour;  $1.6 \times 10^2$  cfu/ml at 72. hour;  $1.4 \times 10^2$  cfu/ml at 96. hour. There have also been reproduction into the mature biofilm in the group of Colistin at a level of  $3.5 \times 10^6$  cfu/ml at 24. hour;  $2.3 \times 10^6$  cfu/ml at 48. hour;  $2.6 \times 10^6$  cfu/ml at 72. hour;  $2.9 \times 10^5$  cfu/ml at 96 hour. Number of bacteria within the mature biofilm in the group of Ambroxol+Colistin has been monitored beneath  $10^3$  cfu/ml in the biofilm at 24. hour.

The reproduction into the mature biofilm within control group has been determined at a level of  $2.7 \times 10^7$  cfu/ml at 24. hour;  $2 \times 10^7$  cfu/ml at 48. hour;  $1.3 \times 10^7$  cfu/ml at 72. hour;  $1 \times 10^7$  cfu/ml at 96. hour.

It has been observed that the single efficiency of colistin on biofilm has been more than control, but less than ambroxol. The study has shown that when the ambroxol and colistin have been used together, the efficiency of biofilm has reached maximum. It has been thought that this increasing efficiency firstly has depended on to the better transition of colistin into the biofilm and secondly to the suitable micro environmental formation for antibacterial efficiency therefor getting damaged biofilm structure and maturation by ambroxol.

The outcomes of the research shows that the antibiofilm strategies should be developed for prevention and treatment of chronic infections and an agent having antibiofilm efficiency should be added to colistin treatment especially in multiple drug resistance. *P. aeruginosa* infections.

## IX. KAYNAKLAR

1. Peabody Cr, Chung Yj, Yen Mr, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley Ap, Saier Mh, Jr. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IVpili and archaeal flagella. *Microbiology* 2003; 149 (11): 3051-3072.
2. Meyer Jm. Pyoverdines. Pigments, Siderophores and Potential Taxonomic Markers of Fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* 2000; 174 (3): 135-142.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002; *Am J Infect Control* 2002; 30: 458-475.
4. Molina DN, Colon M, Bermudez RH, et al. Unusual presentation of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a review. *Bol Asoc Med P R* 1991; 83: 160-163.
5. Willcox MD. *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Inflammation During Contact Lens Wear: A Review. *Optom Vis Sci* 2007; 84: 273-278.
6. Robertson DM, Petroll WM, Jester JV, et al. Current Concepts: Contact Lens Related *Pseudomonas* Keratitis. *Cont Lens Anterior Eye* 2007; 30: 94-107.
7. Matar GM, Harakeh HS, Ramlawi F, et al. Comparative Analysis between *Pseudomonas aeruginosa* Genotypes and Severity Of Symptoms In Patients With Unilateral or Bilateral Otitis Externa. *Curr Microbiol* 2001; 42: 190-193.
8. Niall DM, Murphy PG, Fogarty EE, et al. Puncture wound related *Pseudomonas* infections of the foot in children. *Ir J Med Sci* 1997; 166: 98-1001.



9. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization and infection in ICU patients. *Intensive Care Med* 2007; 33: 1155-1161.
10. Poole K, Hancock RE. Phosphate-starvation-induced outer membrane proteins of members of the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*: demonstration of immunological cross-reactivity with an antiserum specific for porine protein P of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* 1986; 165: 987-993.
11. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *P. aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-964.
12. GE. Antimicrobial resistance in the hospital setting. impact, trends, and infection control measures. *Pharmacotherapy* 2000; 25 (10 Pt 2): 44-54
13. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-45
14. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (4): 999-1007.
15. Iolanda Francolini & Gianfranco Donelli. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections, *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 1-12.
16. Rodney M. Donlan<sup>1</sup> and J. William Costerton<sup>2</sup> Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 167-193.
17. Saima Aslam, MD Effect of antibacterials on biofilms Section of Infectious Diseases, Baylor College of Medicine, and Michael E. DeBakey VA Medical Center, Houston 2008; 36 (10): 175.
18. Julianne V. Kus, Elizabeth Tull Dennis, G. Cvitkovitch, Lori L. Burrows. Significant differences in type IV pilin allele distribution among

*Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 2004; 150: 1315–1326.

19. Washington Winn, Jr. Stephen Allen, William Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, Gail Woods. *The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore. 2006; p-316.
20. [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:p\\_aeruginosa\\_pigment.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:p_aeruginosa_pigment.jpg).
21. Palleroni Nj. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*. a personal view. *Microbiology* 2003; 149 (1): 1-7.
22. Deretic V, Schurr Mj, Yu H. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 1995; 3 (9): 351-356.
23. Geo. F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. *Pseudomonads, Acinetobacters and Uncommon Gram-Negative Bacteria*. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Third Edition, International Edition, Singapore. 2004; s: 262.
24. Theilacker C, Coleman F, Mueschenborn S, et al. Construction and characterization of a *P. aeruginosa* mucoid exopolysaccharid/alginate conjugate vaccine. *Infect Immun* 2003; 71: 3875-3884.
25. Pier GB, Desjardins D, Aguilar T, et al. Polysaccharide surface antigens expressed by non-mucoid isolates of *P. aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 189-196.
26. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysacchariden in *P. aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 644-648.

27. Gerald B. Pier/Reuben Ramphal; *Pseudomonas aeruginosa*, Bacterial Diseases: Section F, Chapter 219; Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010; p: 2837.
28. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, et al. Dynamics of *P. aeruginosa* genome evolution. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 3100-3105.
29. Kelly NM, McDonald MH, Martin N, et al. Comparison of the outer membrane protein and lipopolysaccharides profiles of mucoid and non-mucoid *P. aeruginosa*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2017-2021.
30. Woodford N, Ellington Mj. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (1): 5-18.
31. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A. *Pseudomonas aeruginosa*. resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (6): 560-578.
32. Gerald B. Pier/Reuben Ramphal; *Pseudomonas aeruginosa*, Bacterial Diseases: Section F, Chapter 219; Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010; p: 2835.
33. *Pseudomonas* dermatitis/folliculitis associated with pools and hot tubs – Colorado and Maine, 1999-2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000; 49: 1087-1091.
34. Eifrig CW, Scott IU, Flynn HW Jr, et al. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmology 2003; 110: 1714-1717.
35. Rajashekaraiiah KR, Dhawan VK, Rice TW, et al. Increasing incidence of *Pseudomonas* endocarditis among parenteral drug abusers. Drug Alcohol Depend 1980; 6: 227-230.

36. Kropec A, Huebner J, Riffel M, et al. Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* infections in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med* 1993; 19: 161-165.
37. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2001; 27: 503-512.
38. Edwards-Jones V, Greenwood JE. What's new in burn microbiology James Laing Memorial Prize Essay 2000. *Burns* 2003; 29: 15-24.
39. Grattard F, Mahul P, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2007; 27: 508-518.
40. Cardenosa Cendrero JA, Sole-Violan J, Bordes Benitez A, et al. Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation. *Chest* 1999; 116: 462-470.
41. Krueger WA, Lenhart FP, Neeser G, et al. Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgical patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1029-1037.
42. Krueger WA, Unertl KE. Selective decontamination of the digestive tract. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 139-144.
43. De Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, et al. Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomized controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 1011-1016.
44. Chan EY, Ruest A, Meade MO, et al. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334: 889.

45. Speert DP. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Biosci 2002; 7: e354-e361.
46. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by Gram-Negative bacilli. Clin Infect Dis 2005; 41: 848-854.
47. Klevens RM, Edwards JR, Gaynes RP. The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in United States. Clin Infect Dis 2008; 47: 927-930.
48. Wu Lr, Zaborina O, Zaborin A, Chang Eb, Musch M, Holbrook C, Turner Jr, Alverdy Jc. Surgical injury and metabolic stress enhance the virulence of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Surg Infect (Larchmt) 2005; 6 (2): 185-195.
49. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem 2007; 387 (2): 409-414,
50. Yağcı A, Yagcı T, Sener B, Suzukı Y, Ahmed K. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. New Microbiol 2007; 30 (2): 167-171.
51. Pollack M, Koles NI, Preston Mj, Brown Bj, Pier Gb. Functional properties of isotype-switched immunoglobulin M (IgM) and IgG monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. Infect Immun 1995; 63 (11): 4481-4488.
52. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Al Nassafi K, Manos J, Elkins M, Bye P, Willcox M. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2007; 45 (6): 1697-1704.
53. Alcorn Jf, Wright Jr. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. J Biol Chem 2004; 279 (29): 30871-30879,.

54. Grande Kk, Gustin Jk, Kessler E, Ohman De. Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. *J Bacteriol* 2007; 189 (11): 3960-3968.
55. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targetting Mechanisms of *P. aeruginosa* pathogenesis, *Med Mal Infect* 2006; 36: 78-91.
56. Wiener-Kronish Jp, Sakuma T, Kudoh I, Pittet Jf, Frank D, Dobbs L, Vasil Ml, Matthay Ma. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993; 75 (4): 1661-1669.
57. Cowell Ba, Twining Ss, Hobden Ja, Kwong Ms, Fleiszig Sm. Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology* 2003; 149 (Pt 8): 2291-2299.
58. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virulans faktörleri ve Quorum Sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008; 38 (1): 42-51.
59. Kipnis E, Guery BP, Tournoys A, et al. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* – induced acute lung injury. *Shock* 2004; 21 (5): 444–451.
60. Howe TR, Iglewski BH. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* 1984; 43: 1058-1063.
61. Toutain Cm, Zegans Me, O'toole Ga. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2005; 187 (2): 771-777.
62. Rashid Mh, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (9): 4885-4890.

63. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaesjorgensena, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 2003; 48 (6): 1511-1524.
64. Doyle Tb, Hawkins Ac, Mccarter Ll. The complex flagellar torquegenerator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; 186 (19): 6341-6350.
65. Patriquin Gm, Banin E, Gilmour C, Tuchman R, Greenberg Ep, Poole K. Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007; 189 (22): 8357-8360.
66. Mattick Js. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56. 289-314.
67. Huang B, Ru K, Yuan Z, Whitchurch Cb, Mattick Js. tonB3 isrequired for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J Bacteriol* 2004; 186 (13): 4387-4389.
68. ShrouT Jd, Chopp Dl, Just Cl, Hentzer M, Givskov M, Parsekmr. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* 2006; 62 (5): 1264-1277
69. Kohler T, Curty Lk, Barja F, Van Delden C, Pechere Jc. Swarmingof *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 2000; 182 (21): 5990-5996.
70. Ryder C, Byrd M, Wozniak Dj. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10 (6): 644-648.
71. Jain S, Ohman De. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2005; 73 (10): 6429-6436.

72. Mustafa Onuran. *P. aeruginosa* suşlarının, biofilm oluşturma ve alginat üretme yetenekleri, ve anti bakteriyeriyel madde varlığındaki değişimleri. Mikrobiyoloji Doktora Tezi. 2007; s: 9.
73. Ramsey Dm, Wozniak Dj. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 2005; 56 (2): 309-322.
74. Mavrodi Dv, Bonsall Rf, Delaney Sm, Soule Mj, Phillips G, Thomashow Ls. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2001; 183 (21): 6454-6465.
75. Britigan Be, Railsback Ma, Cox Cd. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha 1 protease inhibitor. Implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun* 1999; 67 (3): 1207-1212.
76. Buckling A, Harrison F, Vos M, Brockhurst Ma, Gardner A, West Sa, Griffin A. Siderophore-mediated cooperation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 62 (2): 135-141.
77. LAU Gw, Ran H, Kong F, Hassett Dj, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 2004; 72 (7): 4275-4278.
78. Rocha Cl, Coburn J, Rucks Ea, Olson Jc. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A. 1macrophages. *Infect Immun* 2003; 71 (9): 5296-5305.
79. Lagoumintzis G, Christofidou M, Dimitracopoulos G, Paliogianni F. *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect Immun* 2003; 71 (8): 4614-4622.



80. Costerton JW, Geesey GG and Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238 (1): 86-95.
81. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (2): 167-93.
82. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 229-33.
83. Daniel López, Hera Vlamakis and Roberto Kolter. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a000398.
84. An YH, Dickson RB, Doyle RJ. Mechanism of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infection. In: An YH, Friedman RJ, ed. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. Totowa, N. J: Human Press 2000: 1-27.
85. Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 50: 61–68.
86. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ.. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2230–2241.
87. Stewart Ps. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003; 185 (5): 1485-1491
88. Romanova IuM, Gintsburg AL. Bacterial Biofilms as a Natural form of existence of bacteria in environment and host organism. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2011; 3: 99 – 109.
89. Stewart Ps. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003; 185 (5): 1485-1491
90. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (4): 999-1007.

91. Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990; 161 (1): 37-40.
92. Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 22 (5): 667-74.
93. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38 (9): 2125-33.
94. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101-9.
95. Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U., Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* 2002; 70 (6): 2758-62.
96. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
97. Hatice Uludağ Altun, Burçin Fiener. Biyofilm Enfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39-2: 82-88.
98. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (9): 881-90.
99. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387 (2): 409-414.
100. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacterio* 2007; 189 (14): 5383-5386.

101. Taga, M. E. and Bassler, B. L. Chemical communication among bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100, 14549-54.
102. Eberl, L. et al. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. Journal of Bacteriology 1998; 180 (23): 6384-6388.
103. Kohler, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. Journal of Bacteriology 2001; 182, 5990-59967.
104. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology 2000; 147, 2517-2528.
105. Federle, M. J. and Bassler, B. L. Interspecies communication in bacteria. Journal of Clinical Investigation 2003; 112, 1291 -299.
106. Magnuson, R., Solomon, J. and Grossman, A. D. (Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. Cell 1994; 77, 207-216.
107. Qin, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infection and Immunity 2000; 68, 2579-2586.
108. Winans, S. C. and Bassler, B. L. Mob psychology Journal of Bacteriology 2002; 184, 873-883.
109. Stover, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406, 959-964.
110. Pesci, E. C. et al. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 1997; 179, 3127-3132.

111. Lequette, Y. et al. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology* 2006; 188, 3365-3370.
112. Thomas Bjarnsholt, Tim Tolker-Nielsen, Niels Hoiby and Michael Givskov. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control Expert Reviews <http://www.expertreviews.org/> in *Molecular Medicine* Cambridge University 2010; 12: e11.
113. Lequette, Y. et al. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology* 2006; 188, 3365-3370
114. Juhas, M. et al. Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2004; 150, 831-841.
115. Skindersoe, M. E. et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52, 3648-3663.
116. Medina, G. et al. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 2003; 149, 3073-3081.
117. Dubern, J. F. and Diggle, S. P. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular Biosystems*. 2008; 4, 882-888.
118. McGrath, S., Wade, D. S. and Pesci, E. C. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) FEMS. *Microbiology Letters* 2004; 230, 27-34.
119. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology* 2001; 183, 6207-6214.
120. McKnight, S. L., Iglewski, B. H. and Pesci, E. C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.

Journal of Bacteriology 2000; 182, 2702-2708 62 Gallagher, L. A. and Manoil.

121. Nivens, D. E. et al. () Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. Journal of Bacteriology 2001; 183, 1047-1057 66.
122. Allesen-Holm, M. et al. A Characterization Of DNA Release In *Pseudomonas aeruginosa* Cultures and Biofilms. Molecular Microbiology 59. 2006; 1114-1128.
123. Disse, B. G. The pharmacology of ambroxol-review and new results. Eur J Respir Dis 1987; 71: 255-262.
124. Disse BG, Ziegler HW. Pharmacodynamic mechanism and therapeutic activity of ambroxol in animal experiments. Respiration 1987; 51 (Suppl 1): 15-22.
125. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Effects of drugs on mucus clearance. Eur Respir J 1999; 14: 452-67.
126. Heath MF, Jacobson W. The inhibition of lysosomal phospholipase A from rabbit lung by ambroxol and its consequences for pulmonary surfactant. Lung 1985; 163: 337-44.
127. Tamaoki, J., Chiyotani, A., Yamauchi, F., et al. Ambroxol inhibits Na<sup>+</sup> absorption by canine airway epithelial cells in culture. J. Pharm 1991; 43: 841-843.
128. Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Bialasiewicz, P., Pietras, T. Antioxidant Properties of Ambroxol. Free Radical Biology and Medicine 1994; 16: 517-522.
129. Fu, Z., Mao, M., Hu, Z., Jiang, Y., Wu, G., Yu, X. Effects Of Ambroxol On Oxidation and Antioxidation of Patients Suffering From Mechanical Ventilation. Zhongguo Yiyuan Yaolixue Zazhi 2005; 25: 58-59.

130. Gillissen A, Scharling B, Jaworska M, et al. Oxidant Scavenger Function of Ambroxol In Vitro: A Comparison With N-Acetylcysteine. *Res Exp Med* 1997; 196: 389-98.
131. Aiharai M., Dobashi, K., Akiyama, M., et al.. Effects of N-Acetylcystein and Ambroxol On The Production Of IL-10 And IL-10 In Human Alveolar Macrophages. *Respiration* 2000; 67: 662-671.
132. Grabner R. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase A2. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1063-7.
133. Pfeifer S, Zissel G, Kienast K, et al. Reduction of cytokine release of blood and bronchoalveolar mononuclear cells by ambroxol. *Eur J Med Res* 1997; 2: 129-32.
134. Melillo G, Cocco G. Ambroxol decreases bronchial hyperreactivity. *Eur J Respir Dis* 1986; 69: 316-20.
135. Gibbs BF, Wolff HH, Grabbe J. Effects of free radical scavengers on histamine release from human basophils stimulated by immunological and non-immunological secretagogues. *Inflamm Res* 1999; 48: 13-4.
136. Fang Li, Jialin Yu, Hua Yang, Zhenyan Wan, Dan Bai Effects of Ambroxol on Alginate of Mature *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms *Curr Microbiol* 2008; 57: 1–7.
137. Fang Li, Jialin Yu, Hua Yang, Zhenyan Wan, Dan Bai Effect of Ambroxol on Pneumonia Caused by *Pseudomonas aeruginosa* with Biofilm Formation in an Endotracheal Intubation Rat Model. *Chemotherapy* 2011; 57 (2): 173-80.
138. Lee HJ, Joung SK, Kim YG, et al. Bioequivalence assessment of ambroxol tablet after a single oral dose administration to healthy male volunteers. *Pharmacol Res* 2004; 49: 93-8.

139. Öznur AKKOCA YILDIZ Ambroksol Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2006; 54: Ek 1: 3-14.
140. Bergan T, Fuglesang J. Polimixin antibiotics. chemical and pharmacokinetic properties. *Antibiot Chemother* 1982; 31: 119-144.
141. Hancock RE, Chaple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1317-1323.
142. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. Wayne, PA: NCCLS 1981.
143. Berlana D, Llop JM, Fort E, Badia MB, Jodar R. Use of colistin in the treatment of multiple drug resistant gram negative infections. *Am J Health Syst Pharm* 2005; 62: 39-47
144. Azap ÖK, Arslan H, Ergin F, İnci EK. Kolistinin Non-Fermantatif Gram negatif bakterilere in-vitro etkinliği. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58: 65-67.
145. Hancock REW, Bell A. Antibiotic update in to gram negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 713-720.
146. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polimixin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 183-190.
147. Cai Y, Wang R, Liang BB, An MM In-vitro bactericidal activity of colistin against biofilm-associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect* 2009; 72 (4): 368-70.
148. Karadenizli A, Kolaylı F, Gündes S, Ergen K. *Pseudomonas aeruginosa*' nın tikarsilin - klavulanik aside duyarlılığının hastanede kullanıma girmeden ve

kullanıma girdikten bir yıl sonraki değişiminin araştırılması. KLİMİK 2002; 15: 89-91.

149. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Anti- Pseudomonal Agents. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1379-1382.
150. Aydın K, Çaylan R, Köksal, Volkan S, Öksüz R. *Pseudomonas aeruginosa* suslarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. Hastane İnfeksi Derg 2000; 4: 92-96.
151. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 128-132
152. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. Int J Antimicrob Agents 2007; 30: 236-241.
153. Giamarellou H. Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. Int J Antimicrob Agents. 2000; 16: 103-6
154. Ronald N. Jones. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. Etiologies of HABP and VABP CID 2010; 51 (Suppl 1).
155. Nixon, G. M., D. S. Armstrong, R. Carzino, J. B. Carlin, A. Olinsky, C. F. Robertson, and K. Grimwood. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. J Pediatr 2001; 138: 699-704.
156. Favre-Bonte S, Köhler T, Delden CV. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 598–604.
157. Sakarya S. Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. In: Çavuşlu S, Oral Ö, editors. 12. Türk Klinik



Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 16-20 Kasım 2005; Antalya-Belek. 3-8.

158. Janus A. J Haagensen, Mikkel Klausen, Robert K. Ernst, Samuel I. Miller, Anders Folkesson, Tim Tolker-Nielsen and Soren Molin. Differentiation and Distribution of Colistin and Sodium Dodecyl Sulfate-Tolerant Cells in *P. aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology*. Jan 2007, p. 28-37.
159. Fang Li, Wenlei Wang, Linyan Hu, Luquan Li, Jialin Yu. Effect of Ambroxol on Pneumonia Caused by *Pseudomonas aeruginosa* with Biofilm Formation in an Endotracheal Intubation Rat Model. *Chemotherapy* 2011; 57: 173–180.
160. G. Donelli, I. Francolini, D. Romoli, E. Guaglianone, A. Piozzi, C. Ragunath, and J. B. Kaplan. Synergistic Activity of Dispersin B and Cefamandole Nafate in Inhibition of Staphylococcal Biofilm Growth on Polyurethanes. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2007; 2733–2740.
161. Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah Ch, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75 (1): 125-32.
162. C. Perez-Giraldo, A. Rodriguez-Benito, F. J. Moran, C. Hurtado, M. T. Blanco and A. C. Gomez-Garcia. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997.
163. Mohammed A, El-Feky, Mostafa S, El-Rehew Y, Mona A, Hassan, Hassan A, Abolla A, Rehab M, Gamal F; Effect of Ciprofloxacin and N-acetylcysteine on Bacterial Adherence and Biofilm Formation on Ureteral Stent Surfaces: *Polish J Microbiology* 2009; 58 (3) 261-267.
164. Hostacka A, Ciznar I. Aminoglycosides and colistin inhibit biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2008; 57 (3): 101-5.

165. Argyris S Michalopoulos and Matthew E Falagas Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. Michalopoulos and Falagas *Annals of Intensive Care* 2011, 1: 30.