



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ A.D.  
Doç. Dr. Serhan SAKARYA

**BAKTERİ YÜZEY SLİME YAPISINDAKİ MOLEKÜLLERİN,  
BAKTERİ ADHERANSI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNE  
ETKİSİ**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Ş. Barçın ÖZTÜRK**

**Tez danışmanı: Doç. Dr. Serhan SAKARYA**

**Aydın - 2006**



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ A.D.  
Doç. Dr. Serhan SAKARYA

**BAKTERİ YÜZEY SLİME YAPISINDAKİ MOLEKÜLLERİN,  
BAKTERİ ADHERANSI VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNE  
ETKİSİ**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Ş. Barçın ÖZTÜRK**

**Tez danışmanı: Doç. Dr. Serhan SAKARYA**

**Aydın - 2006**

## TEŞEKKÜR:

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında tüm bilgi ve desteğini veren, çağdaş dünya görüşü ve mütevazı kişiliği ile, bilgi ve tecrübesini paylaşıırken kendisiyle çalışan herkesin düşüncelerini ifade etmesine olanak sağlayan, bilimsel kimliği ile hekimlik hayatımın akışında belirleyici olan değerli eğitimcim Doç. Dr. Serhan Sakarya' ya,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgiye ulaşma konusunda bana yol gösteren, farklı bakış açısı ile enfeksiyon hastalıklarına yaklaşım konusunda bana çok önemli katkıları olan değerli eğitimcim Doç. Dr. Serkan Öncü' ye,

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanı olmanın sorumluluğunu her fırsatta göstererek, hekimlik kimliğime önemli katkıları olan, bilimsel desteğine her zaman ulaşmaya olanak sağlayan değerli eğitimcim Uzm. Dr. M. Bülent Ertuğrul' a

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Güliz Uyar, Dr. Pelin Gençer Oruç ve Dr. Yasemin Şahin'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca pek çok konuda yardım ve desteğini gördüğüm çalışma arkadaşım ve dostum Hem. Müjgan Aydemir' e,

Tüm asistanlığım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim dostlarım Uzm. Dr. Mediha Ayhan ve Dr. Neslihan Soysal' a,

Tez hazırlama sürecimde benimle birlikte "Merkez Araştırma Laboratuvarı"nda geç saatlere kadar çalışma fedakarlığı gösteren ve desteklerini benden esirgemeyen Burcu Kurt Mestav ve Engin Gülen' e,

Tezimin hazırlanmasında bana materyal konusunda destek veren S. B. İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'ne Doç. Dr. Onur Özgenç'in şahsında, çalışan tüm uzman ve asistanlara, özellikle Dr. Berna Bozca' ya,

Yaşamım süresince her zaman destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, bu günümü borçlu olduğum sevgili anneme ve babama teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER:**

	Sayfa No
Giriş	1
Genel bilgiler	3
Bakteriler neden biyofilm oluştururlar?	5
Bakteriler nasıl biyofilm oluştururlar?	7
Biyofilmin yapısı	11
Konak savunmasından korunma mekanizmaları	19
Biyofilm ve antibiyotik direnci	20
Biyofilm yapısında siyalik asitin rolü	22
Biyofilmler ile ilgili enfeksiyonlar	26
Biyofilmler ve yabancı cisim enfeksiyonları	31
Gereç ve yöntem	38
Bulgular	44
Tartışma	54
Sonuç	59
Özet	60
Kaynaklar	62

## GİRİŞ:

Mikrobiyal biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeye irreversibl olarak adhere olması sonrası yapısal matriks sağlayan ve adhezyonu kolaylaştıran ekstrasellüler polimerlerin üretilmesi ile gelişirler[1]. Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar[2]. Biyofilmler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin sonlarından beri yapılmaktadır. Biyofilmler, normal flora gelişiminden endokardite, kistik fibrozdan otitis mediaya, yabancı cisim enfeksiyonlarından üriner sistem enfeksiyonlarına kadar birçok enfeksiyonun gelişiminden sorumludur. Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir[3-5]. Yabancı cisim ve diğer kronik enfeksiyonlarla, antibiyotiklere ve konak savunmasına karşı kazanılmış direnç paternleri ile ilgili çalışmalara dayanarak "Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)", tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonların oranı % 65 olarak açıklamıştır[6].

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir[7]. Bunun gibi birtakım çevresel faktörlerin etkisi ile genetik modülasyon sonucu ortaya çıkan ve "quorum sensing" olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir[8-12]. Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmid transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir[13].

Biyofilmin yapısı henüz kesin olarak tanımlanamamış olmakla birlikte, fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarının birçoğundan yapısındaki karbonhidratlar sorumlu gibi görünmektedir. Sialik asit, organizmalarda, vertebralılarda ve tüm memelilerin dokularında bulunan bir aminoşekerdir. Sialik asitin vücuttaki en önemli rolü, hücre yüzeyindeki negatif yükü oluşturmak ve hücreler ile hücreler arası matriks arasındaki ilişkileri sağlamaktır [14]. Sialik asidin hücre yüzeyindeki miktarı; hücrenin deformabilite, motilite ve adhezivliği gibi özelliklerinde, dolaşan hücrelerin immun sistem tarafından tanınması ve kompleman tarafından yok edilmesi gibi immünolojik olaylarda maske görevi oluşturmada ve immun sistem hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir belirleyicidir. Tüm bu özellikleri nedeniyle sialik asitin, biyofilm fonksiyonlarında anahtar rolü olan karbonhidrat olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma siyalik asitin bakteri adheransındaki öneminden yola çıkarak bu konuda yapılacak çalışmaların birçok ciddi enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisinde hedef molekül olabileceği tezine dayanılarak yapılmıştır. Çalışmada slime oluşumunun bakteri adheransı ve antibiyotik direnci ile ilişkisinin yanısıra, nöraminidaz kullanılarak siyalik asitin uzaklaştırılmasının slime oluşumu, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi de araştırılmıştır.

## GENEL BİLGİLER:

Biyofilm (slime) kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978' den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır. Bu teoriye göre; yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmı biyofilm tabakasını oluşturan matrikste büyürler ve bu sesil bakteriler planktonik eşdeğerlerinden farklılık göstermektedirler. [15]. Biyofilmlerin varlığı derin yer altı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır [16].

Biyofilmlerin tanımlanması son 30 yılda gelişmiştir. Marshall 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir[17] Costertan ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarid içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adhezyona aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir[15]. Costertan ve arkadaşları 1987' de biyofilmin daha çok aniyonik eksopolimer matriksden oluşan oldukça hidrate yapı içinde sesil hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu bildirmiştir[18].

Costerton ve Lappin-Scott, adhezyonu tetikleyen gen ekspresyonunun, adhezyon ve biyofilm formasyonu için gerekli olan bakteriyel bileşenlerin üretimini kontrol ettiğini belirlemişlerdir[16]. Bu da biyofilm oluşumunun spesifik genler tarafından düzenlendiğinin en önemli göstergesidir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmada, Davies ve Geesey alginate (eksopolisakkarit) sentezini içeren, fosfomannomutazı kontrol eden genin (algC), solid yüzeylere adhezyonu dakikalar içinde arttırdığını göstermişlerdir. Son yıllardaki çalışmalarla algD, algU, rpoS ve polifosfokinaz sentezini kontrol eden genlerin biyofilm formasyonunda arttığı ve 45 kadar farklı gen ekspresyonunun sesil hücreler ve onların planktonik yandaşları tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir[19].

Bakteriler, yerlerini belirlemeye imkan veren kompleks sinir sistemlerinden yoksun olmaları nedeniyle, sağ kalmak için çeşitli stratejilere başvururlar. Bunun sonucu olarak da, doğal ve endüstriyel ortamlarda antibakteriyel kimyasallardan (doğal antibiyotikler dahil), çevresel bakteriyofajlardan ve fagositik uzantılardan korunmalarını sağlayan biyofilm formunda bulunurlar. Bu nedenle kronik biyofilm enfeksiyonları antibiyotik tedavisine ve antikolarlar ile fagositler gibi konakçı temizleme mekanizmalarına dirençlidir[20].

Biyofilmler; hidrate bir matriks içine gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı, yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklardır[2]. En yeni tanımı ile biyofilmler; mikroplar tarafından oluşturulan ekstrasellüler polimerik madde yoluyla, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışarak, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu matriks olarak tanımlanmıştır[20]. Polisakkarit yapıdaki bu matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilmin gelişme potansiyeli; yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alınımı, atıklarının uzaklaştırılması ile yakın ilişkili olup, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu eksprese olan quorum sensing moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O<sub>2</sub> perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite de gelişimde çok etkilidir[8, 21-26].

Biyofilm içinde yaşamak mikroorganizma için avantajlıdır. Öncelikle matriks, hem fiziksel güçlere hem de kimyasal saldırılara karşı (hidrojen peroksit ve klorin gibi) koruyucu bir bariyer sağlar[27-29]. Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye dirençlidir ve fagositoza direnç göstererek immun sistemden kaçır[3-5]. Bundan başka, matriks küçük moleküllerin biyofilm dışına difüzyonunu yavaşlatır, metabolik değişim için mükemmel bir ortam hazırlar. Bu dönüşüm, farklı nutrisyonel gereksinimlere sahip birçok tür ya da suşun biyofilm içinde bir arada olmasına izin verir[2]. Biyofilimde bakterilerin birbirlerine yakınlığının genetik materyalin lateral transferini arttırdığı düşünülür[30].

Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye isteyerek yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar[2]. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* sıklıkla, kardiyak pacemaker, IV ve üriner kateterler, eklem protezleri ve kalp kapakları gibi medikal araçlara kolonize olur ve kronik enfeksiyonlara neden olurlar[31]. Birçok orguda bu enfeksiyonlarda, ancak aracın çıkarılması ile kür sağlanabilir[1, 31, 32]. Ek olarak, *P. aeruginosa*, kistik fibrozlu hastalarda, agregatların biofilm benzeri yapı oluşturmasıyla, akciğerde kolonize olur ve antibiyotik direncinde artış gözlenir. Kistik fibroz hastaları, *P. aeruginosa* ile, bakterinin akciğerde biyofilm oluşturmaya bağlı olduğuna inanılan kronik enfeksiyonlara duyarlıdır[33].

Binlerce bakteri türünün oluşturduğu biyofilmden oluşan dental plak bakterileri, bakteriyemi ve bazen de endokardit ile sonuçlanabilen dolaşım enfeksiyonlarının giriş yoludur[34].

Bakteriler tercihan olumsuz ortamlarda biyofilm yaparlar[35]. Birçok kez pasajlanmış ve adhezyon yeteneğini yitirmiş laboratuvar suşlarıyla yapılmış bakteriyel adhezyon çalışmalarında, pürüzsüz yüzeylerin bakteriyel adhezyondan kaçabildiği saptanmıştır. Buna



karşılık; pasajlanmamış ve bütünüyle adheran bakteriyel suşlarla yapılan çalışmalarda, pürüzsüz yüzeylerin pürüzlü yüzeyler kadar kolay kolonize olduğu ve yüzeyin fiziksel özelliklerinin bakteriyel adhezyona etkisinin minimal olduğu gösterilmiştir[16]. Biyofilm oluşumu sonrası sesil hücreler tarafından sentezlenen eksopolisakkarit matriks, biyofilme viskoelastik bir yapı kazandırır[36]. Bakterilerin uygun koşullarının olduğu ortamlarda oluşturdukları biyofilmler kırılğan bir yapıya sahipken, uygun olmayan koşullarda ürettikleri biyofilmlerin viskozitelerinin arttığı ve mekanik kırılmalara dayanıklı oldukları gösterilmiştir[20].

## **Bakteriler Neden Biyofilm Oluştururlar?**

### **1. Savunma: Biyofilm formasyonunda strese yanıt**

Biyofilmler, kan akımı ve salgıların yıkayıcı etkisi tarafından oluşturulan gerilme kuvvetleri gibi fiziksel kuvvetlere dirençlidir. Biyofilm içindeki organizmalar besinsel eksikliklere, pH değişikliklerine, oksijen radikallerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı koymada, planktonik hücrelerden daha başarılıdırlar. Biyofilmler fagositoza da dirençlidirler ve fagositozun biyofilme zarar verme çabası gerçekte, biyofilmin kendisinden çok çevre dokuya zarar verir. Bazı enfeksiyonların kronik olması, esnek biyofilm yapısının gelişmesine bağlıdır. Biyofilmin hasar görmeyen yapısı tam olarak anlaşılamamıştır, ancak büyük oranda yavaş büyüme hızı ve biyofilmdeki organizmaların çeşitliliği gibi biyofilme spesifik özelliklere bağlı gibi görünmektedir. Biyofilmin direncini arttıran diğer bir önemli özellik, DNA ve diğer polimerleri, özellikle de eksopolisakkaritleri (EPS), içeren yapışkan matriks yapısıdır[37]. EPS, biyofilmdeki total organik karbonun % 50-90' ını oluşturur[38]. Çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olmakla birlikte, primer olarak polisakkaritlerden oluşur[20]. Agregasyon ve biyofilm yapısındaki rolü nedeniyle eksopolisakkaritler (EPS), bakteriyi gerilim oluşturan güçlerden ve inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korur[39].

### **2. Kolonizasyon:**

İnsan ve hayvanlar, sürekli olarak vücutlarına yerleşmeye çalışan mikroorganizmalara karşı kompleks bir immun sistem geliştirmişlerdir. Vücudun en azından bir bölümü, bakterinin yaşama ve gelişmesi için gerekli besin, su, O<sub>2</sub> ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan faktörlerle sabit bir yapı oluşturmaktadır. Tüm bunların sonucu vücudun immün sistemi ile bakteri arasında, vücudu istila etmesine karşı amansız bir yarış süregitmektedir. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belli bölgelerde büyük miktarlarda kommensal bakterilerin yaşamasına müsaade edilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadırlar[37].

Bakteriler vücutta kalmak için çok sayıda strateji geliştirmişlerdir. Konağın ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanan bakteriyel yüzey proteinleri (fibronektin,

fibrinojen, vitronektin ve elastin), MSCRAMM (mikrobiyal yüzey komponentini tanıyan adheziv matriks molekülleri) olarak tanımlanır ve bakterinin konakçıdaki solid yüzeylere adheransında anahtar rol oynar[40]. Bu adherans sonrası bir yandan çoğalan mikroorganizmalar, diğer yandan biyofilm oluşturma özelliklerine göre, oluşturdukları biyofilm tabaka ile adhere oldukları bölgeye adheranslarını arttırmaları. Buna karşın biyofilm oluştuğunda, bakteri popülasyonunda adheziv ve motilite faktörlerinin salınımı baskılanır. Bu durum, adheziv, pili ve flajellaların başlangıçtaki bağlanmada esas rolü oynadığını ve biyofilm geliştiğinde proteinlerin ekspresyonunun inhibe olduğunu düşündürmektedir[37].

Biyofilm oluşum hipotezini destekleyen diğer bir bulgu da, karbon katabolitlerini indükleyen gen regülasyonunun biyofilm formasyonunda kritik rol oynadığı bulgusudur. Eksopolisakkarit ekspresyonu ve biyofilmin genişlemesi, glukoz ya da diğer kullanılabilir karbon kaynaklarının bol olması durumunda, pseudomonaslar, *V. cholerae*, *E. coli*, stafilokoklar ve streptokoklar gibi bazı bakterilerde önemli ölçüde artmıştır[41-44]. Besin kaynakları tükendiğinde bakteri ayrılır ve planktonik duruma geçer. Glukoz aracılı eksopolisakkarit üretimi multifonksiyonel olabilir. Glukozun EPS sentez yolunda basit bir substrat olduğu düşünülmektedir. Glukozun, EPS yapımını transkripsiyonal regülasyon düzeyinde arttırdığı görülmektedir[44].

### 3. Topluluk Oluşturmak:

Farklı bakterilerin aynı ortama adapte olmaları yaşadıkları çevre içinde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Farklı bakteriler çevreden aldıkları uyarılar doğrultusunda hızla biyofilm oluştururken, biyofilm oluşturmuş topluluklar da planktonik hale geçebilir. Bu özelliğini ortama göre eksprese olan genler aracılığı ile sağlamaktadır. Tüm bunlar bakterinin fenotipik farklılıkları olmasına karşın aynı çevre faktörlerine aynı yanıtı vermeleri topluluk oluşturma özelliklerinin en önemli göstergesidir. [37].

Topluluk oluşturmak için bakteriler;

- a) Metabolik yükü paylaşmak
- b) Gen transferi
- c) Özverili davranış gibi bir dizi düzenlenebilir davranışlar gösterirler.

### 4. Yaşanabilir çevre geliştirme:

Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının, pseudomonaslar, *V.cholerae*, *E. coli* ve stafilokokların EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapılmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakçıda

uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir [37, 41, 42].

### Bakteriler Nasıl Biyofilm Oluşturur?

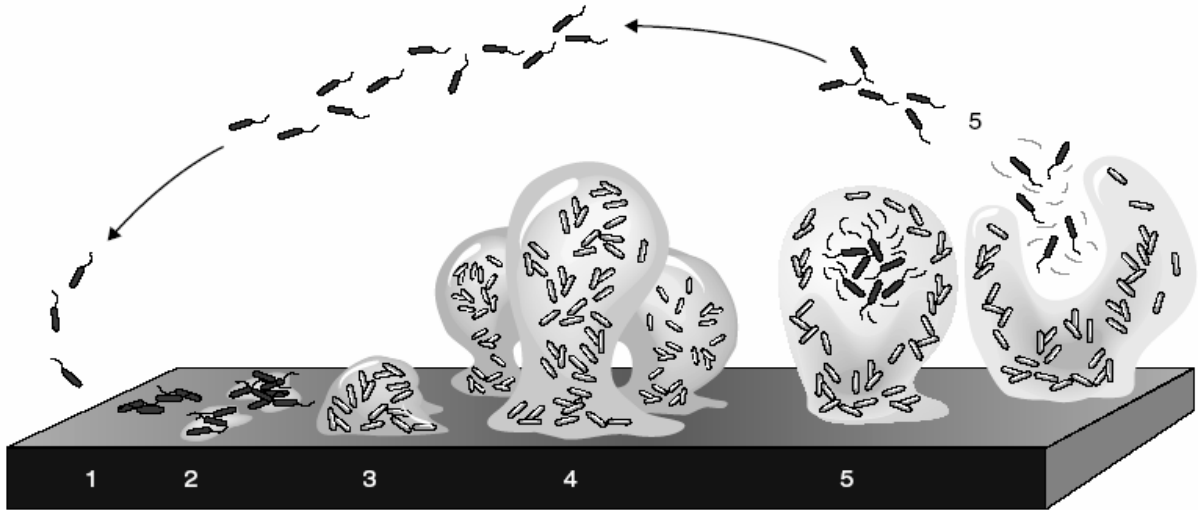
Mikroorganizmaların canlı organizmadaki bir bölgeye adheransı sonucu ökaryot hücrelerle temasa geçmesi ile mikroorganizmanın yaşamı için riskli olabilecek bir seri olay başlamaktadır. Bu yanıtı karşı her şeyden uzak, sakin bir yaşam isteyen mikroorganizma, algıladığı tehditler sonucunda bir seri genin aktivasyonunu sağlayarak biyofilm oluşumunda etkili olurlar. Bu genler hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında sadece biyofilm oluşturmakta değil, adhezyonun indüksiyon / inhibisyon, quorum sensing, hücre duvar yapımı, metabolizma vs de etkili olmaktadır. Bu genler yapısal olarak var olabildiği gibi diğer mikroorganizmalar tarafından da aktarılma özelliğine sahiptirler ve bir kısmı biyofilm oluşumunu arttırırken bir kısmı da azaltırlar.(tablo 1)

**Tablo I:** Biyofilm oluşumunda rol oynayan genler

Gen	Protein fonksiyon	Tür
<b>Metabolizma</b>		
<i>ccpA</i>	Karbon katobolit kontrol proteini	<i>S. mutans</i>
<i>crc</i>	Global karbon metabolizma regülatörü	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Stress cevabı</b>		
<i>dgk</i>	Stress cevap regülatör, antibiotik regülatörü	<i>S. mutans</i>
<i>o''?</i>	Sigma faktör-stress cevabını değiştirmek	<i>S. aureus</i>
		<i>S.epidermidis</i>
<i>purR</i>	Purine sentezi ve metabolizmasının regülasyonu	<i>S.epidermidis</i>
<i>rpoS?</i>	Yavaş büyümenin regülasyonu	<i>E. coli</i>
<i>mutT</i>	DNA'ı yanlış eşlenmesinin onarımı	<i>S. gordonii</i>
<b>Plasmid</b>		
<i>tra</i>	F plazmidin Konjugativ pilusu	<i>E. coli</i>
<i>atlE</i>	Otolizin/adhezin	<i>S.epidermidis</i>
<i>aap</i>	Akümülyasyon ilişkili protein	<i>S.epidermidis</i>
<i>bopABCD</i>	Plastik yüzey operonları üzerindeki biofilm	<i>E. faecalis</i>
<i>esp</i>	Enterokokal yüzey proteini	<i>E. faecalis</i>
<i>agn43</i>	Agregasyonda yer alan antigen proteini	<i>E. Coli</i>
<b>Quorum sensing</b>		
<i>comX</i>	Yeterlilik	<i>S. gordonii</i>
<i>comABCDE</i>	Yeterlilik	<i>S. mutans</i>
<i>luxS?</i>	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>
<i>lasI</i>	3OC12-HSLquorum-sensing sinyalinin sentezlenmesi	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Hücre duvarı</b>		
<i>PBP2B</i>	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
<i>PBP5</i>	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
<i>glmM</i>	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
<i>bacA</i>	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
<i>brpA</i>	Otolizin muhtemel düzenleyicisi	<i>S. mutans</i>

### I- Biyofilm Gelişim Aşamaları:

Biyofilm formasyonunun oluşumu rastgele bir süreç değildir. Bakteri bir yüzey ile karşılaştığında, genetik olarak belirlenmiş bir seri süreç birbirini izler. Bakteri yüzeye çökme, sıvı akışı ya da aktif yüzme ile karşılaştığı zaman, ilk olarak güçsüz ve geçici bir bağlanma oluşur. Daha sonraki faz olan irreversibl bağlanma hem kolonize olunan yüzeyin özelliklerine hem de bakteri hücre yüzeyinin özelliklerine bağlıdır. Fizikokimyasal koşullar (yüzeyin hidrofobisite veya hidrofilitesi ve biriken maddelerin doğası) uygun ise reversibl bağlanmayı irreversibl bağlanma izler. İrreversibl bağlanma sırasında tek tabakalı hücreler yüzeye sertçe bağlanarak şekil alırlar. Bunu mikrokoloni gelişimi izler ve sonunda matür biyofilm oluşur. Koşullar uzun süre uygun gitmezse hücreler biyofilmden ayrılarak planktonik yaşama geri dönebilir.(şekil I) [2].



- 1- Bakterinin yüzeye reversibl adheransı
- 2- Bakteri ekzopolimerik yapılarla yüzeye irreversibl olarak adhere olup motilite için gerekli oluşumları kaybetmesi.
- 3- Biyofilmin ilk oluşma dönemi
- 4- Biyofilmin tamamen olgunlaşarak kompleks yapıyı oluşturduğu dönem
- 5-Oluşan mikrokolonilerden hareketli bakterilerin ortama dağılımı

**Şekil I:** Biyofilm gelişim aşamaları

## A) Yüzeyi Algılama ve İrreversibl Bağlanma:

Hareketli ve hareketsiz bakteriler kolonizasyon için farklı süreçler kullanırlar. Bununla birlikte; flagelle ve fimbria (veya pili) gibi ekler ve aynı şekilde yüzey molekülleri (lipopolisakkarit, lipoproteinler, membran proteinleri, adhezinler vb.) gibi yüzeye ilişki kuran yapılar tüm bakterilerin yüzeye bağlanmasında rol oynarlar[2].

### 1- Hareketli bakteri:

#### a) Flagella:

Çeşitli bakteri türlerinde genetik taramalarda, flagellanın bağlanmayı başlatmada gerekli olduğu ve büyük oranda hızlandırdığı gösterilmiştir. Örneğin; flagellasız ya da flagellası paralize olmuş mutant *Escherichia coli K 12'* nin polivinilklorid (PVC) yüzeye bağlanmada yetersizlik gösterdiği saptanmıştır[45]. Her ne kadar bazı bağlanmalar gerçekleşse de, doğal suşlarda büyük oranda 12 saatin üzerinde gecikme görülür.

Flagellaların yüzeyi tanıma ve bağlanmayı kolaylaştırması ile ilgili hipoteze göre; flagella alt tabaka ile bakteri hücre yüzeyi arasındaki itici elektrostatik güçlerin aşılmasına yardımcı olarak adhezyon için gereken enerjiyi azaltır[45, 46]. *Vibrio cholerae'* nin videomikroskopik incelemesinde bağlanmanın başlangıç aşamasında, bakterinin yüzeye flagellaları ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu etkileşim nazik bir yıkamaya karşı koyacak kadar güçlüdür ve bu bakteri aracılığı ile flagella formunun alt tabakayla güçlü ilişkisi olduğu gösterilmiştir[47].

#### b) Fimbria / Pili :

Bakteriler birbirlerine ve yüzeye yapışmak için çeşitli fimbria ve pilileri kullanırlar. Örneğin; *Vibrio cholerae'* da çeşitli canlı ve cansız yüzeylere bağlanma için “mannoz duyarlı hemaglütinin (MSHA) tip IV pili, *Vibrio cholerae El Tor* için mshA. [48]ve. *Escherichia coli K-12* tip I pili nin [45]bağlanmada önemli pililer oldukları bilinmektedir. Özellikle Gram negatif bakterilerde konjugatif pili sentezi için gerekli genlerin ekspresyonunun direkt olarak biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olmaları, adherans ile başlayan biyofilm oluşumunda bir seri iyi düzenlenmiş genetik aktivasyonun birbirleri ile ne kadar ilişkili olduğunu göstermektedir. [2].

#### c) Eksopolisakkarit:

Eksopolisakkaritler de yüzeye bağlanmayı kolaylaştırırlar. Moorthy ve Watnick (2004), karbon kaynağı olarak aminoasit içeren ortama bağlanmada tamamen eksiklik gösteren bir mshA mutantının, ortama mannoz eklendiği zaman bağlanmaya başladığını göstermişlerdir. Mannoz eksikliğinde eksopolisakkarit (EPS) sentezinden sorumlu gen baskılanmaktadır.

Mannoz eklenmesi ile EPS sentezine yol açan gen ekspresyonunun uyarılması, bağlanma için MSHA' ya olan gereksinimi ortadan kaldırır[49].

**d) Diğer proteinler:**

*Pseudomonas fluorescens* WCS365' de Clp proteaz [22] ve LapA' nın [50], *Pseudomonas aeruginosa*' da sitoplazmik bir protein olan SadB' nin [51] bağlanmada önemli proteinler olduğu gösterilmiştir.

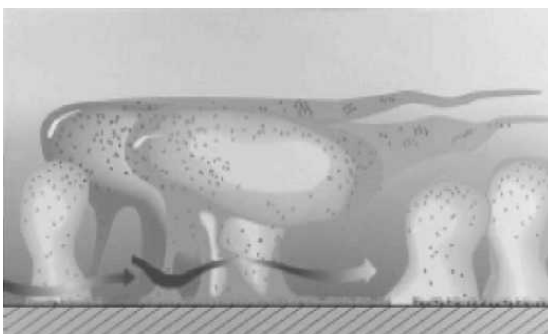
**2- Hareketsiz bakteri:**

Hareketsiz bakterilerde biofilm formasyonu çoğunlukla, implantlarla ilgili birçok enfeksiyondan sorumlu patojenler olan *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*' de incelenmiştir. Hareketsiz bakterilerde biofilm gelişimi, hareketli bakterilerle benzer aşamaları izler. İlk olarak yüzeye kararlı bağlanma gerçekleşir, bunu EPS sentez ve sekresyonu ile matür biofilm oluşumu izler[2].

*Staphylococcus epidermidis*' de hidrofobik yüzeye bağlanmanın, primer olarak majör otolizin olan AtIE aracılığı ile gerçekleştiği düşünülür[52]. AtIE mutantları cam yüzeyde biyofilm oluşturmaya karşılık polistiren yüzeyde oluşturamaz ve doğal suşlara göre daha az hidrofilitiktir. *Staphylococcus aureus* bir AtIE homologuna sahiptir; ancak bakterinin yüzeye bağlanmasında nasıl bir rolü oynadığı bilinmemektedir. *Staphylococcus aureus*' un hücre duvarındaki teikoik asitinde D-alanin eksikliği olan dtIA mutanı, yüzeyin negatif yükünde artışa neden olarak bağlanmada bozukluğa neden olur[53]. Bu mutantlarda, eksprese olan genlerin kodladığı EPS sentezi için gerekli proteinler etkisizdir. Bununla birlikte, dtIA mutantına Mg<sup>++</sup> iyonları eklenmesi ile biofilm oluşturma yeteneğinin tekrar kazanılması, bağlanma bozukluğunun yük dengesizliğinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Yüzeye bağlanmaya aracılık eden diğer proteinler *Staphylococcus epidermidis*' de protein benzeri hücre yüzey antijenleri SSP-1 ve SSP-2 [54] ve *Staphylococcus aureus*' da hücre yüzey proteini Bap' dır[55].

**B) Matür Biyofilm:**

Başlangıçtaki bağlanmadan matür biyofilm oluşumuna geçiş sırasında, bakteri hücresi anlamlı değişiklikler geçirir. Bu biyofilm gelişim aşaması sonucunda sıklıkla, mantar-benzeri yapılar, su kanalları ve porlar içeren, üç-boyutlu kompleks bir mimari oluşur (Şekil II).



**Şekil II:** Biyofilmin üç boyutlu yapısı

## **Biyofilmin Yapısı:**

### **1- Biyofilm Mimarisi ve Yapısı:**

Matür biofilm, çeşitli mikroskopik metodlarla gösterilen kompleks bir mimariye sahiptir. Özellikle “Scanning confocal laser microscopy (SCLM)” noninvaziv, üç boyutlu görüntüleme ve bilgisayara aktarım ile tamamen hidrate matür biyofilmi gösterebilmiştir[2]. Lawrence ve arkadaşları (1991) bu metodu *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Vibrio parahaemolyticus*’ un oluşturduğu biyofilm tabakasında çalışmışlardır. Bu çalışmada her biyofilmin derinlik, yapı ve hücresele-hücresele olmayan materyal oranının farklılık gösterdiğini, buna karşılık tüm biyofilmlerde su kanallarının bulunduğunu saptamışlardır[56].

Biyofilm yapı ve mimarisini,, özellikle çevresel besin varlığı olmak üzere birçok faktör etkiler. *Pseudomonas aeruginosa*’ da biyofilm yapısı “sabit faz transkripsiyon faktörü (RpoS)” nden etkilenir[57, 58]. rpoS mutanı doğal suş ile karşılaştırıldığında daha yapısal ve derinliği artmış bir biyofilm oluşturur. *Pseudomonas aeruginosa*’ da rpoS ekspresyonu, besin noksanlığını da içeren çok sayıda stres faktörü tarafından düzenlenir[59]. Böylece besin noksanlığı altında rpoS ekspresyonu aktive olarak biyofilm yapısının değişimi ile sonuçlanabilir.

*Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*’ de matür biyofilm derinliği yıkım ürünlerinin baskılması ile azaltılır, ki bu da besinden zengin çevrenin bu bakterilerin biyofilm oluşturması açısından avantajlı olmadığını düşündürmektedir[60, 61].

Laminar ve türbülant akım gibi hidrodinamik durumlar biyofilm yapısını etkiler[62]. Laminar ve türbülant akım altında gelişen *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin akım türüne göre oluşturduğu farklılık, hidrodinamik koşulların biyofilmin dansite ve gerilimini etkilediğini göstermektedir[63-65]. İlginçtir ki, büyüme verimi ve dehidrogenaz aktivitesi gibi metabolik yanıtlar gerilim stresi ile yakından ilişkilidir. Gerilim kuvveti arttığı zaman düşük büyüme verimi ve yüksek dehidrogenaz aktivitesi gözlenmiştir[63].

### **2- Ekstrasellüler Matriks:**

Biyofilm hücreleri polisakkaritler, proteinler, DNA ve su karışımından oluşan ekstrasellüler matrikse birlikte tutunurlar[66](81). Su, bakteriyel hücre ya da EPS’ nin kapsülü içinde sınırlandırılabilir. Eksopolisakkaridin içeriği üretildiği bakterinin tipine göre değişiklik gösterir. Örneğin; Gram negatif bakterilerin bazılarında eksopolisakkaritler nötraldir, oysa diğerleri D-glukuronik, D-galaktronik asit gibi üronik asitler ve mannuronik asit veya keton bağlı piruvatlar nedeniyle polianyoniktir; fosfat ya da sülfat rezidüleri polianyonik karakter gösterirler[67]. EPS’ ye polianyonik özellik sağlamak  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  gibi iki değerli katyonlara

bağlanma ile olur ve bu yolla farklı polimer dizinler çapraz bağlanırlar. Gram negatif bakterilerin tam aksine, *Staphylococcus epidermidis* gibi Gram pozitif bakteriler sıklıkla polikasyonik EPS oluştururlar[68, 69]. *Staphylococcus epidermidis*' in matriksi % 80 teikoik asit ve % 20 protein karışımından oluşur[68].

Bazı polisakkaritler hücre yüzeyine hidrofobisite sağlayan ramnoz /O-asetil metili gibi hidrofobik gruplar taşırlar[70]. Demir varlığında EPS viskozite artışı veya jelleşme gösterir[71].

EPS sentezi karbon, nitrogen, potasyum veya fosfat gibi besinlerin varlığına bağlıdır. Karbon fazlalığı ve diğer besinlerdeki sınırlılık EPS sentezini arttırabilir. Ek olarak yavaş bakteriyel büyüme EPS üretimini arttırabilir[67].

### 3- Matür Biyofilm Gelişimi:

Matür biyofilm gelişimi EPS üretimi ile ilişkilidir. algACD geninin kontrolünde sentezlenen alginik asit (alginat), *Pseudomonas aeruginosa*' nın mukoid suşlarında eksopolisakkarit komponenti gibi yer alır. Örneğin; alginat yapımı fazla olan mukoid suşlar, mukoid olmayan suşlara göre daha organize biyofilm oluştururlar. Ancak, mukoid suşlar 8 saatlik inkübasyon sonrası mukoid olmayan suşlarla (PAO1) karşılaştırıldığında bağlanma defektli gibi görünmektedir. Yine de birçok mukoid olmayan *Pseudomonas aeruginosa* suşu organize biyofilm oluşturabilmektedir. Bundan başka, laboratuvar koşullarında alginat EPS' nin önemli bir komponenti olarak bulunmamıştır[72].

Whiteley ve arkadaşlarının (2001) yaptığı *Pseudomonas aeruginosa*' da planktonik hücreler ile matür biyofilm hücrelerinin gen ekspresyonunun karşılaştırıldığı dizi analizinde, sadece az sayıda genin (toplam 73) matür biyofilmde farklı eksprese edildiği saptanmış. Genlerdeki farklılık, bakterilerin farklı besin kaynakları ve gelişme koşulları tarafından düzenlenen birden fazla yol ile biyofilm oluşturduğu yönünde yorumlanmıştır. Whiteley ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan transkriptom analizleri, pili ve flagellaları kodlayan genlerin biyofilm hücrelerinde baskılandığını göstermiştir. Bu durum *Pseudomonas aeruginosa*' da matür biyofilmin devamı için motilite ve bağlanmayı içeren genlerin gerekli olmadığını göstermektedir[58]. Biyofilmi planktonik hücreden ayırt edici diğer genler; bakteriyofaj genleri, metabolizma genleri, membran protein sentez genleri, sekresyon genleri, transkripsiyon düzenleyici genler (rpoS, rpoH) dir[2].

Beloin ve arkadaşları (2004), matür biyofilm ile *Escherichia coli K12* gelişim fazı kültürlerinin, transkripsiyon paterni açısından karşılaştırılması amacıyla DNA dizi analizi yapmışlardır. Planktonik kültürler ile karşılaştırıldığında, biyofilmde yaklaşık 250 uyarıcı ve 188 baskılayıcı gen saptamışlar, uyarıcı genlerin stres yanıtı, transport, enerji ve karbonhidrat



metabolizması ile ilgili, baskılayıcı genlerin ise aminoasit, inorganik iyon transportu ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir. Hücrenin durağan fazı ile matür biyofilm oluşumunu karşılaştırdıklarında, genlerin ancak yarısının biyofilm oluşumunda değiştiği ve matür biyofilm gelişiminde rol oynadığını saptamışlardır[73].

*Escherichia coli*, biyofilm gelişimi için önemli bir EPS olan colanic asit sentezler. Colanic asit üretimi defektli olan bir *Escherichia coli* K-12 suşu, düz ve yoğun biyofilm üretir[74]. *Escherichia coli* K-12' nin fazla curli fimbria üreten suşları colanic asit içeren çok katlı bir biyofilm oluştururlar, ancak colanic asit biyofilm oluşumu için gerekli değildir[75]. Benzer sayıda yapışmış hücre, mukoid ve mukoid olmayan izojenik suşlarda gözlenmiş ve colanic asitin bakteriyel yapışmada rolü olmadığı saptanmıştır. Ancak bununla birlikte suşlar, biyofilm mimarisi ve kalınlığı açısından anlamlı farklar gösterirler. Mukoid suşlarda, biyofilmdeki bakteriyel hücreler yüzeye düzenli dağılmıştır ve intrasellüler alanlar mukusla dolmuştur. Sonuçta bu oluşan biyofilm, mukoid olmayan suşlarda oluşan biyofilme göre daha kalındır. Bu sonuç; colanic asitin biyofilmin üç-boyutlu mimarisini etkileyerek uzaysal düzenlenmesinde rol oynadığını, yapışan hücre sayısını ise etkilemediğini göstermektedir[2]. Prigent-Combaret ve arkadaşları (2000), curli fimbriyanın üç-boyutlu mimariye etkisini inceledikleri çalışmalarında, curli'nin alt tabakaya yapışan hücreleri sabitlediği ve hücreler arası ilişkide aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir[75]. Ayrıca, plazmid-kodlayan faktörlerin biyofilm oluşumunu etkilediği saptanmıştır. Sheikh ve arkadaşları tarafından entero-aggregative *Escherichia coli*' nin biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir[76, 77].

Gram pozitif bakteriler de aynı şekilde yüzeye tutundukları zaman, ekstrasellüler polisakkarit üretirler. Örneğin; *Staphylococcus epidermidis*' in bağlanma aşamasını izleyen ikinci faz bakterilerin toplanmasıdır. Bu faz biyofilm matrisi polisakkaridi PIA (polisakkarid intersellüler adhezin) aracılığı ile olan hücreler arası iletişimi gerektirir[69, 78]. icaADBC (ica: intersellüler adhezyon) operonu tarafından kodlanan proteinler PIA biyosentezinden sorumludur[79]. Demirden sınırlı ortamda ve sabit büyüme koşullarında, PIA üretimi artar[80]. Biyofilm gelişiminin son fazında, *Staphylococcus epidermidis*' in glikokaliks yapısı biyofilme kararlılık sağlar. Bununla birlikte glikokaliks biyofilm gelişimi için esansiyel değildir[81].



**Şekil III:** Biyofilmin farklı ortamlardaki görünümleri

#### 4- Hücreler arası İletişim (Quorum Sensing):

Bakteriler çevrelerine çeşitli yollarla yanıt verirler. Son zamanlarda dikkati çeken bir yol da, büyük miktarda bakterinin lokal birikimi ile tetiklenen davranış değişikliğidir. Bu lokal birikime yanıt olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesi quorum sensing (çoğunluğu algılama) olarak bilinir[82].

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir[7]. Buna dayanarak ortaya çıkan ve “quorum sensing” olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir[8-12]. Taşlar üzerinde oluşmuş suya ait biyofilmlerde yapılan araştırmalarda quorum sensing hormonu açıl-homoserin lakton (AHL) yanıtı *Agrobacterium tumefaciens A136*’ da saptanmıştır ve bu çalışma doğal olarak oluşmuş biyofilmlerde “kendi kendini uyarıcı aktivite”yi kanıtlayan ilk yayındır. Bu çalışmada AHL canlı biyofilm ve biyofilm çıkartılarında saptanmış, biyofilm içermeyen taşlarda bulunmamıştır[25].

Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmid transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik

süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir[13] İlk kez Fuqua ve arkadaşları (1994) tarafından kullanılan bu terim, “autoinducer” veya bazen de “pheromone olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin, eşik konsantrasyonuna ulaşması sonrası, hücre populasyon yoğunluğuna bağımlı olarak gen ekspresyonunun olduğu, bakteriyel hücreler arası iletişimin partiküler bir formu olarak tanımlanmıştır[83] Başka bir tanımla quorum sensing; bakterilerin, salgıladıkları “autoinducer” adı verilen küçük sinyal moleküllerinin konsantrasyonunu ölçerek, hücre populasyon yoğunluğunu ölçmeleridir[84]. Quorum sensing bakteri populasyonunda, hücreler bu “autoinducer” ları oluşturur ve ekstrasellüler ortama salgırlar. Böylece “eksternal autoinducer” konsantrasyonu, hücre populasyon yoğunluğu ile koreledir. Ekstrasellüler “autoinducer” konsantrasyonunu izleme yoluyla, bakteriler diğerlerini sayabilir ve buna göre hedef gen ekspresyonunu değiştirebilirler[85]

Quorum sensing (QS) sistemi iki örnek grupta sınıflandırılabilir [84]):

1. Lux I / Lux R tip QS (Gram negatif bakterilerde)
2. Oligopeptid / iki bileşenli QS (Gram pozitif bakterilerde)

Gram negatif bakterilerde “açıl homoserin laktonlar (AHLs)” quorum sensing’ e etki eden ana moleküldür ve biyofilm mimarisini etkilediği gösterilmiştir[86]AHL ler, Lux I protein ailesi tarafından üretilen küçük moleküller olup, bir lakton halkası ile açıl yan zincirinden oluşurlar[87]Lux I homologları, açıl yan zincirlerinde yapısal çeşitlilikler olan AHL ler üretirler[82]. Her Gram negatif bakteri türü, tek AHL veya -birden fazla Lux I tip proteine sahipse- tek AHL kombinasyonu üretir. Bunun sonucunda da sadece aynı türün üyeleri bunu tanıyarak yanıt verir. Diğer sinyal molekülleri gibi AHL ler de hücrede sabit hızla üretilir ve hücrelerin bulunduğu ortamda birikerek dansiteyi artırır. Eşik konsantrasyonda gen ekspresyonunda değişikliği uyarırlar[88].

AHL ler sitoplazmaya difüze olarak ve her AHL için spesifik homolog Lux R’ ye bağlanarak transkripsiyonu etkilerler. DNA-bağlayan proteinlerin Lux R ailesi, korunmuş bir başlatıcı zincire bağlanır ve transkripsiyonu pozitif ya da negatif yönde etkileyebilir[82]. AHL’ nin saptanması ve bunu izleyen gen ekspresyonu değişiklikleri, aynı cins Lux R proteinleri aracılığı ile olur[89]. Lux I yönetimindeki AHL sentezini izleyerek “autoinducer”, serbestçe hücre içine ve dışına difüze olur[90]. Böylece eksternal AHL konsantrasyonu, sitoplazmik AHL konsantrasyonu ile eşit olur ve artan hücre dansitesi ile orantılı olarak artar. Bir kez eşik AHL konsantrasyonu sağlanınca “autoinducer”, sitoplazmik karşılığı olan Lux R proteinine bağlanır. Aynı tip AHL ile etkileşim üzerine, Lux R tip protein spesifik DNA başlatıcı elemanına bağlanır ve bu yönde hedef gen transkripsiyonunu aktive eder[83].

AHL – Lux R ilişkisi oldukça spesifiktir ve buna bağlı olarak da, AHL – Lux R aracılı hücreler arası iletişimi kullanan mikst bakteri populasyonlarında, ilişkilerin karışması oldukça sınırlı gibi görünmektedir[84]. 70’ den fazla Gram negatif bakteri türü Lux I / Lux R quorum sensing sistemini kullanma açısından idantifiye edilmiştir.

Transkripsiyondaki değişiklikler vasıtasıyla AHL ler, ramnolipid üretimini kontrol eden *rhlAB* dahil birçok operonun kontrolünü etkiler[91]. *rhlAB* mutasyonunun oluşturduğu biyofilm, sap ve başlığı ile mantar benzeri yapı gösteren doğal tip biyofilm ile karşılaştırıldığında, mimari olarak düz ve ayrılaşmamıştır[92]. Son yıllarda Lequette ve Greenberg, ramnolipidlerin önemi üzerine çalışmış ve bunların gövdede ifade edilmesine karşılık, mantar benzeri yapı gösteren biyofilm baş kısmında olmadığını bulmuşlardır. Bu araştırmacıların hipotezlerine göre; AHL quorum sensing özellikle sap kısmında sentezlenen, surfaktan gibi davranıp hücre alt grubunun çekme hareketi ile başlık yapmasını sağlayan, ramnolipid oluşumu ile sonuçlanır[93].

Ortam bileşenleri gibi, çevre koşulları ve durağan sisteme karşı akışkan sistem, *Pseudomonas aeruginosa*’ da quorum sensing düzenlenmesini ve biyofilm gelişimini etkiliyor gibi görünmektedir. De Kievit ve arkadaşları (2001), *Pseudomonas aeruginosa*’ da biyofilm için sık kullanılan iki besiyeri ortamını karşılaştırmışlardır. Glukoz ve karbon içeren M9 ortamında durağan sistemde inkübasyon sonrası, asıl kökenlerin tipik mimarili kalın bir biyofilm tabakası oluşturmasına karşın, lasI ve rhII mutantları sadece birkaç hücre derinlikte mikrokoloniler oluşturmaktadır[94]. Buna karşılık sitrat ve karbon içeren başka bir ortamda, tüm suşlar biyofilm oluşumunda defekt göstermiştir. Her iki ortamdaki biyofilm gelişimi akışkan sistemde karşılaştırıldığında, biyofilmler arasında anlamlı fark gözlenememiştir. Ek olarak, lasI mutant biyofilme sahip bakteriler biyosidlere daha duyarlıdır ve bir deterjan olan sodyum dodesil sülfata maruz kaldıktan sonra yüzeyden ayrılır[8].

Laboratuvarda gelişen biyofilmlerde *Pseudomonas aeruginosa*, normal biyofilm oluşumu için lasR-lasI sistemine gereksinim duyar[8]. lasI gen ürünü, bilinen iki *P. aeruginosa* “autoinducer” ından biri olan N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lacton oluşturur. Her ne kadar lasI mutantı cam yüzeye tutunup çoğalsa da, mutant biyofilm doğal tipe göre daha ince oluşur. Bundan başka, doğal tip biyofilmde, su kanalları ile ayrılmış hücre grupları karakteristik iken, mutant biyofilmde bu tipik mimari eksiktir. Mutant biyofilm içeren ortama N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lacton eklendiği zaman biyofilm daha kalın bir hal alır ve hücre yoğunluğu doğal tip biyofilm ile benzer form kazanır. Bu da N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lacton’ un *Pseudomonas aeruginosa*’ daki matür biyofilm mimarisinden sorumlu olduğunu düşündürür[2].

*Pseudomonas aeruginosa* kistik fibroz hastalarında akciğerlerde sıklıkla *Burkholderia cepacia* ile birlikte mikst biyofilm formunda bulunur. *Burkholderia cepacia* K56-2' nin quorum sensing sistemi; AHL sentaz, N-octanoylhomoserine lacton sentezleyen CepI ve N-octanoylhomoserine lacton' a bağlandıktan sonra farklı genlerin transkripsiyonunu aktive eden ya da baskılayan CepR' yi içerir[95]. “Cep” sistemindeki defektif mutantlar cam yüzeyde doğal suşlarla benzer şekilde mikrokoloniler oluştururlar, ancak bu mikrokoloniler matür biyofilm geliştirmede yetersiz kalırlar[96].

Gram negatif bakterilerin tam tersine, Gram pozitif bakterilerde AHL-aracılı quorum sensing kullanımı gösterilmemiştir[84]. Gram pozitif bakteriler quorum sensing için peptid temelli sinyalleri kullanırlar[82]. Gram pozitif bakteriler, oligopeptid “autoinducer” larını yapar ve çevrelerine taşırlar. Bunlar “oligopeptidler autoinducing peptidler (AIPs)” olarak bilinirler ve tipik olarak 5-17 aminoasitten oluşmakla birlikte, bazen alışılmışın dışında yan zincir modifikasyonları içerirler[97]. Bunun yanısıra, AHL sinyalinden farklı olarak, bakteri hücre membranı AIPs karşı geçirgen değildir. Bu da extrasellüler ortama AIPs salgılanmasını kolaylaştırmak için hücre yüzeyine özgü oligopeptid taşıyıcılarını gerekli kılmıştır. AIPs saptanması, iki komponentli duysal iletim sistemi aracılığı ile olur[84].

Bu iki komponentli sistem, çok çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteride vardır. Bu döngüler, çok çeşitli ekstrasellüler sinyallerin dalgalanmalarını belirlemekten ve bu sensoriyal bilgiyi, değişen çevre şartlarına yanıt olarak, gen ekspresyonunu doğru şekilde ayarlayabilmek için hücre içine taşımaktan sorumludurlar[98]. Tüm bakteriyel iki komponentli sistemler, bir “sensor kinaz” ve yanıt düzenleyici çift içeren kapalı fosforilasyon kaskadları şeklinde fonksiyon görürler. “Sensor kinaz”lar sabit histidin rezidüleri, yanıt düzenleyiciler ise sabit aspartik asit rezidüleri içerirler ve fosforilasyon bu rezidülerde gerçekleşir[99]. İki komponentli döngünün modüler bölge düzenlemesi değişebilir, bu döngüde iki, üç veya dört protein ortaktan oluşabilir. Döngünün son komponenti (yanıt düzenleyicisi), genellikle fosforile olduğunda hedef gen ekspresyonunu değiştiren bir DNA bağlayan proteindir[98]. Mevcut içerikte AIPs, iki komponentli “sensor kinaz”lar için ligandır ve fosforilasyon kaskadı, hücre içinde populasyon yoğunluğu ile ilgili bilgiyi tekrar oluşturur.

Patojen *Staphylococcus aureus*, artan hücre populasyon yoğunluğuna yanıt olarak, virulans faktörü üretimini düzenlemek için, bir tiyolaktan halkası içeren modifiye AIP' yi kullanır[100-102]. Logaritmik çoğalmanın geç döneminde spesifik AIP birikiminin, *S. aureus'* un bağlanmayı kolaylaştıran yüzeye ilişkili faktörlerinin azalmasına ve çeşitli toksinleri içeren proteinlerin salgılanmasının artmasına neden olduğu saptanmıştır[103]. Genlerin karşılıklı kontrolünün, bağlanma ve toksin sekresyonunu belirleyerek, *S. aureus'* un yüzeye kolonize

olmak suretiyle konağa invaze olmasına izin verdiği tahmin edilmektedir[84] .*S. aureus* AIP üretimine göre dört gruba ayrılabilir: AIP-I, AIP-II, AIP-III, AIP-IV.

İnsanlarda çeşitli hastalıklara yol açma özelliğini geliştirmek ve konağın birçok hücrelerini işgal etmek için stafilocoklar, hücreler arası iletişimi sağlayan ve birçok kolonizasyon ve virulans faktörünü düzenleyen quorum sensing sistemini geliştirmişlerdir. *Staphylococcus aureus* quorum sensing sistemi, *agr* (*accessory gene regulator*) bölgesi tarafından kodlanır (*agrBDCA*). Stafilocokal aksesuar gen düzenleyici (*agr*) quorum sensing sistemi, in vitro olarak birçok hücre yüzey proteininin salınımını azaltırken, logaritmik büyüme fazından durağan faza geçişte salgılanan virulans faktörlerinin salınımını artırır[104, 105]. *Agr* sistemi, iki kopyalanmış ünitelerden oluşacak şekilde ayrılmıştır: RNAII ve RNAIII. Kopyalanmaları görece olarak P2 ve P3 uyarıcıları tarafından yürütülür[2]. *Staphylococcus aureus*' un durağan biyofilm sistemindeki *argD* mutanı doğal suşdan daha geniş biyofilm oluşturur[106]. Bu suşlar tarafından akışkan hücrelerde oluşturulan biyofilm, yapı ve kalınlık açısından anlamlı fark göstermez[2].

*Agr* salınımının, birçok enfeksiyon modelinde stafilocokal patogeneze katkıda bulunduğu saptanmıştır. Bunun örnekleri; kobaylarda subkutan abse[107] ve artrit[108] gelişimi, yine tavşanlarda endokardit[109] gelişimidir. Aynı şekilde *agr* salınımı epitelyal hücrelerin invazyon ve apoptozunda rol oynamaktadır[110]. İlginç olarak, salınan sinyallerin üretim ve tanınmasındaki farklılıkla belirlenen farklı *agr* grupları, ağırlıklı olarak belli hastalıklarla ilgilidir[105]. *Agr* grupları ile enfeksiyon tipi arasındaki bu ilişkinin nedeni henüz açıklığa kavuşmamıştır, ancak stafilocokal hastalıkların epidemiyolojisinin anlaşılması bu fenomenin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir[111].

Stafilocokal biyofilm oluşumu, diğer tüm biyofilm oluşumları gibi iki aşamada tanımlanmıştır. İlk aşama adhezyon, ikinci aşama ise matriks gelişimidir. Bu aşama, ekstrasellüler matriksin bileşeni olan polisakkarit intersellüler adhezin (PIA) dahil ekstrasellüler faktörlerin üretimi ile ilgilidir[111].

*Agr* fenotipi ve salınım modeli, yüzeye bağlanma, biyofilm ayrılması gibi biyofilm davranışının birçok yönünü ve biyofilm ile ilgili enfeksiyonların kronik doğasını etkileyebilir. Gerçekte;  $\alpha$ -toksin, yüzey-ilişkili adhezin,  $\delta$ -hemolizin ve otolizin At1E (*S. epidermidis*) gibi biyofilmin gelişimiyle ilişkili birçok ürün, *agr* sistemi tarafından düzenlenir.

İnvaziv tıbbi gereçlere bağlı birçok enfeksiyon *S. epidermidis*' den kaynaklanır ve organizmanın sahip olduğu bazı eksotoksinlerle, biyofilm oluşturma yeteneği, primer virulans faktörleri olarak kabul edilir[112]. Voung ve arkadaşları, *S. epidermidis*' in *agr* bölgesindeki bozulmanın, bakterinin polistirene bağlanmasının artması, biyofilm oluşumunun artması ve

cansız yüzeylere bağlanmayı arttıran At1E'nin daha fazla salgılanması ile sonuçlandığını bulmuşlardır[113].

Bu koşullarda bile *agr*, biyofilm oluşumuna ve gelişmesine katkıda bulunmaz, ancak biyofilm bakterilerinin virulansını etkileyebilir[114]. *Agr* bölgesi tarafından kodlanan ve surfaktan özelliği taşıyan bir molekül olan  $\delta$ -hemolizin' in, hem *S. aureus* hem de *S. epidermidis* biyofilmlerinden hücre ayrılmasına katkıda bulunabilir[113, 115]. Bu durumun önemli klinik uzantıları vardır. *Agr* eksprese eden ve aktif olarak biyofilmden ayrılan hücreler, ek enfeksiyon alanları oluşturabilecekleri gibi, akut stafilokok enfeksiyonları ile ilişkili toksemiye de kolaylaştırabilirler. Bu hücreler, *S. aureus*' un süperantijenik toksini dahil virulans faktörlerini eksprese edebilirler. Diğer yandan, biyofilm içinde kalan ve *agr* eksprese etmeyen hücreler, özellikle *S. epidermidis* olgularında persistansa ve düşük düzey enfeksiyona katkıda bulunabilirler[111].

Tüm bu çalışmalar, salgılanan virulans faktörlerinin enfeksiyonun akut fazında önemli olabileceği, *agr* fonksiyon kaybının stafilokokların konakta uzun süre sağ kalmasını arttıracığı ve bu nedenle de enfeksiyonların persistansına katkıda bulunacağı fikrini oluşturmuştur. *Agr* mutantlarının sağkalımının artması, süperantijenler gibi immunstimulan faktörlerin üretimini azalması ve protein A gibi immun-kaçınma faktörlerinin ekspresyonunun artmasına bağlı olabilir[111].

Bir öneri olarak, farklı *agr* gruplarına ait stafilokoklar tarafından üretilen AIP gibi *agr*-inhibitör maddelerin kullanımı, akut stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde faydalı olabilir[105]. Böyle tedaviler, normal olarak *agr* ekspresyonu tarafından arttırılan virulans faktörlerinin üretimini azaltabilir. Ancak, *agr* aktivitesinin kaybı, akut enfeksiyonun başta biyofilm enfeksiyonları olmak üzere, kronik enfeksiyonlara dönüşümü ile sonuçlanabilir. Gerçekten de, *agr* aktivitesinin inhibisyonu, hem *S. aureus* hem de *S. epidermidis*' in polistirene bağlanmasını ve biyofilm oluşumunu arttırır[113, 115].

### **Konak Savunmasından Korunma Mekanizmaları:**

Biyofilmler doğaları gereği konak savunmasından ve antibiyotiklerden korunurlar. Biyofilm matriksi, biyofilm bakterilerinin konak savunmasından korunmasında anahtar rol oynar[116]. Voung ve arkadaşları, polisakkarit intersellüler adhezini (PIA) yıkıcı mutasyon geçirmiş bakterilerde, polimorfonükleer lökositlerle fagositoz ve öldürmenin arttığını bildirmişlerdir[117]. Shiau ve Wu, *S. epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler slime faktörün, makrofaj fagositik aktivitesine engel olduğunu saptamışlardır[118]. Meluleni ve arkadaşları, kronik kistik fibrozisli hastalara ait opsonik antikorların, biyofilm mikrokolonilerinde gelişen bakteriyel hücrelerin fagositozu ve eliminasyonunda etkisiz

olduğunu göstermişlerdir[119]. Yasuda ve arkadaşları, biyofilm içinde gelişen *E. coli* hücrelerini, fagositoza duyarlı biyofilm dışı bakteriler ile süspanse etmiş ve in vitro olarak insan polimorfonükleer lökositlerinin öldürücü aktivitesine karşı daha az duyarlı olduklarını saptamışlardır. Buna dayanarak fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin polimorfonükleer lökositlerdeki oksijen ile öldürülmeye dirençli türler sonucu ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu sonuca göre; medikal araçlar veya kronik enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan organizmalar immun sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazırdırlar[120].

### **Biyofilm ve Antibiyotik Direnci:**

Doğal ve kazanılmış immun yanıtı sağlam bireylerde bile, biyofilme bağlı enfeksiyonlar nadiren düzelir. Gerçekte, biyofilme bitişik dokular, immun kompleks ve nötrofillerin istilasına bağlı yandaş hasar geçirebilir[121]. İn vitro biyofilm modellerinde çalışılan duyarlılık testlerinde, minimal inhibitör konsantrasyonun yüzlerce hatta bin katı konsantrasyonda antibiyotik tedavisi sonrası bakteriyel biyofilmin sağkalımı gösterilmiştir[122]. İn vivo olarak antibiyotikler, bağlı popülasyondan dökülen serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon semptomlarını baskılayabilirler, ancak halen biyofilme gömülü olan bakteriyel hücreleri eradike etmekte yetersizdirler. Biyofilm, antibiyotik tedavisi sonlandırıldığında enfeksiyonun tekrarı için bir odak oluşturur. Biyofilm enfeksiyonları, kolonize yüzeyin cerrahi olarak çıkarılmasına kadar sıklıkla tekrar eder[4].

Biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere planktonik yandaşlarından yaklaşık 1000 kat daha dirençlidirler[123]. Antibiyotik direncinin effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi bilinen mekanizmaları biyofilmdeki bakterinin korunmasında rol oynamaz. Hatta genetik olarak dirençli olmadığı bilinen bakteriler bile biyofilm formunda bulduklarında azalmış duyarlılık gösterirler. Bakteriler biyofilmden ayrıldıkları zaman sıklıkla antibiyotiklere duyarlı hale gelirler[124, 125], bu da biyofilmdeki bakterilerin mutasyon veya taşınabilir genetik parçalar yoluyla direnç kazanmadığını düşündürür.

Bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik direncinde ilk hipotez, antibiyotiklerin biyofilm içine yavaşlamış ya da yetersiz geçişidir[4]. Biyofilm matriksi antibiyotiklerin biyofilm boyunca difüzyonunu sınırlayan, moleküllerin biyofilmde öldürmek için yetersiz birikimi ile sonuçlanan fiziksel bir bariyer rolü oynayabilir. Ancak antibiyotikler gibi küçük moleküller için, matriks difüzyon sınırlaması göstermez [126] ve gerçekte birçok antibiyotik biyofilm boyunca serbestçe geçebilir[127, 128]. Diğer yandan negatif yüklü olan biyofilm matriksi, pozitif yük taşıyan aminoglikozidler gibi bazı antibiyotiklerin geçişini geciktirir. Örneğin, tobramisin'in *P. aeruginosa* biyofilmi boyunca penetrasyonu 36 saatlik deneyin ilk 12 saati



süresince tamamen gecikmiş, buna karşılık siprofloksasin biyofilm boyunca ilk 12 saatte tam olarak geçmiştir. Yine de 36 saatte tobramisin'in % 40' ının difüze olması, önce matriksin bağlanma kapasitesinin aşıldığı ve serbest difüzyonun bunu izlediğinin göstergesidir[129].  $\beta$ -laktam antibiyotikler,  $\beta$ -laktamaz üreten biyofilm bakterileri tarafından aktif olarak azaltılırlar [127]. Bir çalışmada, ampisilinin,  $\beta$ -laktamaz mutant *K. pneumoniae* tarafından yapılan biyofilmden difüze olurken,  $\beta$ -laktamaz üreten suşlara ait biyofilmden difüze olmamasının, antibiyotiğin enzim ile azaltılmasının biyofilme difüzyonundan daha hızlı olduğunu düşündürmüştür[130]. Biyofilmin fiziksel bariyer oluşturma özelliğinin, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisin'in, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir[131].

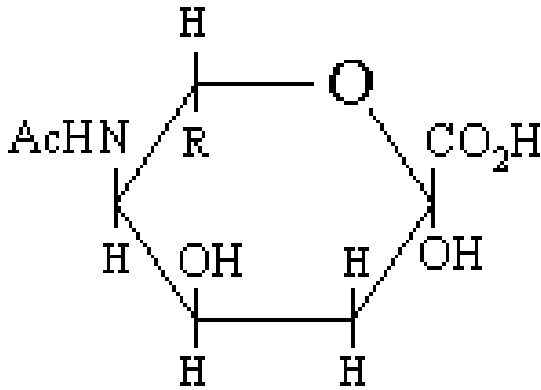
İkinci hipotez biyofilm içindeki değişmiş kimyasal mikroçevreye dayanır. Bu hipotez, besin ve oksijen kısıtlılığı sonucunda biyofilmden yavaş büyüme ve düşük metabolik aktivitenin antibiyotik toleransına yol açtığını öne sürer. Mikroelektrod ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki, oksijen biofilmin yüzey tabakalarında tamamen tüketilir ve bu durum biofilmin derin tabakalarında anaerobik ortam oluşumuna yol açar.. Böylece derin katlardaki biyofilm anaerob bir çevrede yaşar[129, 130]. Anaerob koşullar hem aminoglikozidlerin hem de florokinolonların etkinliğini azaltır[132, 133] ki bu da oksijen kısıtlılığının antibiyotik toleransını kolaylaştırabileceğine işaret eder. Ek olarak, asidik ortam ürünlerin lokal birikimi esas sıvı ile biofilmin içi arasında 1'den fazla pH farklılığına yol açar ve direkt olarak antibiyotik etkisini antagonize eder. Bundan başka, biyofilm içindeki osmotik çevre değiştirilebilir ve böylece osmotik stres yanıtı indüklenir[134]. Böyle bir yanıt porinlerin oranını değiştirip hücre zarfının antibiyotiklere geçirgenliğini azaltarak antibiyotik direncine katkıda bulunabilir[4].

Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direncini açıklayan üçüncü hipotez, biyofilm-ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden anlamlı olarak daha yavaş büyüdüğü ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanı daha yavaş tuttuğu şeklindedir. Bir substratın yokluğu ya da inhibitör bir ortamın birikmesi bazı bakterilerin gelişiminin durmasına ve öldürülmekten korunmasına yol açar. Örnek olarak; hücre duvarı sentezini hedefleyen penisilin antibiyotikler yalnızca büyümekte olan bakterileri öldürebilirler[4]. DuGuid ve arkadaşları *S. epidermidis* biyofilm büyüme hızlarının antibiyotik duyarlılığını kuvvetle etkilediğini; hücre büyüme hızı ne kadar yüksekse, siprofloksasinle inaktivasyon hızının o kadar yüksek olduğunu göstermişlerdir[135].

### Biyofilm Yapısında Siyalik Asitin Rolü:

Biyofilmin yapısı ve fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarına bakıldığında, halen tam tanımlanamamış olan karbonhidrattan zengin yapısının bu fonksiyonlarda en muhtemel anahtar yapı olduğu düşünülmektedir. Karbonhidratların bilinen işlevleri göz önünde bulundurulduğunda, siyalik asidin en fonksiyonel molekül olabileceği düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili henüz çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur[136].

Siyalik asit; organizmalarda, vertebralılarda ve tüm memelilerin dokularında bulunan bir aminoşekerdir. Bu aminoşeker grubu hücrede glukokonjugatlar olarak bulunur. Memeli hücrelerinde en sık bulunan siyalik asitler; N-asetil nöraminik asit ve N-glikolilnöraminik asit iken, sadece N-asetil nöraminik asit insan hücrelerinde bulunur[137]. Bu hücrelerde siyalik asitler, genellikle hücre yüzeylerindeki oligosakkaridlerin terminal şeker kalıntıları şeklinde bulunurlar. Serumda ise, glikoprotein ve glikolipidlere bağlı karbonhidrat zincirinin azot (N) ve oksijen (O) bağlarının indirgenmemiş ucunda, terminal pozisyonda bulunurlar[138] (Şekil IV). İnsan plazma glikoprotein ve glikolipidleri üzerinde en sık bulunan siyalik asit, 5-N asetil nöraminik asittir ve çoğunlukla galaktoz  $\alpha$ -2,3 bağı ile bağlantılıdır. Plazmadaki siyalik asidin büyük kısmı protein ve lipide bağlı olarak,  $\alpha$ -1 antitripsin, haptoglobülin, seruloplazmin, komplement proteinleri, fibrinojen ve transferin gibi çeşitli akut faz reaktanlarının yapısında bulunurken, serbest kısım çok düşük miktarda bulunur[139] [140]



Şekil IV: Siyalik asitin yapısı

Siyalik asit kompleksindeki siyalik asit kalıntılarının, asialoglikoproteinlere transferinden sorumlu enzimler sialitransferazlardır. Bu enzimlerin, alıcı glikokonjugatların özelliğine göre,  $\alpha$ -glikozidik bağlanmadaki farklılık gösteren değişik tipleri vardır. Siyalik asit

konakta serbest olarak bulunmaz ve genellikle  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow6)$  ve  $\alpha(2\rightarrow8)$  tipinde glikozid bağları ile diğer şekerlere bağlanır[141].

Yapılan çalışmalarda siyalik asitin öne sürülen fonksiyon ve görevleri arasında; glikoproteinlerin ve hücre membranlarının uyumunu stabilize ederek, hücrelerin birbirini tanımaya ve hücreler arası ilişkiye yardım etme, doku ve vücut sıvılarında kimyasal haberci olarak görev alma, transmembran taşıma mekanizmasında etki gösterme, antikolar, enzimler ve mikroorganizmalar için membran reseptör moleküllerinin fonksiyonlarını etkileme, kan dolaşımındaki glikoproteinlerin yaşam süresini, fonksiyonlarını ve stabilizasyonlarını etkileme ve glomerül bazal mambran geçirgenliğinin kontrolü sayılmaktadır[139].

Özetle; siyalik asitin vücuttaki en önemli rolü, hücre yüzeyindeki negatif yükü oluşturmak ve hücreler ile hücreler arası matriks arasındaki ilişkileri sağlamaktır[14]. Siyalik asit negatif yüklü olup, memeli hücrelerinin hücre membranının dış yüzeyinde, glikoprotein ve gangliozidazların regülatörü olarak bulunur ve çeşitli biyolojik fonksiyonlara katılır. Hücre yüzeyinin negatif yükünden büyük oranda siyalik asit ve daha az oranda da glutamat ve aspartat gibi negatif yüklü aminoasitler sorumludur[142]. Siyalik asitlerin çift yönlü fonksiyonu vardır. Bunlar, ya tanınma bölgelerini maskelerler ya da bir regülatör protein, lektin aracılığı ile tanınmayı sağlayacak şekilde ligand veya reseptörlerle eşleşerek biyolojik hedef oluştururlar[143]. En önemli özellikleri olan negatif yükleri nedeniyle siyalik asitler; farmosötikleri de içeren pozitif yüklü moleküllerin bağlanma ve transportunda, bunun yanında hücre ve moleküllerin çekilmesi ve itilmesinde görev almaktadırlar. Özellikle kültür ortamında, siyalik asitin elektrostatik itme gücünden dolayı trombositler, eritrositler ve kanser hücrelerinde hücre agregasyonunu önlediği gözlenmiştir. Bu yolla, glikoproteinlerin bileşeni olarak siyalik asitler, epiteli koruyan ve kaplayan müsinlerin viskositesine katkıda bulunmaktadırlar. Siyalik asitlerin bu fizyolojik özellikleri, bileşenlerin O-asetil veya O-metil grupları gibi hidrofobik gruplara dönüşmesi ile ya da N-asetil gruplarının hidrosilasyonu ile yönlendirilir. Bu şekerlerin negatif yükü ayrıca, glikoproteinlerdeki antiproteolitik etkiye katkıda bulunurken, bunun yanında bazı endoglikozidazların etkisini inhibe eder. Siyalik asitlerin tanınmayı engelleyici etkileri, hidrofilik gruplar ile kombinasyonda negatif yükleri nedeniyle açıklanır. Desiyalizasyon ilk olarak galaktoz spesifik lektinler tarafından tanınmayı, ikinci olarak da makromoleküller ve hücrelerin kompleman veya immun sistem tarafından tanınmasını sağlayabilir. Bu etkinin amacı; moleküllerin ve hücrelerin belirli bölgelere hedeflenmesi ve fizyolojik veya patolojik önemi olan degradasyonun pekiştirilmesidir[143]. Çeşitli biyolojik fonksiyonlara katılan siyalik asitlerin, bulunduğu en önemli yapılardan biri de glikanlardır ve buna önemli bir örnek, selektinler için major bir bağlantı oluşturan siyali-Lewis

yapısıdır. Selektinler, endotelyuma gelen kan akımından lökositlerin yakalanması ve taşınması için özelleşmiş üç hücre adhezyon molekülü (L,E ve P-selektinleri) ailesinden oluşur. Bu, lökosit ekstravazasyonuna neden olan moleküller arası etkileşimde ilk basamaktır. Granülositler ya da lenfositler gibi immun sistem hücrelerinde, siyalik asitin N-açıl yan zincirlerinin temel rolü gösterilmiştir[144]. Karbonhidrat rezidülerinin, kapiller damarları sınırlayan hücrelerin lenfositleri tanınmasında ve bunun lenfositlerin kandan lenfoid dokuya geçişlerini kontrol etmesinde rol oynadığı düşünülmektedir[143]. L,E ve P-selektin olarak isimlendirilen tüm hücre adhezyon molekülleri, immun sistem hücreleri ve endotel hücreleri arasında ilk teması sağlar. Bunlar, hücrelerin yuvarlanma hareketine ve kan damar duvarına hücrelerin yapışmasına katkıda bulunarak sonuçta hücrelerin aktivasyonunu sağlarlar. Endotel hücrelerine güçlü yapışmayı sağlayan bu aktivasyonu, inflamasyon dokusu içerisine ICAMs ve integrin olarak isimlendirilen diğer hücre adhezyon molekülleri aracılığı ile, lökositlerin seferberliği ve transmigrasyonu izler[144].

Siyalik asit üzerine yapılan pek çok çalışma; hücre koruması, fertilizasyon, hücre farklılaşması, hücre adhezyonu, immünoloji, inflamasyon ve tümörler üzerine odaklanmıştır. Siyalik asitin, fizyolojik durumlarda toksik hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) tükettiği gösterilmiştir. Hücre kültürlerinde siyalik asit ile  $H_2O_2$ ' nin detoksifikasyonu,  $H_2O_2$ ' nin oluşturduğu hücre ölümünün, siyalik asit yoluyla doza bağımlı bir şekilde baskılandığını göstermiştir. Bu sonuçlar, reaktif oksijen kurtarıcı olarak siyalik asitin rolünü açıklar[145].

Ökaryotik hücrelerde, siyalik asitin hücre-hücre ilişkilerinde belirleyici bir rolü vardır. Biyolojik sistemlerdeki görevi regülasyondur. Glikolizasyon düzeyi ligandın hücresel reseptör ile ilişkisini etkilemektedir. Bu tip modülasyonlar, hormonlar [human chorionic gonadotropin (HCG) ve eritroprotein gibi], sitokinler, immüno globulinler, adhezin molekülleri ve toksinler için tariflenmiştir[146]. Hücreler arası kontakt inhibisyon, malign hücrelerin metastatik potansiyeli ve immun sistem hücrelerinin aktivasyonu gibi hücre davranışlarının regülasyonunda da siyalik asit görev alır. Siyalik asit, sirkülasyonda dolaşan hücreleri bağışıklık sisteminin etkilerinden bir biyolojik maske gibi korur. T-lenfositler üzerindeki protein ve lipidler, siyalik asitin bağlanması, hücre-hücre ilişkisi ve hücre aktivasyonu esnasında önemli bir rol oynamaktadır[147]. Sellüler aktivasyonun yokluğunda, mononükleer hücrelerin desiyalizasyonunun, HIV-1' in yayılmasını provoke ettiği de gösterilmiştir[148]. Ayrıca, germinal hücre diferansiyasyonunda rol oynayan moleküllerin yüksek miktarda karbonhidrat içeriği ve myeloid hücrelerde izlendiği gibi, bu hücrelerin olgunlaştıkça siyalik asitlerini kaybettiği de tespit edilmiştir[149]. Bundan başka, tümör hücre yüzeylerindeki artmış

siyalik asit miktarının, tümör hücrelerinin invazif ve metastatik karakteri ile de doğru orantılı olduğu gösterilmiştir[150].

Özetle, siyalik asidin hücre yüzeyindeki miktarı; hücrenin deformabilite, motilite ve adhezivliği gibi özelliklerinde, hücrenin kontakt inhibisyonu ve malign hücre metastatik potansiyeli gibi hücre davranışında, dolaşan hücrelerin immun sistem tarafından tanınması ve kompleman tarafından yok edilmesi gibi immünolojik olaylarda maske görevi oluşturmada ve T ile B hücreleri arasındaki ilişki, antijen sunan hücre ve hücre ilişkisinin düzenlenmesi gibi immun sistem hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir belirleyicidir. Bunun yanında; reseptör-hormon (HCG, eritroprotein), reseptör-sitokin (MIF), reseptör-Ig, reseptör-adhesin (*H. pylori*, *H. influenza*) ve toksin-hedef hücre (*V. cholera*) arasındaki ilişkide, ligandların siyalasyonu ve desiyalasyonu önemli rol oynamaktadır.

Tüm bunlar, reseptör-ligand ve hücre-hücre ilişkisinde yüzey siyalik asit miktarının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Her canlı hücre yüzeyinde yoğun olarak bulunan siyalik asidin, şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucu büyük bir biyolojik öneminin olduğu gösterilmesine karşın, daha birçok fonksiyonlarının gösterilmesi için yoğun çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak, siyalik asidin bakteri adheransında önemli bir hedef molekül olduğu ve bu konuda yapılacak çalışmalar sonucu birçok ciddi enfeksiyonun oluşumunun engellenmesi ve tedavisinde hedef molekül olabileceği düşünülmektedir.

Siyalik asidin hücre yüzeyindeki durumu, nöraminidaz (memelilerde siyalidaz olarak adlandırılır) ve siyalotranferaz tarafından kontrol edilir. Nöraminidaz, siyalik asiti hücre yüzeyinden uzaklaştırırken; siyalotranferazlar ise siyalik asitin hücre yüzeyindeki glukokonjugatlara tekrar yerleştirilmesini sağlar[141]. Siyalotranferazlar, diğer glikosyltransferazlar gibi tip II glikoproteinler olup, ekspresyonları hücre diferansiyasyonu ve embriyonik gelişim esnasında regüle edilmekte ve yüksek derecede doku spesifitesi göstermektedirler[151].

Siyalidaz enzimi ise; siyalokonjugatların  $\alpha$ -bağlı siyalik asid rezidülerini ayıran bir ekzoglukozidazdır. Siyalillenmiş glikokonjugatlardaki 2-3 bağlarını hızlı, 2-6 bağlarını ise yavaş hidrolize etme özelliğine sahiptir. Siyalik asid kalıntılarının uzaklaştırılmasından sorumlu siyalidaz enzimi, bu özelliği ile siyalillenmiş glikokonjugatların yaşam süreleri, antijenik özellikleri ve reseptör tarafından tanınma ya da tanınmama gibi fonksiyonları üzerine biyolojik etki gösterir. Siyalidaz, büyüme ve farklılaşma, yaşlanma ve neoplastik değişim gelişimini içeren hücresel kanıtlara katkıda bulunur. Siyalidazların yerleşme yeri özelliklerine göre başlıca dört tipi tanımlanmış olup bunlar; intralizozomal, sitozolik ve membrana bağlı

siyalidaz tip I ve tip II dir.  $\beta$ -adrenerjik stimölasyon siyalidaz aktivitesini arttırarak, hücre membranlarında siyalik asit bileşenlerinin yıkımını arttırır.

### **Biyofilmler İle İlgili Enfeksiyonlar:**

Biyofilmler ile ilişkili enfeksiyonlar için doğru bir prevalans ve insidans modeli belirlemek güçtür. Ancak biyofilmlerin, dental plak, üst solunum yolu enfeksiyonları, peritonit, ürogenital enfeksiyonlar ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi birçok durum ile ilgili oldukları söylenebilir [18, 152-159].

Yabancı cisim ve diğer kronik enfeksiyonlarla, antibiyotiklere ve konak savunmasına karşı kazanılmış direnç paternleri ile ilgili çalışmalara dayanarak “Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)”, tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonların oranının %65 olarak açıklamıştır[160].

Tablo II’ de insanlarda biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların listesi görölmektedir.

**Tablo II:** İnsanlarda biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar

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

Biyofilmlerin karakteristik özellikleri, doğal kapak endokarditi gibi kronik bakteriyel enfeksiyonlarda görüldüğü gibi, sapın gerilim kuvvetleri aşıldığı zaman, tek başına mikrokolonilerin parçalanması ve/veya kopmasıdır. Antibiyotik dirençli fenotiplere sahip, şekillenmemiş bu mikrokolonilerin ayrılması, ilk kapiller yatakta karşılaşılan infektif emboliler için çok ciddi risk içerir. Şekillenmemiş biyofilmlerden kalp kapaklarına mikrokolonilerin bu dökülmesi, inme ya da ağır pulmoner sekellere yol açabilir[39].

### **Doğal Kapak Endokarditi:**

Doğal kapak endokarditi (NVE), genellikle mitral, aort, triküspit ve pulmoner kalp kapaklarının vasküler endoteli ile kan dolaşımındaki bakteri ya da funguslar arası ilişki sonucu meydana gelen bir durumdur[161]. NVE' ye neden olan mikroorganizmalar oldukça çeşitlidir. Tunkel ve Mandell, 2345 infektif endokardit nedeni belirtmiştir, bunun %56' sını streptokoklar (viridans streptokoklar, enterokoklar, pnömokoklar ve *Streptococcus bovis*), %25' ini stafilokoklar (%19 koagülaz pozitif ve % 6 koagülaz negatif) ve bunu dengeleyen Gram negatif bakteri ve funguslar (*Candida* ve *Aspergillus* spp.).oluşturur[162].

Normal olarak mikroorganizmalar sağlam endotele zayıf olarak adhere olurlar. Bununla birlikte endotel hasarlandığı zaman, platelet, fibrin ve bazen kırmızı kan hücrelerinin birikimi sonucu oluşan trombüs, hasar noktasında nonbakteriyel trombotik endokardit (NBTE) oluşturur. Vasküler hasara yanıt olarak fibroblastlardan, plateletlerden ve endotel hücrelerinden salgılanan fibronektin, kalp kapaklarındaki trombotik lezyonlardan idantifiye edilmiştir[39].

*Staphylococcus aureus* ve streptokokların birçok türü de dahil olmak üzere, birçok bakteri fibronektin reseptörleri içerir[161]. Streptokokların çoğu aynı zamanda, NBTE' de trombüsün yüzeyine adheransı arttıran yüksek moleküler ağırlıklı dekstranları yapar[163]. Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakteriler kadar iyi adhere olamazlar[164].

Her ne kadar bakterilerin çoğu NBTE kenarındaki lökositler tarafından sindirirse de, bir kısım bakteri sindirilmeyerek vejetasyon kenarına adhere olur. Bu bakteriler saatler içinde çoğalır ve bakteri mikrokolonileri platelet-fibrin kapsül geliştirir. Bakteri kolonileri fibrin kapsül geliştirmeleri sonucu lökositlerden korunurlar. Durack ve Beeson, yüzeydeki biyofilm bakterilerinin metabolik aktivitesini incelemiş, trombüsün derinlerindeki kolonilerin inaktif olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda, vejetasyondaki bakterilerin çoğunluğunun enfeksiyonun ikinci gününde istirahat durumuna girdiklerini gözlemlemişlerdir[165].

Doğal kapaklardaki biyofilmler kapak dokusunda hasara ve emboli oluşumuna neden olurlar. Serbest hücreler ya da hücre kümeleri ile NBTE komponentleri doğal kapak endokarditi biyofilmlerinin sonucu olarak kan dolaşımında bulunabilir Bu emboliler tüm

vücutta ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Mantarlar daha büyük ve gevşek vejetasyonlar yaptıkları için daha sık emboli oluşumuna neden olurlar[39].

Birçok hekim dental ya da diğer invaziv girişimler öncesi endokardit için yüksek risk altında olan hastalara profilaktik antibiyotik tedavisi önerirler. Bu tedavinin dolaşımdaki planktonik organizmaları bağlanmadan önce öldürmesi beklenir. Biyofilm bir kez kalp kapağında oluşursa, tedavi, vejetasyona geçişin sınırlılığı ve biyofilm organizmalarının doğal direnci nedeniyle az etkili olur[39].

### **Otitis Media:**

Otitis media, orta kulağın mukoperiosteal sınırının inflamasyon ile karakterize hastalığıdır. Çocukluk çağında oldukça sıktır. Akut ya da kronik olabilir. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, grup A beta-hemolitik streptokoklar, enterik bakteriler, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer birçok organizma etken olabilir[166]. Birçok kronik otitis media vakasında, orta kulakta yüksek viskoziteli sıvı bulunur (effüzyonlu otitis media) [167]. Bu durumda timpanostomi tüpünün implante edilmesi basınç artışını ve işitme kaybını yatıştırır.

Timpanostomi tüpleri kontaminasyon objesidir ve biyofilmler bunların iç yüzeyinde gelişirler. Biedlingmaier ve arkadaşları, triptik soya besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* kolonizasyonunu Armstrong silikonlu, floroplastik, iyonize modifiye silikon ve gümüş oksid kaplı Armstrong silikonlu tüplerde araştırmıştır. Araştırmacılar her üç organizmanın da Armstrong silikon ve gümüş oksid kaplı Armstrong silikon tüplerinde, *Pseudomonas aeruginosa*'nın ayrıca floroplastik tüpte biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Sadece iyonize silikon tüpte kontaminasyon ve biyofilm gelişmemiştir[168].

Gerçekte biyofilm içindeki organizmalar antibiyotiklere anlamlı ölçüde dirençlidirler. Buna ek olarak biyofilm tabakasının bulunduğu otitis media vakalarında antibiyotikler orta kulak sıvısına çok düşük düzeylerde penetre olur[39].

Krause ve arkadaşları, seröz otitis mediası olan çocuklarda orta kulak sıvısı ve serumda amoksisilin, sefaklor, eritromisin-sülfisoksazol ve trimetoprim-sülfametaksazol konsantrasyonlarını karşılaştırmışlardır. Tek oral dozun verilmesinden 15-240 dakika sonra örnekler toplanmış ve orta kulak sıvısındaki antibiyotik düzeyleri, serumdakinden anlamlı oranda düşük saptanmıştır[169].

Bir istisna olarak Hayes ve arkadaşları tarafından yayınlanan tek bir raporda otitis mediada orta kulaktaki mukozal yüzeyde biyofilm gelişimine ait çok küçük bir kanıt



bildirilmiştir. Bu çalışmada kültürden organizma injekte edilen kobayların orta kulak mukozal yüzeylerinde scanning elektron mikroskobu ile *H. influenzae* biyofilminin kanıtları saptanmıştır[170].

### **Kronik Bakteriyel Prostatit:**

Prostat bezi üretradan asendan olarak veya infekte idrarın prostat kanalına reflüsü ile infekte olabilir[171]. Bakteriler prostat kanallarına ve asinüslara girince hızla çoğalmaya ve konak yanıtı oluşturmaya başlarlar. Enfeksiyonun erken akut döneminde bakteriler antibiyotik tedavisi ile kolayca eradike edilebilirler[172]. Bakteriler kalıcı olduğunda, kanal sisteminin epitelyal hücrelerine adhere olarak sporadik mikrokoloniler ve biyofilm oluştururlar. Kronik bakteriyel prostatitten izole edilen mikroorganizmalar *E. coli* (en sık izole edilen), *Klebsiella*, enterobacteriaceae, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, koagülaz negatif stafilokoklar, coryneformlar ve *Enterococcus faecalis* tir[171].

Nickel ve Costerton, kronik bakteriyel prostatit öyküsü olan 20 erkeği, değerlendirmiş ve infekte prostat dokusundan biyopsi örnekleri toplayarak besiyerine ekmişlerdir. Histolojik örnekler scanning elektron mikroskobu ve transmission elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Sonuçta duktus duvarına bakteriyel bağlanma, özellikle de *P. aeruginosa* için gösterilmiştir[173]. Nickel ve Costerton ayrıca, biyopsi örneklerini kullanarak intraduktal alanda sporadik koagülaz negatif stafilokok kolonileri göstermişlerdir. Mikrokoloniler dehidrate slime matriksi ile kaplanmıştır[174].

Nickel ve Costerton, semptomları uzun süreli antibiyotik tedavisi ile gerilemeyen kronik bakteriyel prostatitli 20 erkekte çalışmışlardır. Araştırmacılar, doku biyopsi örneklerinde bakteri üremesinin sistitli hastaların bakteri kültürlerine oranla anlamlı ölçüde uzun süre (96 saat) devam ettiğini saptamışlardır. Bu çalışma, biyofilmlerin metabolizmayı değiştirerek organizmaların dokuda ürediği sonucuna işaret etmektedir[173].

### **Kistik Fibroz:**

Kistik fibroz sıklıkla kalıtsal olan, alt solunum sisteminin kronik bir hastalığıdır. Normal mukosilyer temizleme sisteminde, inhale edilen partiküller alttaki sulu sistemle serbestçe hareket eden silialarla mukus tabakası ile direkt olarak yukarı itilir ve bronkopulmoner epitel temizlenir. Kistik fibrozda sudaki defisit nedeniyle mukus tabakasının yukarı doğru hareketi bozulmuştur. Sekresyonun azalması ve elektrolit absorpsiyonunun artması dehidratasyona yol açar ve respiratuvar epiteli kaplayan sekresyonlar koyulaşır[175].

Bu hastalarda *S. aureus* sıklıkla ilk saptanan pulmoner izolattır[176]. Normal olarak antibiyotiklerle kontrol edilen *S. aureus* ve *H. influenzae* enfeksiyonları, kistik fibrozdan etkilenen akciğerde *P. aeruginosa* kolonizasyonuna neden olur. *Burkholderia cepacia* aynı

şekilde kistik fibrozlu akciğerde öldürücü sonuçlara yol açan enfeksiyon etkenlerindedir, ancak *P. aeruginosa*'nın %80 olan kolonizasyon oranına ulaşamaz[177].

Kistik fibrozda *P. aeruginosa* kolonizasyonunun tam mekanizması bilinmemektedir. Respiratuvar epitelde artmış pseudomonal reseptörlere ait kanıtlar, bozulmuş mukosilyer temizleme olası nedenlerdendir[177]. Başlangıçtaki kolonizasyon sırasında organizmalar mukoid değildir. Hastalarda organizmanın akciğerde sebat etmesi sonucunda mukoid fenotip gelişir[175]. *P. aeruginosa*'nın başlangıç kolonizasyonu ile mukoid forma değişimi arasındaki süre net değildir, aylar hatta yıllar alabilir.

Mukoid fenotip ilk olarak Lam ve arkadaşları tarafından, infekte akciğer dokusuna ait postmortem örneklerde ve infekte hastalara ait bronkoskopi materyallerinde gösterilmiştir[178]. Mukoid materyalin polisakkarit materyal olduğu gösterilmiş ve alginat olarak tanımlanmıştır. Mukoid fenotipe dönüşümü tetikleyen koşullar araştırılmıştır. May ve arkadaşları, besin kısıtlılığı, surfaktan eklenmesi ve suboptimal antibiyotik düzeyleri gibi birçok durumun in vitro mukoiditeye katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Mukoiditenin ortama etanol eklenmesiyle oluşturulabilmesi, bu fenotipin dehidratasyona yanıt olabileceğini düşündürmektedir[176].

Kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinden alınan balgam çoğunlukla yüksek sayıda polimorfonüveli lökosit (PMN) doludur ve bu hastalardaki mukoid *P. aeruginosa*'ya karşı inflamatuvar savunma mekanizmasını baskın olarak PMN ve antikorlar oluşturur[179]. *P. aeruginosa*'dan farklı olarak *B. cepacia* genellikle alginat benzeri madde üretmez, ancak bazı araştırmacılar diğer eksopolisakkaritlerin üretimini bildirmişlerdir. *B. cepacia*'da mukoid koloni morfolojisi hem çevresel hem de klinik suşlarda nadirdir. *Burkholderia* biyofilm ya da mikrokolonilerinin varlığı yalnızca bu organizma ile kolonize olmuş hastalarda bildirilmemiştir[177].

Mukoid *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının immun sistem tarafından temizlenmeye karşı niçin bu kadar dirençli olduğu sorusu pek çok çalışmacının dikkatini çekmiştir. Koch ve Hoiby, biyofilm formunda gelişmenin organizmayı antimikrobiyal ajanlardan ve konak savunmasından koruduğunu bildirmişlerdir[175]. Mukoid suşlardaki alginat tabakası antikor kaplanmasını engeller ve opsonik fagositoz için gereken immunolojik bileşenleri engeller gibi görünmektedir[180] [176] [119]. Alginatın, mukoid suşların solunum yolundaki epitelyal hücrelere yapışmasını sağladığı ve böylece temizlenmesini engellediği kanıtlanmıştır[176].

### **Periodontit:**

Periodontal hastalıklar dişin destekleyici dokularını içeren enfeksiyonlardır, dişetlerinin (gingiva) hafif ve geri dönüşümlü inflamasyonundan periodontal dokuların (gingiva, periodontal ligaman, alveolar kemik) kronik hasarlanmasına uzanan geniş bir yelpaze gösterir. Diş kökü ve gingiva arasındaki subgingival yarık olarak adlandırılan kanal, periodontal enfeksiyonların birincil yeridir ve hastalığın ilerlemesi ile periodontal cep içine derinleşir. Moore ve arkadaşları, periodontit hastalarından izole edilen organizmaları *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Pseudomonas anaerobius*, *Eubacterium sp.* D8 suşu, *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium sp.*, *Selenomonas sputigena*, *Eubacterium sp.* D6 suşu, *Bacteroides pneumosintes*, ve *Haemophilus aphrophilus* olarak bildirmişlerdir[181]. Periodontit hastasının subgingival bölgelerinde bulunan baskın organizmalar sağlıklı kişilerde bulunmaz.

Dişlerin temizlenmesinden hemen sonra oral kavite içindeki diş yüzeyinde kazanılmış zar adı verilen protein içeren bir film tabakası oluşur. Bu zar albümin, lizozim, glikoproteinler, fosfoproteinler, lipidler ve gingival yarık sıvısı içerir. Zar oluşuktan sonraki birkaç saat içinde normal ağız florası mensubu Gram pozitif kok ve basiller bu yüzeylere kolonize olurlar. Baskın olarak streptokoklar, *Actinomyces spp.* ve daha az sayıda *Haemophilus* bulunur[182]. Birkaç gün içinde *Actinomyces spp.* baskın hale gelir ve biyofilmin karakteristik polisakkarit matriksi oluşmaya başlar. Bu erken biyofilmdeki organizmalar koagregasyon süreci başlatırlar. Bu süreç biyofilm içindeki organizmaların genetik olarak farklı bakterileri tanıdığı ve adhezin yardımı ile yapıştığı bir hücrelerarası tanıma sürecidir[183]. 2-3 hafta içinde biyofilm topluluğu plak adı verilen 50-100 µm kalınlığındaki en büyük biyofilmi oluşturur[184]. Kalsiyum ve fosfat iyonları ile mineralize olan plak, tartar olarak adlandırılır[185]. Diş yüzeylerinin yanı sıra plak, dişlerin arasında ve gingival yarıқта da oluşur. Bu korunaklı bölgelerdeki plak yükünün artışı, tükürüğün yararlı tampon ve antimikrobiyal özelliklerinin diş enameline ulaşmasını engelleyerek diş çürüğü ve periodontal hastalıkların oluşmasına yol açar.

### **Biyofilmler ve Yabancı Cisim Enfeksiyonları:**

Mikrobiyal biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeye irreversibl olarak adhere olması ve yapısal matriks sağlayan ve adhezyonu kolaylaştıran ekstrasellüler polimerlerin üretilmesi ile gelişirler. Bu yüzey hareketsiz, cansız bir materyal ya da canlı doku olabilir[1].

Yabancı cisimlerdeki biyofilmler, Gram pozitif veya Gram negatif bakterilerden ya da mayalardan oluşabilir. İzole edilen bakteriler Gram pozitiflerden *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus viridans*; Gram

negatiflerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*' yı içerir. Biyofilmler kullanılan araca ve hastada kalma süresine bağlı olarak tek tür ya da çok türden oluşabilir[1]. Biyofilmlerin ayırt edici özellikleri, hücreleri çevreleyen ya da tamamen örten, esas olarak polisakkaritlerden oluşan ekstrasellüler polimerik yapıların varlığıdır[1]. Biyofilm volümünün birçoğu gerçekte hücrelerden çok bu ekstrasellüler polimerik yapılardan oluşurlar, ki bu durum ruthenium kırmızısı boyama ile transmisyon elektron mikroskopisinde doğrulanmıştır [186]. Bu biyofilm matriks, mineralleri[187] veya konakta üretilen serum komponentlerini tutan bir filtre gibi hareket eder[188]. Anwar ve arkadaşları, MIC değerini çok aşan tobramisin düzeyleri ile tedavi edilen hastalarda *P. aeruginosa* için biyofilm hücrelerindeki sayıca azalma 2 log iken, aynı dozda planktonik hücrelerde 8 log azalmanın sağlandığını göstermişlerdir[189].

Yabancı cisim enfeksiyonlarının oluşumunda sırası ile gelişen olaylar şunlardır: a) bakterinin materyale primer olarak yapışması, b) ekstrasellüler sümüksü bir yapının yardımı ile hücrelerin yapışması ile çok katlı bakteri kümelerinin oluşumu[20, 190].

Yerleştirilen yabancı cisim mikroorganizma ile kontamine olduğunda birçok değişken biyofilm gelişimini belirler. Öncelikle, mikroorganizmaların irreversibl bağlanmaları için yabancı cismin yeterince uzun bir süre maruz kalması gereklidir. Tutunan hücre oranı, yabancı cismin içinde bulunduğu sıvıdaki hücre sayı ve tipine, yabancı cisim içinden geçen sıvının akışkanlık oranına ve yüzeyin fizikokimyasal karakteristiklerine bağlıdır. Sıvı içindeki komponentler yüzey özelliklerini değiştirebilir ve bağlanma oranını etkileyebilirler. Bu hücreler öncelikle irreversibl olarak bağlanır ve biyofilmi geliştirmek için ekstrasellüler polisakkaritler üretirler. Büyüme hızı akışkanlık oranından, mediumun besin içeriğinden, antimikrobiyal ilaç konsantrasyonundan ve ortam ısından etkilenir[1].

Yapışmadan hemen sonra ekstrasellüler polisakkaritler oluşturulur ve biyofilm oluşumu başlar. Ekstrasellüler polimerler mikroorganizmaların adezyonunu artırır. Canlı ve cansız dokulardan oluşan bu yapıda bulunan mikroorganizmalar biyofilm içinde veya serbest olarak bulunurlar. Aynı mikroorganizma türlerinin farklı özellikler taşıyan bu iki topluluğunun serbest olan üyelerine genel olarak planktonik mikroorganizmalar denir[20] [190] [1].

Yabancı cisim enfeksiyonlarından en sık izole edilen gram pozitiflerden olan *S.epidermidis*'in *S.aureus* gibi çok sayıda ekzotoksini yoktur. Bu nedenle biyofilm en önemli virülans faktörüdür. *S.epidermidis*'in yabancı cisim yüzeyine yapışması hemen olmaz. Süreç içinde gelişerek spesifik veya nonspesifik faktörler ile yapışır. *S.aureus* ise iyi bilinen adezinleri ile yapışır ama yapışması daha çok fibronektin, fibrinojen ve kollagen gibi konak-doku ligandlarına bağlıdır. *S.aureus* bu yapılara mikrobiyal yüzey proteinleri ile yapışır. Stafilokoklar

yabancı cisim yüzeyine yapıştıktan sonra çoğu teikoik asit ve şekerden oluşan ekstrasellüler matriksi üretir. Bakteri kümeleri çok tabakalı biyofilm içinde bulunur. Koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) polisakkarit intersellüler adezin biyofilm oluşumunda önemli rol oynar. Yine bu mikroorganizmalarda çok katlı biyofilm oluşumunda önemli rolü olan ica geni beta laktam direncine katkıda bulunur ve bu gen enfekte eden suşlarda kontaminasyona yol açanlara göre daha sık saptanır. Koagülaz negatif stafilokoklarda antibiyotiklerin farklı bazı yollardan biyofilm oluşumunu ve adherans mekanizmasını etkilediği gösterilmiştir. Quinupristin / dalfopristin veya tetrasiklinin subinhibitör konsantrasyonu polisakkarit intersellüler adezini eksprese eden ica ADBC operonunun ekspresyonunu artırır. Penisilin, oksasilin, klindamisin, gentamisin, ofloksasin, vankomisin ve teikoplaninin subinhibitör konsantrasyonlarının etkisi yoktur. Vankomisin ve teikoplaninin subinhibitör konsantrasyonda polisteren ve silikon yüzeylere yapışmayı arttırdığı gösterilmiştir. Siprofloksasinin subinhibitör konsantrasyonları bu antibiyotiğe dirençli *S.aureus'* da fibronektin bağlayıcı proteinlerin ekspresyonunu artırır ve katetere adheransın artışına neden olur. *S .epidermidis* vankomisine oldukça duyarlı olmasına rağmen biyofilm içindeki bakteri için aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Vankomisinin molekül büyüklüğü bu azalmış duyarlılıktan sorumlu tutulmaktadır. Teikoplaninin rifampisin veya amikasin ile kombine edilmesi biyofilm içindeki bakterilere duyarlılığı arttırabilir. Ancak hızlı diffüzyona ve yüksek seviyelerde vankomisin ve rifampisin konsantrasyonuna rağmen 72 saat sonra bakteri hala canlıdır. Quinupristin/dalfopristin ve siprofloksasin biyofilm içinde sesil bakteriyi yavaş yavaş öldürür. Bazı çalışmalarda biyofilmin kendisinin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir. Rifampisin aktivitesi ise değişmez. Öte yandan katetere kolonize KNS düşük dozda verilen klaritromisin ile eradike edilmiştir. Linezolid ise biyofilm içindeki konsantrasyonu düşük bile olsa bakteri yükünü %91 azaltmıştır[191] [168] [192].

*Pseudomonas aeruginosa* kistik fibrozis ve diğer kronik akciğer hastalıklarında ve yabancı cisimlerde biyofilm oluşumunda etkilidir. Makrolidlerin biyofilm oluşumunu engelleyici etkisine en fazla konu olan mikroorganizmadır[193].

### **1. Ortopedik Protez Enfeksiyonları:**

Protez ile ilişkili enfeksiyonlar, klinikte kullanılan biyomateryallerle ilgili en ciddi komplikasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. aureus* ve *S. epidermidis* biyomateryal merkezli enfeksiyonlarda en sık etiyolojik ajanlardır *S. epidermidis'* in protez kolonizasyonundaki majör mekanizma polisakkarid slime üretimidir[194]. *S. aureus* için daha çok bildirilen spesifik karakterde matriks proteinlerine bağlanma yeteneğidir. Konak matriks proteinlerine bağlanmada aracılık eden ve MSCRAMM (mikrobiyal yüzey komponentini tanıyan adheziv matriks molekülleri) [40] olarak da adlandırılan adhezivler, fibronektin,

fibrinojen, elastin, osteopontin ve kollajene bağlanırlar [195] [196] [197] [198] [199]. Ortopedik implantlar kollajenle kolayca kaplanabilirler ve böylece cna (kollajen adhezini gen) pozitif stafilokok suşlarıyla adhezyona meyillidirler. Montanaro ve arkadaşları ortopedik protez enfeksiyonlarından elde ettikleri 35 *S. aureus* suşunda PCR yöntemi ile cna varlığını ve slime pozitifliği ile ilişkisini çalışmışlar ve slime-pozitif suşların ağırlıklı olarak kollajene bağlı cna-pozitif suşlar olduğunu saptamışlardır[200].

## 2. Santral Venöz Kateterlerde Biyofilm:

Biyofilm oluşmadan önce santral venöz kateterlerin hemen hepsi biyofilm yapan bakteri ile kolonizedir. Scanning ve transmisyon elektron mikroskobu, hemen hemen tüm santral venöz kateterlerin biyofilm matriks içine gömülü mikroorganizmalar ile sarılı olduğunu göstermiştir[201]. Kateter biyofilminden sıklıkla izole edilen organizmalar; *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* dir[202] [203].

Bu organizmalar hastanın cilt florasından, sağlık personelinin eksojen mikroflorasından veya kontamine infüzyondan kaynaklanır. Bu organizmalar kateter dışındaki ciltten migrasyonla eksternal olarak veya kateter ağzı ya da porttan internal olarak katetere ulaşırlar. Bu cisimlere kolonizasyon 24 saat içinde hızla ortaya çıkar ve konakçı tarafından üretimi şart olan filmlerin (platelet, plazma ve doku proteinleri) fonksiyonu olabilir. Raad ve arkadaşları, santral venöz kateterlerde biyofilm formasyonunun her yanı kapladığını, ancak biyofilm formasyonunun büyüklük ve yerleşiminin kateterizasyon süresine bağlı olduğunu bulmuşlardır; kısa süreli kateterler (< 10 gün) dış yüzde daha büyük biyofilm formasyonuna sahipken, uzun süreli kateterler (30 gün) kateter iç yüzünde daha çok biyofilm formasyonuna sahiptir[203]. Santral venöz kateterden verilen sıvıların içeriği mikrobiyal üremeyi etkileyebilir; Gram pozitif organizmalar (*S. epidermidis*, *S. aureus*) intravenöz sıvılarda iyi büyüyemez, buna karşılık suda yaşayan Gram negatif organizmalar (*P. aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* ve *Pantoea spp*) güçlü bir şekilde büyürler[204] [205] [206] [207] [208]. Bu solüsyonların çoğu besinsel olarak sınırlı oldukları için bakteriyel üreme ile nadiren bulanıklık oluşur (<10<sup>7</sup>CFU/ml).

*Candida* türleri de intravasküler kateterlerde biyofilm oluşturur. Ancak bakteriyel biyofilmler gibi henüz çok araştırılmamıştır. *C.albicans* tarafından oluşturulan biyofilm likid veya agar ortamdan çok yabancı cisim yüzeyine yapışır yapışmaz oluşur. İlk oluşan bazal tabaka biyofilmin gelişiminde önemli rol oynar. Bu biyofilm içinde sıklıkla bakteriler de bulunur. Bu biyofilmlerin, bakteriyel olanlar gibi, içinde barındırdıkları mikroorganizmalar antimikrobiyallere

dirençlidir ve konak savunma sisteminden korunurlar. *C.albicans'm* yanında benzer özelliklerde biyofilm *C.dublinsiensis'de* saptanmıştır

Bu cisimlerdeki biyofilm formasyonunu kontrol eden çeşitli antimikrobiyal tedavi tiplerinin etkisini inceleyen birçok çalışma vardır. Freeman ve Gould, sol atrial kateterlerde dekstroz-heparin yıkamasına sodyum metabisülfid eklenmesinin mikrobiyal kolonizasyonu elimine ettiğini bulmuşlardır [209]. Darouiche ve ark minosiklin ve rifampin emdirilmiş kateterlerde, klorheksidin ve gümüş sülfadiazin emdirilmiş kateterlerden daha az kolonizasyon olduğunu saptamışlardır[210]. Maki santral venöz kateterler üzerinde biyofilm oluşumunun kontrol edilmesini önlemek için birkaç yol önermektedir: takma sırasında aseptik tekniklerin kullanılması, topikal antibiyotiklerin kullanılması, kateterizasyon süresinin azaltılması, intravenöz sıvı için filtre kullanılması, katetere yapışan mikroorganizmaların geri dönüşünü önlemek için mekanik bariyer oluşturulması, antimikrobiyal bir ajanla kateterin iç lümeninin kaplanması ve kontamine kateterin çıkarılması[211].

### 3. Mekanik Kalp Kapaklarında Biyofilm:

Mikroorganizmalar, mekanik kalp kapaklarının komponentlerine ve kalbi çevreleyen dokuya bağlanır ve biyofilm oluşturarak protez kapak endokarditi olarak bilinen duruma yol açarlar. Bu durumdan sorumlu primer organizmalar *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, Gram negatif basiller, difteroidler, enterokoklar ve *Candida spp.*' dir. Bu organizmalar ciltten, santral venöz kateterler gibi diğer yabancı cisimlerden veya dental işlemlerden kaynaklanabilir[188]. Mekanik kalp kapağı implantasyonu doku hasarına neden olur ve dolaşımdaki trombosit ve fibrinler kapağın bağlandığı yere birikme eğilimindedir. Mikroorganizmalar da bu lokalizasyona kolonize olmaya artmış hassasiyet gösterirler[188]. Bunun sonucunda biyofilmler kapağın kendisinden çok, protezi çevreleyen dokuda veya protez sütürleri çevresindeki dokuda gelişir[212] [213] [214]. Diğer yabancı cisimlerde olduğu gibi, görece az hastada tek başına antibiyotik tedavisi biyofilm enfeksiyonlarında kür sağlayabilir[215]

### 4. Üriner Kateterlerde Biyofilm:

Üriner kateterler yerleştirildikleri zaman iç ve dış yüzeylerinde biyofilm oluşumuna hazır, tübüler lateks veya silikon araçlardır. Hem dış hem de iç yüzeylerinde biyofilm oluşabilir. Organizmalar sıklıkla cismi kontamine eder ve biyofilm *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve diğer Gram negatif organizmalarla gelişir[187]. Üriner kateterizasyonun uzaması durumunda bu organizmaların biyofilm geliştirme eğilimleri artar ve üriner sistem enfeksiyonu ile sonuçlanır. Örneğin; kısa süreli (7 gün) üriner kateterizasyon uygulanan hastaların % 10 – 50' si infekte olurken, uzun süreli (> 28

gün) üriner kateterizasyon uygulanan hastaların hemen hemen tamamı infekte olur[187]. Üriner kateter biyofilmleri başlangıçta tek türden oluşurken, uzamış maruziyet kaçınılmaz olarak çok tür içeren biyofilmlere neden olur[187]. Brisset ve arkadaşları, kateter materyaline adhezyonun hem organizmanın hem de yüzeyin hidrofobitesine bağlı olduğunu saptamışlardır[216]. Kateter geniş bir çeşitlilikte organizmanın bağlanabileceği hidrofobik ve hidrofilik alanlar gösterir. Divalent katyonlar (kalsiyum ve magnezyum) ve üriner pH artar. Bu da bakteriyel yapışmanın artışına yol açar. Bu kolonizasyon silikon, poliüretan, hidrojel kaplı materyaller gibi tek bir materyal ile engellenemez[217].

Bundan başka; belli bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen üreaz, hastanın idrarındaki üreyi amonyum hidrokside hidrolize eder. İdrar - biyofilm arasındaki yüzeyde artan pH, sutrivit ve hidroksiapatit gibi minerallerin presipitasyonuna yol açar. Bu mineral içeren biyofilmler kabuklanmaya yol açar ve kateterin iç kısmı tamamen tıkanır. Bakteriler 1-3 gün içinde içten yukarı mesaneye doğru tırmanır[218].

Gram negatifler pozitiflere göre daha az yapışır. *Proteus stuartii* genellikle uzun süreli kalan üriner kateterlere sıkı bağlanır. Bu bağlanma tip 3 fimbria ile olur. *E.coli'nin* üriner kateterlere bağlanması daha az sıklıkta olur. Ürolojik yabancı cisimlere *E.coli'nin* bağlanması kateterin konulduğu yere ve belli bakteri suşlarının lokal predominansına göre değişir. Tip 1 fimbriyası olan *E.coli* suşları daha sık olarak mesaneyi infekte ederken P fimbriyası olanlar böbreği infekte eder[193].

Üriner kateterlerde biyofilm oluşumunun engellenmesi için birkaç önlem önerilmiştir: Antimikrobiyal kremler, yağlar, mesane irrigasyonu; toplayıcı torbaya antimikrobiyallerin verilmesi, antimikrobiyal emdirilmiş kateterler ve sistemik antibiyotik kullanımı gibi[219]. Çoğu etkisiz kalmıştır. Ancak gümüş kaplı kateter bakteriüriyi 4 güne kadar geciktirmiştir. Bazı Gram negatif bakterilerin kolonizasyonu mandelik asit + laktik asit ile azaltılmıştır[220]. Yine siprofloksasin içeren lipozomlar ile kaplanan hidrojel içeren Foley kateterlerde bakteriüri gelişmesi iki kat daha az bulunmuştur[221].

## 5. Kontakt Lensler:

Kontakt lensler, materyalin yapısına, tasarımına, dokusuna ve kullanım süresine göre sınıflandırılırlar. Yumuşak kontakt lensler hem hidrojel hem de silikon içerirler ve lens materyali boyunca oksijen difüzyonuna izin vererek korneaya oksijen sağlarlar. Sert kontakt lensler “polymethylmethacrylate”dan oluşurlar ve titreşim hareketi ile, oksijen içeren gözyaşının lensin altından akışına izin verirler[222]. Bakteriler her iki tip lense de adhere olabilir[223] [224] [225].



Miller ve Ahearn, *P. aeruginosa*'nın hidrofilik kontakt lenslere (hidrojeller) başlangıçtaki bağlanmasını incelemişler ve adherans oranının su içeriği ve polimer bileşimine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini bulmuşlardır. Bağlanmanın derecesi, substratın yapısı, pH, elektrolit konsantrasyonu, polimerlerin iyon yükü ve bakterinin dayanıklılığı gibi çok sayıda faktöre bağlı bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları hidrofobik yüzeylere ve noniyonik polimerlerden oluşan lenslere daha fazla adherans olduğunu göstermiştir[223].

Kontakt lenslere adhere olduğu gösterilen organizmalar *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Serratia* spp., *E. coli*, *Proteus* spp. ve *Candida* spp. dir[222]. *P. aeruginosa*'ya bağlı keratit olgularından çıkarılan lenslerde scanning elektron mikroskobu ile biyofilm tabakası (geniş eksopolimer matriks) gösterilmiştir[224].

## 6. İntrauterin Araçlar:

Sıklıkla kullanılan intrauterin araçlar iki tiptir: Baryum sülfat emdirilmiş polietilen gibi emici olmayan materyalden yapılanlar ve bakır ya da progestasyonel madde gibi kimyasal aktif bir madde serbestleyenler. İntrauterin araçlar genellikle çıkarılmalarını kolaylaştıran bir kuyruk içerirler. Bu yapı naylon kılıf ile çevrili plastik bir monofilamenttir[226].

İntrauterin araçların pelvik inflamatuvar hastalığa (PID) yol açtığı gösterilmiştir[226] [227] [228]. Herhangi bir yakınması olmayan kadınlardan çıkarılan intrauterin araçlarda yoğun *S. epidermidis*, *enterococcus* spp. ve anaerob laktobasil kontaminasyonu gösterilmiştir[228]. Marrie ve Costerton ise, *Lactobacillus plantarum*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp., grup B streptokok, *Micrococcus* spp., *Candida albicans*, *S. aureus* ve *Enterococcus* spp izole etmişlerdir[229]. Ek olarak PID olgularından çıkarılan intrauterin araçlarda beta hemolitik streptokoklar, *S. aureus*, *E. coli* ve bazı anaerob bakteriler bulunabilir[228].

İntrauterin araçlardaki biyofilme ait kanıtla scanning elektron mikroskobu ve transmission elektron mikroskobu ile [230] [231] [229] ve zenginleştirilmiş besiyeri kültürlerinde [229] [232] [228] gösterilmiştir. Scanning elektron mikroskobu kullanarak Marrie ve Costerton biyofilmde insan lökositleri ve hücre kalıntılarını göstermişlerdir[229].

İntrauterin araçların kuyruk kısımları birincil kontaminasyon kaynağıdır. Bir çalışmada servikte kuyruk uzantısı içermeyen intrauterin araç örneklerinin yaklaşık yarısı steril bulunmuştur. Başka bir çalışma kuyruğun ağırlıklı olarak vajinal floraya maruz kalan distal parçasının kontamine olduğunu göstermiştir [230].

## **GEREÇ VE YÖNTEM:**

Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 63 adet koagülaz negatif stafilokok, ve 91 adet *Enterococcus spp* izolatu kullanıldı. Kullanılan suşların koloni morfolojileri, mikroskopik görünüşleri, katalaz ve koagülaz reaksiyonları, safra eskülin agar ve % 6,5 NaCl'e etkileri incelendi. Slime faktörün belirlenmesinde standart tüp yöntemi ve kantitatif mikropalak test yöntemi kullanıldı.

### **Bakterilerin İdentifikasyonu:**

% 7 insan kanlı agarda 35,5° C' de bir gece inkübe edilen klinik örneklerin, Gram boyama mikroskopisinde Gram olumlu görülen ve katalaz olumlu saptanan kolonilere koagülaz testi yapıldı. Koagülaz testi tüp yöntemiyle, insan kan plazması kullanılarak yapıldı. Bu amaçla 1 ml insan plazması 4 ml distile su ile sulandırıldı ve her bir tüpe 1 ml kondu. Steril bir öze ile stafilokok kolonilerinden alınarak tüpteki plazmada ezilerek dağıtıldı. Plazmadaki bakteri süspansiyonu 35,5° C' de 24 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirildi. Tüpteki plazmada pıhtılaşma olması koagülaz pozitifliği olarak değerlendirildi. Pıhtı oluşturmeyen izolatlar koagülaz negatif stafilokok olarak kabul edildi.

*Enterokokların* identifikasyonu için; % 7 insan kanlı agarda 35,5° C' de bir gece inkübe edilen klinik örneklerden gri, parlak görünümde olup alfa hemolitik, beta hemolitik olan ya da hemoliz yapmayan, Gram boyama mikroskopisinde Gram olumlu görünen kolonilere katalaz testi yapıldı. Katalaz olumsuz saptanan kolonilerden safralı eskülinli agar katı besiyerine (Oxoid) ekim yapıldı ve 35,5° C' de de bir gece inkübe edildi. Besiyeri plağında siyah renk oluşması bakterinin safralı eskülini hidrolize ettiği yönünde değerlendirildi ve izolatlar *Enterococcus spp* kabul edildi.

Tüm bakteriler % 10 gliserinli triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerinde -20° C' de saklandı. Bakterilerin canlılığı pasajlarla kontrol edildi.

### **Slime Üretiminin Saptanması:**

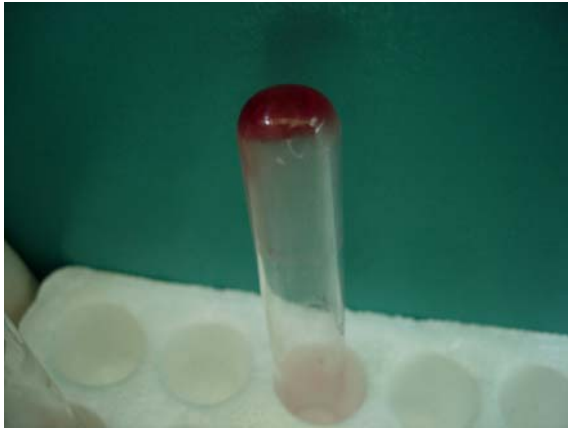
Bakterilerin slime üretimi kantitatif tüp yöntemi ve kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı.

#### **I. Standart Tüp Yöntemi:**

Bu yöntemle slime varlığının saptanması Christensen ve arkadaşlarının belirlediği şekilde yapıldı[233, 234]

% 7 insan kanlı besiyerinde bir gece inkübe edilmiş bakteriler, 2 ml % 0,25 glikoz içeren triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerine ekildi. 35,5° C' de bir gece inkübasyon sonrası

1/40 oranında % 0,25 glikoz içeren triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyeri ile dilüe edilerek 35,5° C' de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra test tüpünün içeriği boşaltıldı ve iki kez yıkandı. Tüpler ters çevrilerek havada kurutulduktan sonra 2 ml % 0,25 lik safranin boyası konuldu ve 2 dakika süre ile beklendikten sonra, tüp içeriği boşaltılarak 2 kez nazikçe yıkandı. Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bekletildi. Tüpün iç çeperinde görülür ince film tabakası, slime üretimi yönünde değerlendirildi. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar (+), (++), (+++) olarak değerlendirildi. Sıvı ile hava birleşim yerinde halka oluşumu, slime oluşumu göstergesi olarak kabul edilmedi.



**Şekil V:** Standart tüp yöntemi ile slime pozitifliği



**Şekil VI:** Slime pozitifliğinin derecelendirilmesi

## **II. Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Yöntemi:**

Bu yöntemde izolatlar, % 7 insan kanlı besiyerinde 35,5° C' de bir gece inkübe edildikten sonra, %0,25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerine ekildi. 35,5° C' de bir gece inkübe edildi. Tekrar % 0.25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerinde 1/40 oranında ekim yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plakların her bir kuyucuğuna 200 µl bakteri süspansiyonu, her bakteri iki kuyucuğa ekilerek ve 35,5° C' de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez 200 µl nazikçe

yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl % 1 kristal viole eklenerek 15 dk boyanması için beklendikten sonra içerik boşaltıldı ve iki kez yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20) ile çözdürüldü. 595 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak optik dansitesi 1' den büyük olan izolatların slime oluşturduğu kabul edildi[22].

#### **Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması:**

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları; NCCLS M2-A8 ve M100-S13 (M2) [235] önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile ve NCCLS M7-A6 ve M100-S13 (M7) [236] önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonları (MIC) bakılmak suretiyle belirlendi.

Disk difüzyon yöntemi için; bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerinde 0.5 Mc Farland bulanıklığı spektrofotometrik olarak (625 nm' de OD 0,1) belirlendikten sonra, Mueller Hinton (Oxoid) katı besiyerine ekildi. Üzerine 2 cm aralıklarla antibiyotik diskleri NCCLS M2-A8 ve M100-S13 (M2)[235] önerileri doğrultusunda yerleştirildi. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra, diskler etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek NCCLS M100-S13 (M2)[235]' de belirtilen zon çaplarına göre antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. Disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik diskleri; stafilokoklar için oksasilin, penisilin, eritromisin, klindamisin, vankomisin, gentamisin, rifampisin, siprofloksasin ve kloramfenikol; enterokoklar için penisilin, ampisilin, gentamisin (120 µg lık disk), vankomisin, teikoplanin, rifampisin ve siprofloksasin olarak belirlendi.

MIC değerlerinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plaklara, NCCLS M7-A6 ve M100-S13 (M7)[236] önerileri doğrultusunda hazırlanan antibiyotik dilüsyonları 100 µl olarak ekildi. Bunun üzerine 0,5 Mc Farland bulanıklığı spektrofotometrik olarak belirlenmiş olan bakteri süspansiyonu 100 µl olarak eklendi. Her bir dizide kontrol kuyucuğu olarak 100 µl % 0,9 NaCl ile 100 µl bakteri süspansiyonu ekildi.

#### **KNS'larda Nöraminidazın Slime Oluşumuna, Adheransa ve Antibiyotik Direncine Etkisinin Araştırılması:**

Bu çalışmada bakterinin nöraminidaz ile birlikte ekildiğinde adheransa, slime oluşumuna, ve antibiyotik direncine etkisinin görülmesi amaçlandı. Bu amaçla slime-pozitif ve slime-negatif KNS suşları belirlendi. % 7 insan kanlı besiyerine ekilen KNS suşları bir gece inkübe edildikten sonra, % 0,25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) besiyerine pasajlandı. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra % 0,25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) besiyerinde

spektrofotometrik olarak 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Antibiyotik olarak; disk difüzyon ve mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile dirençli suşların saptanması ve özellikle yabancı cisim enfeksiyonlarında sık kullanılan bir antibiyotik olması nedeniyle siprofloksasin ile çalışıldı. Siprofloksasin 32 – 16 – 8 – 4 – 2 – 1 – 0,5 – 0 µg/ml dilüsyonlarında hazırlandı. Nöraminidaz son konsantrasyonu 100 IU/ml olarak belirlendi. Bundan sonra bakteriler iki grup olarak çalışıldı.

I. Grup: 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa her sırada bir bakteri suşu olacak şekilde, plağın bir yarısında 100 µl antibiyotik dilüsyonu + nöraminidaz, 100 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde altı sıra ekim yapıldı. Diğer yarısına 100 µl antibiyotik dilüsyonu, 100 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde ekim yapıldı. Eşit konsantrasyonun sağlandığını görmek amacıyla plaklar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okutuldu. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak minimal inhibitör konsantrasyon üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, % 1' lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 595 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak slime oluşumu üzerine etki tespit edildi.

II. Grup: 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa her sırada bir bakteri suşu olacak şekilde, altı sıralık iki grup olarak bakteri süspansiyonları 200 µl olarak ekildi. Eşit konsantrasyonun sağlandığını görmek amacıyla plaklar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okutuldu. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak üremenin olduğu doğrulandı. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plağın bir yarısında 200 µl antibiyotik dilüsyonu + nöraminidaz, diğer yarısına 200 µl antibiyotik dilüsyonu olacak şekilde ekim yapıldı. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak bakteri adheransı üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, % 1' lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi.

Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 595 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak slime oluşumu üzerine etki tespit edildi.

### **Enterokoklarda Nöraminidazın Slime Oluşumuna, Adheransa ve Antibiyotik Direncine Etkisinin Araştırılması:**

Bu çalışmada bakterinin nöraminidaz ile birlikte ekildiğinde slime oluşumuna, adheransa ve antibiyotik direncine etkisinin görülmesi amaçlandı. Bu amaçla slime pozitif ve slime negatif Enterokok suşları belirlendi. % 7 insan kanlı besiyerine ekilen Enterokok suşları bir gece inkübe edildikten sonra, % 0,25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) besiyerine pasajlandı. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra % 0,25 glikozlu triptic soy broth (Oxoid) besiyerinde spektrofotometrik olarak 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Antibiyotik olarak; disk difüzyon ve mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile vankomisine az hassas (VIRE) enterokok suşlarının saptanması nedeniyle vankomisin kullanıldı. Vankomisin 16 – 8 – 4 – 2 – 1 – 0 µg/ml dilüsyonlarında hazırlandı. Nöraminidaz son konsantrasyonu 100 IU/ml olarak belirlendi. Bundan sonra bakteriler iki grup olarak çalışıldı.

I. Grup: 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa her sırada bir bakteri suşu olacak şekilde, plağın bir yarısında 100 µl antibiyotik dilüsyonu + nöraminidaz, 100 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde altı sıra ekim yapıldı. Diğer yarısına 100 µl antibiyotik dilüsyonu, 100 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde ekim yapıldı. Eşit konsantrasyonun sağlandığını görmek amacıyla plaklar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okutuldu. 35,5° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak minimal inhibitör konsantrasyon üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, % 1' lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 595 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak slime oluşumu üzerine etki tespit edildi.

II. Grup: 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plağa her sırada bir bakteri suşu olacak şekilde, altı sıralık iki grup olarak bakteri süspansiyonları 200 µl olarak ekildi. Eşit

konsantrasyonun sağlandığını görmek amacıyla plaklar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okutuldu. 35,5° C’ de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak üremenin olduğu doğrulandı. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plağın bir yarısında 200 µl antibiyotik dilüsyonu + nöraminidaz, diğer yarısına 200 µl antibiyotik dilüsyonu olacak şekilde ekim yapıldı. 35,5° C’ de 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar 625 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak bakteri adheransı üzerine etki tespit edildi. Plak içerikleri boşaltıldıktan sonra planktonik durumdaki bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla iki kez plaklar nazikçe yıkandı. Plakların havada kurutulmasının ardından, % 1’ lik kristal viyole ile 15 dakika muamele edildi. Boyanın boşaltılmasının ardından iki kez, boya artıklarını uzaklaştırmak amacıyla plaklar nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra etanol – aseton (80/20) ile çözdürüldü ve 595 nm dalga boyunda mikroELISA otomatik okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak slime oluşumu üzerine etki tespit edildi.

#### **İstatistiksel İnceleme:**

Çalışmada slime pozitifliği ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki Chi-square (ki-kare) testi ve Fisher’s exact test (Fisher kesin testi) ile karşılaştırıldı. Nöraminidazın slime oluşumu ve bakteri çoğalmasına etkisi için, GraphPad (Prism) versiyon 2.01 bilgisayar programı ile One-Way ANOVA yöntemi kullanılarak istatistiksel karşılaştırma yapıldı. İstatistiksel analiz için  $p \leq 0.05$  istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

## **BULGULAR:**

### **Koagülaz Negatif Stafilokoklar:**

#### **A) Antibiyotik duyarlılıkları ve slime oluşturma ilişkisi:**

Çalışmaya alınan 63 bakterinin % 41,3' ü (n=26) slime negatif, % 58,7' si (n=37) slime pozitif olarak saptandı (Tablo III). Bakterilerin slime oluşturma özelliklerine göre antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel anlamlılığı karşılaştırıldı (Tablo IV – V

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 22 (% 59,5) tanesi oksasiline dirençli, 15 (%40,5) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 14 (%53,8) ve 12 (%46,2) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 36 oksasiline dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 22 (% 61,1) iken slime-negatif olanlar 14 (% 38,9) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda oksasiline duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $\chi^2 = 0,196$ ,  $p = 0,658$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 19 (%51,4) tanesi siprofloksasine dirençli, 18 (%48,6) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 12 (%46,2) ve 14 (%53,8) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 31 siprofloksasine dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 19 (%61,3) iken slime-negatif olanlar 12 (%38,7) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda siprofloksasine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $\chi^2 = 0,165$ ,  $p = 0,685$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 8 (%21,6) tanesi gentamisine dirençli, 29 (%78,4) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 3 (%11,5) ve 23 (%88,5) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 11 gentamisine dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 8 (%72,7) iken slime-negatif olanlar 3 (%27,3) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda gentamisine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-



negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Fisher kesin testi ile  $p = 0,502$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 6 (%16,2) tanesi rifampisine dirençli, 31 (%83,8) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 5 (%19,2) ve 21 (%80,8) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 11 rifampisine dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 6 (%54,5) iken slime-negatif olanlar 5 (% 45,5) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda rifampisine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri ile slime-negatif bakterilerin dirençlilikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Fisher kesin testi ile  $p = 0,750$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 7 (%18,9) tanesi kloramfenikole dirençli, 30 (%81,1) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 2 (%7,7) ve 24 (%92,3) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 9 kloramfenikole dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 7 (%77,8) iken slime-negatif olanlar 2 (%22,2) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda kloramfenikole duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Fisher kesin testi ile  $p = 0,286$ ).

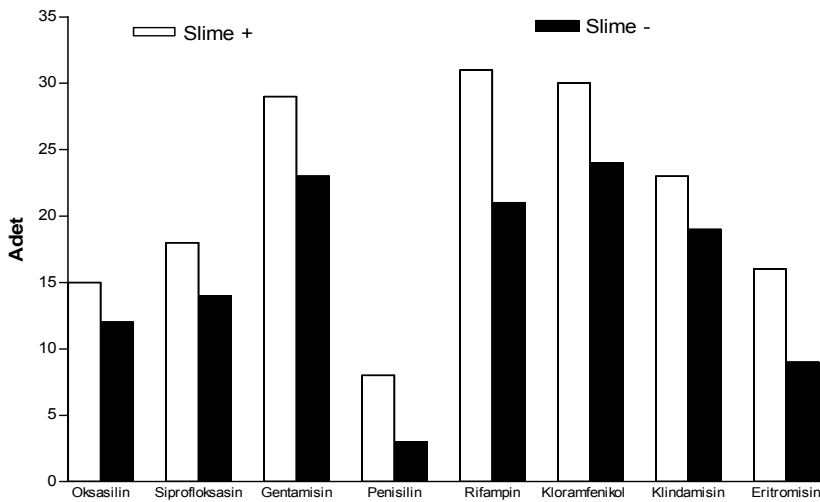
Slime-pozitif 37 KNS suşundan 14 (%37,8) tanesi klindamisine dirençli, 23 (%62,2) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 7 (%26,9) ve 19 (%73,1) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 21 klindamisine dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 14 (%66,7) iken slime-negatif olanlar 7 (%33,3) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda klindamisine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $\chi^2 = 0,819$ ,  $p = 0,366$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 21 (%56,8) tanesi eritromisine dirençli, 16 (%43,2) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 17 (%65,4) ve 9 (%34,6) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 38 eritromisine dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 21 (%55,3) iken slime-negatif olanlar 17 (%44,7) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda eritromisine duyarlılıkları

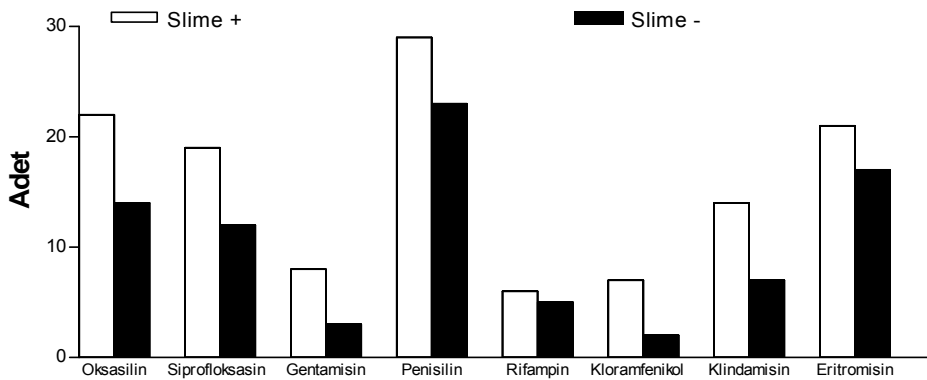
karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Fakat dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $\chi^2 = 0,475$ ,  $p = 0,491$ ).

Slime-pozitif 37 KNS suşundan 29 (%78,4) tanesi penisiline dirençli, 8 (%21,6) tanesi hassas iken, 26 slime-negatif KNS suşunda bu oran sırasıyla 23 (%88,5) ve 3 (%11,5) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 52 penisiline dirençli KNS suşunda slime-pozitif olanlar 29 (%55,8) iken slime-negatif olanlar 23 (%44,2) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda penisiline duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri ile slime-negatif bakterilerin dirençlilikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Fisher kesin testi ile  $p = 0,502$ ).

İncelenen suşların tümü vankomisine duyarlı bulundu.



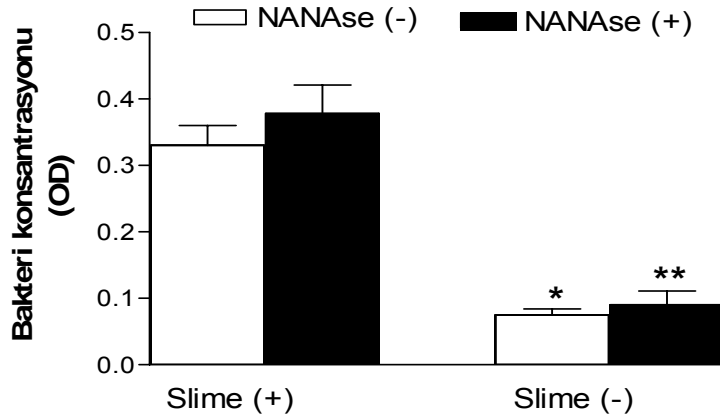
**Tablo IV:**KNS antibiyotik hassasiyetlerinin slime oluşturma özelliklerine göre karşılaştırılması



**Tablo V:** KNS antibiyotik dirençlerinin slime oluşturma özelliklerine göre karşılaştırılması.

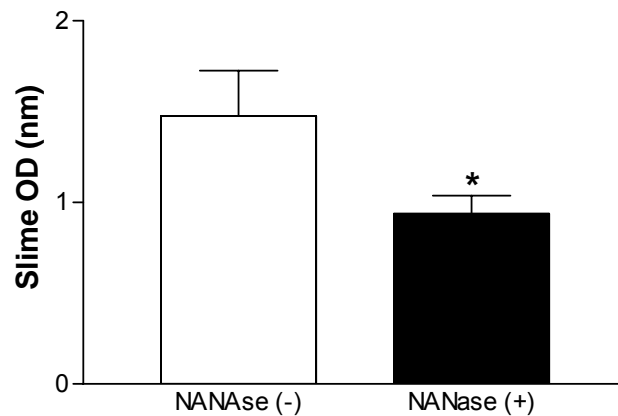
### B) Nöraminidazın slime oluşumu, bakteri adheransı ve bakteri çoğalmasına etkisi:

KNS suşlarının slime oluşturma özelliklerine göre adherans ve çoğalması incelendiğinde, slime-pozitif bakterilerin slime-negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığının saptanmasına ( $p<0,0001$ ) karşın, nöraminidazın slime oluşturan ve oluşturmeyan KNS lerin adherans ve çoğalmasına hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Tablo VI).



**Tablo VI:** Slime oluşturma özelliklerine göre KNS ların bakteri adheransı ve çoğalması ile NANase'in etkisi karşılaştırıldığında; sadece besiyer (beyaz bar) ve NANase (100mU/ml) (siyah bar) ile muamele edilmiş gruplar arasında herhangi bir farklılık tesbit edilmezken slime-pozitif KNS lerin polistren mikroplaklara yapışma ve çoğalmasının istatistiki olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu tesbit edilmiştir (\*, \*\*:  $p<0,0001$ )

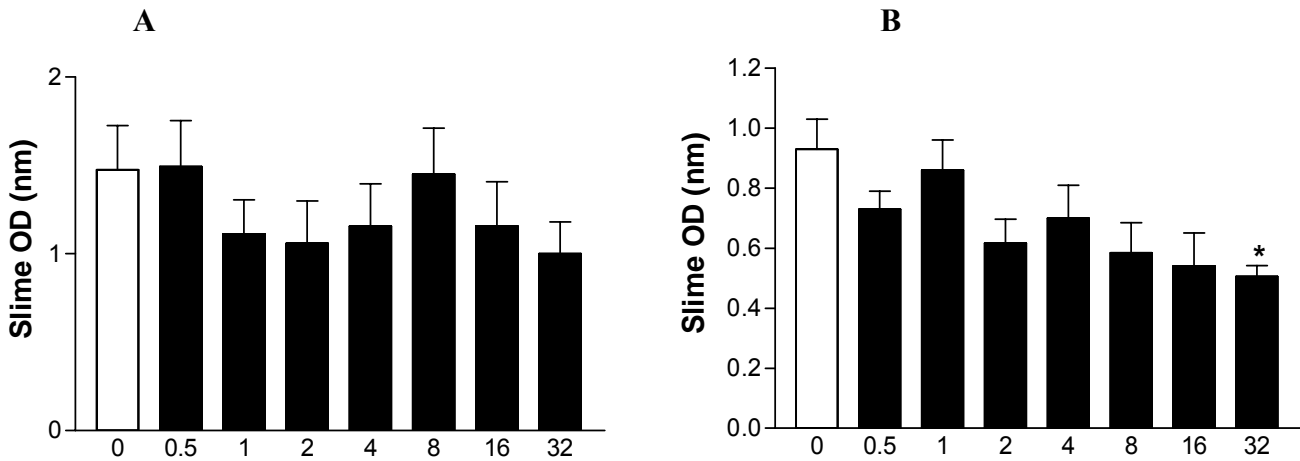
Nöraminidazın slime oluşumuna etkisi incelendiğinde, slime pozitif KNS suşlarında nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı saptanmış ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,03$ ) (Tablo VII).



**Tablo VII:** Slime (+) KNS larda NANase in Slime oluşumuna etkisi. \*, iki grup karşılaştırıldığında NANase in slime oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını belirtmektedir ( $p<0,03$ ).

### C) Nöraminidazın siprofloksasinin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumu ve bakteri adheransı üzerine etkisi

Slime pozitif KNS' larda sadece artan doz siprofloksasin ve nöraminidaz ile artan doz siprofloksasin uygulaması karşılaştırıldığında, nöraminidazın artan doz siprofloksasin ile birlikte uygulandığında slime oluşumunun azaldığı saptanmıştır. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Tablo VIII). Fakat bakteri adheransına hiçbir etkisi görülmemiştir.



**Tablo VIII:** Slime (+) KNS larda (A) artan doz siprofloksasinin, (B) NANase ve artan doz siprofloksasinin slime oluşumuna etkisi. \*, kontrol grubu (beyaz bar) ile karşılaştırıldığında slime oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını belirtmektedir ( $p<0,05$ ).

#### Enterokoklar:

##### A) Antibiyotik duyarlılıkları ve slime oluşturma ilişkisi

Çalışmaya alınan 91 bakterinin % 19,8' i ( $n=18$ ) slime negatif, % 80,2' si ( $n=73$ ) slime pozitif olarak saptandı. Enterokok suşlarının alt tiplerine ve slime oluşturma özelliklerine göre dağılımları yapıldı (Tablo IX).

**Tablo IX: Enterokok alt tiplerinin slime oluşturma özelliğine göre dağılımı**

Alt tip	Slime (+)	Slime (-)	Toplam
<b>Enterococcus faecalis</b>	40 (% 90,9)	4 (% 9,1)	44
<b>Enterococcus faecium</b>	5 (% 71,4)	2 (% 28,6)	7
<b>Enterococcus durans</b>	1	-	1
<b>Enterococcus spp</b>	27 (% 69,2)	12 (% 30,8)	39
<b>Toplam</b>	73	18	91

\* Satır yüzdesi alınmıştır

Bakterilerin slime oluşturma özelliklerine göre antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel anlamlılığı karşılaştırıldı (Tablo X – XI – XII)

Slime-pozitif 73 enterokok suşundan 5 (%6,8) tanesi ampisiline dirençli, 68 (%93,2) tanesi hassas iken, 18 slime-negatif enterokok suşunda bu oran sırasıyla 9 (%50) ve 9 (%50) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 14 ampisiline dirençli enterokok suşunda slime-pozitif olanlar 5 (%35,7) iken slime-negatif olanlar 9 (%64,3) olarak bulundu. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden daha az saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fisher kesin testi ile  $p = 0$ ).

Slime-pozitif 73 enterokok suşundan 17 (%23,3) tanesi yüksek doz gentamisine dirençli, 56 (%76,7) tanesi hassas iken, 18 slime-negatif enterokok suşunda bu oran sırasıyla 10 (%55,6) ve 8 (%44,4) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 27 yüksek doz gentamisine dirençli enterokok suşunda slime-pozitif olanlar 17 (%63) iken slime-negatif olanlar 10 (%37) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda yüksek doz gentamisine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden daha fazla saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $\chi^2 = 7,205$ ,  $p = 0,007$ ).

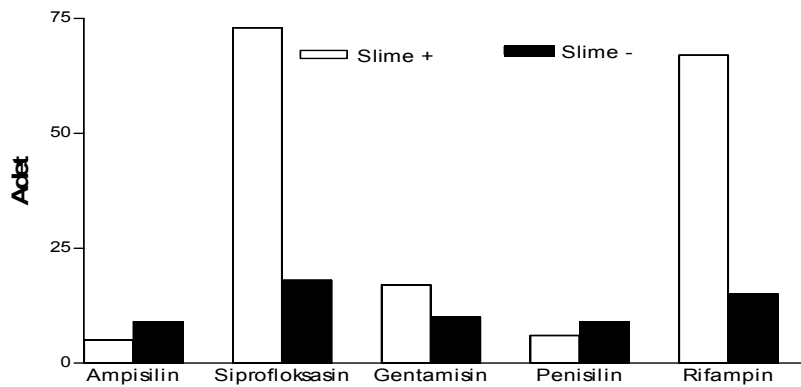
Slime-pozitif 73 enterokok suşundan 6 (%8,2) tanesi penisiline dirençli, 67 (%91,8) tanesi hassas iken, 18 slime-negatif enterokok suşunda bu oran sırasıyla 9 (%50) ve 9 (%50) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 15 penisiline dirençli enterokok suşunda slime-pozitif olanlar 6 (%40) iken slime-negatif olanlar 9 (%60) olarak bulundu. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden daha az saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Fisher kesin testi ile  $p = 0$ ).

Slime-pozitif 73 enterokok suşundan 67 (%91,8) tanesi rifampisine dirençli, 6 (%8,2) tanesi hassas iken, 18 slime-negatif enterokok suşunda bu oran sırasıyla 15 (%83,3) ve 3 (%16,7) olarak gözlemlendi. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özellikleri incelendiğinde 82 rifampisine dirençli enterokok suşunda slime-pozitif olanlar 67 (%81,7) iken slime-negatif olanlar 15 (%18,3) olarak bulundu. Bu bulgularla slime-pozitif ve slime-negatif suşlarda rifampisine duyarlılıkları karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık saptanmadı. Dirençli bakterilerin slime oluşturma özelliklerine bakıldığında slime-pozitif bakterilerin dirençlilikleri slime-negatiflerden daha fazla saptanmakla birlikte ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Fisher kesin testi ile  $p = 0,373$ ).

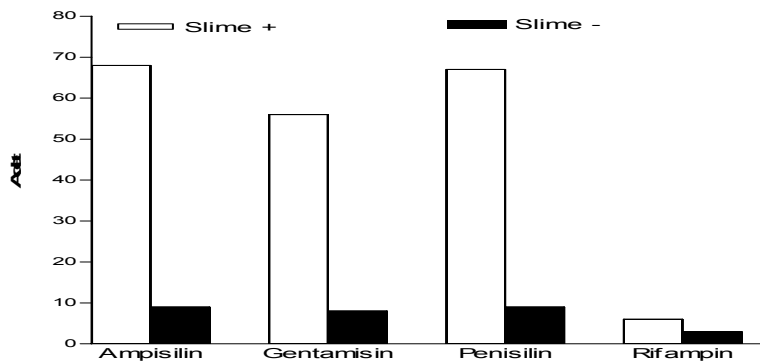
İncelenen suşların tümü disk difüzyon testi ile siprofloksasine dirençli saptandı. Ancak mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonlarına bakıldığında suşların 23 tanesi siprofloksasine hassas (% 25,3), 64 tanesi siprofloksasine dirençli (%70,3), 3 tanesi siprofloksasine az hassas (% 3,3) bulundu. Dirençli suşların 49 tanesi slime-pozitif (%76,6), 15 tanesi slime-negatif (23,4) olarak saptandı. Hassas suşların 20 tanesi slime-pozitif (% 87) iken, 3 tanesi slime-negatif (% 13) olarak saptandı. 3 tane siprofloksasine az hassas olan suşun slime-pozitif olduğu gözlemlendi. Dirençli suşlarda slime pozitifliği daha yüksek saptanmasına karşılık, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Fisher kesin testi ile  $p=0,378$ ).

Disk difüzyon testi ile vankomisine dirençli saptanan 2 suşun mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonlarına bakıldı ve vankomisine hassas oldukları gözlemlendi. Disk difüzyon yöntemi ile vankomisine az hassas saptanan 36 enterokok suşundan 35 tanesinin slime-pozitif olduğu gözlemlendi. Vankomisine az hassas saptanan suşların mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyonlarına bakıldığında sadece 3 enterokok suşu vankomisine az hassas bulundu ve tümünün slime-pozitif olduğu gözlemlendi.

İncelenen suşların tümü teikoplanine hassas bulundu .



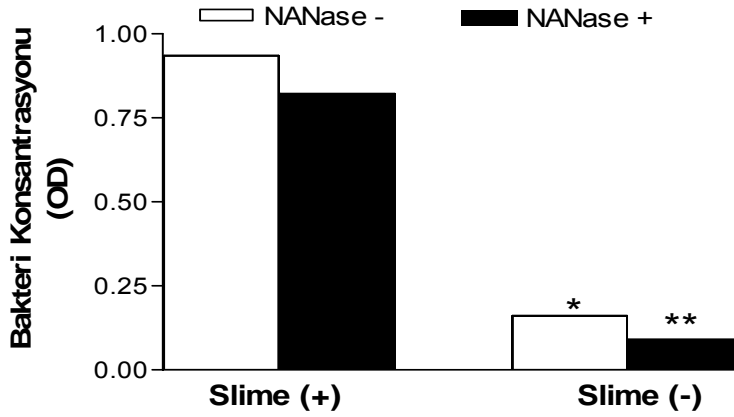
**Tablo XI:** Enterokok antibiyotik dirençlerinin slime oluşturma özelliklerine göre karşılaştırılması.



**Tablo XII:** Enterokok antibiyotik hassasiyetlerinin slime oluşturma özelliklerine göre karşılaştırılması

### B) Nöraminidazın slime oluşumu, bakteri adheransı ve bakteri çoğalmasına etkisi:

Enterokok suşlarının slime oluşturma özelliklerine göre, adherans ve çoğalması incelendiğinde, slime-pozitif bakterilerin slime-negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığı saptanmış ( $p<0,003$ ), buna karşılık, nöraminidazın slime oluşturan ve oluşturmeyan enterokokların adherans ve çoğalmasına hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür (Tablo XIII).



**Tablo XIII:** Slime –pozitif bakterilerin adherans ve bakteri çoğalma oranları slime-negatif bakterilerden fazla bulunmuş ancak NANase in her iki grupta adheransa herhangi bir etkisi olmamıştır. \*,\*\* slime-negatif bakterilerin polistren materyale adheransının istatistiksel olarak anlamlı düşüşünü göstermektedir ( $p< 0,003$ )

Nöraminidazın slime oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde, slime-pozitif enterokok suşlarında nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı saptanmış ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

### C) Nöraminidazın vankomisin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumu ve bakteri adheransı üzerine etkisi:

Slime pozitif enterokoklarda sadece artan doz vankomisin ve nöraminidaz ile artan doz vankomisin uygulaması karşılaştırıldığında, nöraminidazın artan doz vankomisin ile birlikte uygulandığında slime oluşumunu azalttığı saptanmış ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Nöraminidazın bakteri adheransına ise etkili olmadığı saptanmıştır.

## TARTIŞMA:

Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar[2]. Biyofilmler; hidrate bir matris içine gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı, yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklardır[2]. Bakteriler; konak savunması ve antibiyotiklere direnç, yaşam için gerekli ortam oluşturabilme, adhezyon ve kolonizasyon sağlama gibi amaçlarla biyofilm oluştururlar[37].

Biyofilmler mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilme yeteneği kazanabilirler[37].

Biyofilmler, mikroorganizma türleri arasında farklılık göstermekle birlikte, karbonhidrattan zengin “glikokaliks” olarak da adlandırılırlar[160]. Halen yapısı tam olarak tanımlanamamış olan biyofilmin karbonhidrat içeriğinin kendisine sağlamış olduğu birtakım özellikler göz önüne alındığında yakın zamanda biyofilm yapısında var olduğu gösterilen siyalik asitin biyofilmin özelliğini sağlayan en fonksiyonel molekül olduğunu düşündürmektedir[136].

Hücre yüzeyinde glukokonjugat olarak bulunan siyalik asit, hücrenin yüzey elektrik yükünün sağlanması, bulunduğu hücredeki miktarına göre deformabilite, adherans ve motiliteyi düzenleme gibi özellikleri vardır[139].

Bu bilgiler ışığı altında biyofilm tabakasının karbonhidrat içeriğinde siyalik asitin bulunabileceği ve bakterinin adheransı ile antibiyotik direncinde etkili olabileceği hipotezinden yola çıkarak planladığımız bu tez çalışmasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

Slime oluşturma özelliği ile antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, koagülaz negatif stafilokoklarda slime-pozitif bakterilerin antibiyotik direncinin daha fazla olduğu gözlenirken, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Enterokoklarda ise; şu ana kadar belirtilen kuramdan farklı olarak, ampisilin ve penisilin direncinin slime-negatif suşlarda daha fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, rifampisin ve siprofloksasin direncinin slime-pozitif suşlarda daha fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir. Souli ve arkadaşları slime-pozitif KNS suşlarında 22 antimikrobiyal ajanın etkinliğini



inceledikleri çalışmada, rifampisin dışında tüm ajanların etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptamışlardır. Aynı çalışmada etkinliği en çok azalan ajanlar sırasıyla; pefloksasin (%30), teikoplanin (%52) ve vankomisin (%63) olarak bildirilmiştir [237]. Kotilainen ve arkadaşları koagülaz negatif stafilocokların etken olduğu 60 sepsis hastasından elde edilen kan kültürü izolatlarında slime pozitifliği ile antibiyotik dirençlerine incelemişler. Çalışmada 10 antibiyotik kullanılmış ve slime-pozitif *S. epidermidis* suşlarında MIC<sub>90</sub> ve/veya MIC<sub>50</sub> değerlerinin slime-negatif suşlara göre anlamlı oranda fazla olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada tobramisin, gentamisin ve rifampisin için slime üretimi ile direnç arasında istatistiksel anlamlılık saptamışlardır[238]. Bizim çalışmamızda da istatistiksel anlamlılık saptanmamakla birlikte, antibiyotik direnci saptanan suşların sıklıkla slime-pozitif suşlar olduğu görüldü.

Hem koagülaz negatif stafilocok hem de enterokok suşlarının slime oluşturma özelliklerine göre adherans ve çoğalması incelendiğinde, slime-pozitif bakterilerin slime-negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığı saptandı ve sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Yüzey siyalik asitini uzaklaştırmak amacıyla yapılan nöraminidaz uygulaması sonucu koagülaz negatif stafilocok suşlarında nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı saptandı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Enterokok suşlarında ise nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı gözlenmekle birlikte, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her iki grupta da nöraminidazın, bakterilerin adherans ve çoğalmasına hiçbir etkisinin olmadığı görüldü.

Siyalik asitin biyofilm yapısındaki bulunduğunu gösteren çok az sayıda çalışma vardır[136]. Yüzey siyalik asiti uzaklaştırmak amacıyla nöraminidaz kullandığımız çalışmamızda, nöraminidazın KNS suşlarında slime oluşumunu azalttığını ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık. Enterokok suşlarında ise nöraminidazın slime oluşumunu azalttığını görmekle birlikte, bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık. Biyofilm yapısı ile virulans arasındaki ilişki *Enterococcus faecalis*' de bildirilmiştir[20] [239]. Ancak enterokoklardaki biyofilmin yapısı ve özellikleri ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma vardır. Bu anlamda çalışmamız, enterokoklarda yüzey siyalik asitinin nöraminidaz ile uzaklaştırmanın biyofilm oluşumuna etkisinin izlendiği ilk çalışmadır.

*E. faecalis* biyofilmi dış kökü [240], üretral kateterler [241], üretral stentler [242] ve kalp kapaklarında [39] gözlenmiştir. *E. faecalis*' in biyofilm oluşturma yeteneğinin virulans için esansiyel olduğu açıklık kazanmamış olmakla birlikte, klinik izolatların çoğu in vitro biyofilm oluşturma özelliğine sahip gibi görünmektedir[243] [244]. Çalışmamızda incelediğimiz 91 enterokok suşunun 44 tanesi (%48,3) *E. faecalis* olarak saptandı. Bu suşların

da 40 tanesi (%90,9) slime-pozitif bulundu. *E. faecalis*' e ait patojenik faktörler ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Enfeksiyon ile ilişkili *E. faecalis* suşlarında birçok virulans molekülü tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları sitolizin [245] [246] [247], agregasyon maddesi [248] [249] [250], ekstrasellüler süperoksit [251] [252], yüzey karbonhidratları [253] [254] ve Ace [255], EfaA [256], Esp [257] gibi yüzey proteinleridir. *S. aureus*' un biyofilm ile ilişkili bir aminoasidi olan Bap ile *E. faecalis*' in yüzey proteini olan Esp arasındaki yapısal benzerlikten yola çıkılarak yapılan bir çalışmada Esp' nin *E. faecalis* izolatlarında biyofilm oluşumu ile ilgili olabileceği saptanmıştır [244]. Tendolkar ve arkadaşları (2004), Esp ekspresyonunun biyofilm oluşumunu anlamlı ölçüde arttırdığını saptamışlardır[258]. Buna karşılık Sandoe ve arkadaşları 70 kan kültürü izolatında yaptıkları çalışmada Esp ile biyofilm oluşturma yeteneği arasında bir ilişki saptamamışlardır[259].

Bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri ile adherans yetenekleri arasındaki ilişki, özellikle stafilokoklarla yapılan çalışmalarda pek çok kez gösterilmiştir [260-262]. Christensen ve arkadaşları intravasküler kateter ile ilişkili sepsis olgularından elde ettikleri *S. epidermidis* izolatlarında yaptıkları çalışmada, transmisyon ve elektron mikroskopu ile slime-pozitif suşların kateter yüzeyine adhezyonunu gösterirken, slime-negatif suşlarda adhezyon saptamamışlardır[234]. Aguilar ve arkadaşları, inek ve koyunlardaki mastit olgularından izole edilen *S. aureus* suşlarında slime oluşumunun adherans ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, adheransın slime oluşturan suşlarda arttığını tespit etmişlerdir[263]. Biz de çalışmamızda her iki grup bakteride, slime-pozitif bakterilerin slime-negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığını ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık. Ancak her iki grupta da nöraminidazın, bakterilerin adherans ve çoğalmasına herhangi bir etki göstermediğini saptadık.

Nöraminidazın antibiyotik ile birlikte uygulaması sonrası slime oluşumu ve bakteri adheransına etkisinin incelenmesi sonucu; koagülaz negatif stafilokoklarda nöraminidazın artan doz siprofloksasin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumunun azalttığı saptandı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Enterokoklarda ise nöraminidazın artan doz vankomisin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumunu azalttığı saptandı ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her iki grupta da uygulamanın bakteri adheransına herhangi bir etkisi görülmedi.

Antimikrobiyal ajanların, biyofilm gelişimine ve bakteri adheransına etkinliğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Hatch ve Schiller *P. aeruginosa*' dan izole edilen %2'lik alginat süspansiyonunun gentamisin ve tobramisin difüzyonunu inhibe ettiğini ve bu etkinin alginat liyaz kullanarak geri döndürülebileceğini göstermişlerdir[264]. Anwar ve arkadaşları,

10 günden eski *P. aeruginosa* biyofilminin tobramisin ve piperasiline 2 günden yeni biyofilmlerden anlamlı ölçüde daha dirençli olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar 500 µg/ml piperasiline ek olarak 5 µg/ml tobramisin hem planktonik hem de yeni biyofilm hücrelerini tamamen inaktive ettiğini, buna karşılık eski biyofilm hücre sayısının bu dozda ancak yaklaşık % 20 oranında azaldığını bildirmişlerdir[189]. Benzer sonuçlar çok sayıda farklı bakteri ve antibiyotik kombinasyonları ile elde edilmiştir[265] [266] [267]. Reid ve arkadaşları, oral siprofloksasin ve ofloksasin verilen üriner kateterli hastalarda biyofilm gelişimini inceledikleri çalışmada ortalama bir haftalık izlem sonucunda hiçbir kateterde biyofilm saptamamışlardır[268]. Biz çalışmamızda, nöraminidazın slime oluşumunu azaltmasından yola çıkarak antibiyotik ile birlikte uygulandığında bakterinin antibiyotik duyarlılığına ve adheransa etkisini araştırdık. Florokinolonlar yüksek düzeyde penetrasyonları nedeniyle kemik ve ekleme ait enfeksiyonlarda tercih edilen ajanlardır. Özellikle Gram pozitif kokların etken olduğu yabancı cisim enfeksiyonlarında rifampisin ile kombine olarak kullanımının etkinliği bilinmektedir[269] [270] [271]. Florokinolonların Gram negatif bakterilerde polisakkarid kapsül oluşumunu, biyofilm gelişimini ve adheransı azalttığı gösterilmiştir[272] [273]. Buna karşılık koagülaz negatif stafilokokların biyofilm üretimini azalttığı yönünde sınırlı sayıda yayın mevcuttur ve bunlar adherans üzerine olan etkiyi ölçmemektedir[274] [275]. Rupp ve arkadaşlarının slime-pozitif *S. epidermidis* suşları ile yaptıkları çalışmada ise; mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile vankomisin, sefazolin, ofloksasin, L-ofloksasin ve D-ofloksasin' in biyofilm oluşumu ve adheransa etkileri incelenmişler ve adheransa etkili olmadıklarını saptanmıştır[276]. Tüm bu verilerin ışığında çalışmamızda koagülaz negatif stafilokok suşlarında nöraminidaz ile birlikte artan doz siprofloksasin kullandık ve slime oluşumunun azaldığını saptadık. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Buna karşılık bakteri adheransına hiçbir etkisi görülmedi.

Diğer yandan enterokoklara ait biyofilmler ve antibiyotik direnci ile ilişkisi üzerine yapılan kısıtlı sayıda çalışmada, enterokokların oluşturduğu biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde in vitro olarak çok yüksek konsantrasyonlarda antibiyotik gerekliliği (Minimal biyofilm eradike edici konsantrasyon = MBEC) saptanmıştır[277]. Raad ve arkadaşları ise, vankomisine dirençli *E. faecium* (VREF) suşlarındaki Esp geninin kateter kaynaklı bakteriyemi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir[278]. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile saptanan ve mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile doğrulanan vankomisine az hassas 3 enterokok suşunun da slime-pozitif olması dikkat çekicidir. Vankomisin ve teikoplanin yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle ekstrasellüler mukopolisakkaritler tarafından tutularak biyofilm içine geçişleri engellenir. Çalışmamızda nöraminidazın slime tabakası üzerine etkisinden yola

çıkarak, vankomisine az hassas enterokok suşlarını saptamamız nedeniyle enterokoklarda nöraminidaz ile birlikte vankomisin kullandık. Slime pozitif enterokoklarda sadece artan doz vankomisin ve nöraminidaz ile artan doz vankomisin uygulaması karşılaştırıldığında, nöraminidazın artan doz vankomisin ile birlikte uygulandığında slime oluşumunu azalttığı saptadık ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Nöraminidazın bakteri adheransına ise etkili olmadığını gördük.

Sonuç olarak koagülaz negatif stafilokoklarda biyofilm oluşumu ve adherans arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma mevcuttur. Buna karşılık gerek slime yapısındaki siyalik asitin varlığı ve nöraminidazın etkilerini, gerekse florokinolonların koagülaz negatif stafilokokların biyofilm gelişimine etkisini gösterir çok az sayıda çalışma vardır. Bu tez çalışmasının, antibiyotiklerin biyofilme etkinliğini arttırmada nöraminidazın rolünü göstermesi bakımından, gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olduğu düşüncesindeyiz. Enterokoklarda ise, biyofilmin yapısı ve özellikleri ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma vardır. Çalışmamız, enterokoklarda nöraminidazın biyofilm oluşumuna etkisinin izlendiği ilk çalışma olup, bu konuda yeni çalışmalar yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## SONUÇ:

Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik enfeksiyonlara kadar çok geniş bir yelpazede enfeksiyon patogenezinde rol oynamaktadırlar. Biyofilmlerin öneminin anlaşılması ile son 30 yıldır bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalar arasında biyofilm oluşumunu belirleyen genetik modülasyonlar kadar, biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmeye ve biyofilmi eradike etmeye yönelik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *viridans streptokoklar*, enterokoklar, aktinomiçesler, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *V. cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida spp.* gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir.

Biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeylere adheransının, biyofilm oluşturmeyen bakterilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında da bu yönde daha önce yapılmış çalışmalar ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar antibiyotiklerin etkilerine karşı korunurlar. Bu konuyu açıklayan bugün için geçerli üç hipotez vardır. Yapılan çalışmalar biyofilm bakterilerini eradike etmek için minimal inhibitör konsantrasyonunun 1000 katına ulaşan konsantrasyonlarda antibiyotik dozunun gerekebileceğini göstermiştir. Bu çalışmada da antibiyotiklere dirençli suşların daha çok biyofilm oluşturan suşlar olduğu dikkati çekmektedir.

Biyofilmin kesin yapısı belirlenememekle birlikte, karbonhidratların biyofilm yapı ve fonksiyonlarında başrolü oynadığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu karbonhidratlar içinde siyalik asiti öne çıkarmıştır. Siyalik asiti uzaklaştırmanın biyofilme ve biyofilm fonksiyonlarına olan etkisini incelemek amacıyla planlanan bu çalışma sonucu, nöraminidazın bakteri adheransına herhangi bir etkisi olmazken, biyofilm oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Yine nöraminidazın antibiyotik solüsyonları ile birlikte uygulanmasının da aynı şekilde biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Bu anlamda biyofilm eradikasyonunu sağlamak için nöraminidazın, toksik antibiyotik dozlarına ulaşılmadan antibiyotik etkisinin sağlanmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konuda çok sayıda çalışmaya gereksinim vardır.

Çalışmanın önemli bir özelliği de enterokoklardaki biyofilmin yapısı ve özellikleri ile ilgili kısıtlı sayıdaki çalışmadan biri olmasıdır. Diğer yandan enterokoklardaki yüzey siyalik asitinin nöraminidaz ile uzaklaştırmanın biyofilm oluşumuna etkisinin izlendiği ilk çalışmadır.

## ÖZET:

**Giriş:** Biyofilmler irreversibl olarak herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine bağlı mikrobiyal topluluklardır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların adhezyon yetenekleri, virulansı ve biyofilm oluşumu ile konak savunmasından kaçması ve antibiyotiklerin etkilerinden korunması, biyofilm infeksiyonları ile mücadelede yeni ve etkili yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

**Amaç:** Biyofilmin yapısı tam olarak tanımlanamamış olmakla birlikte, biyofilm tabakasının karbonhidrat içeriğinde siyalik asitin bulunabileceği ve bakterinin adhezyonu ile antibiyotik direncinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada nöraminidazın slime oluşum, bakteri adhezyonu ve antibiyotik direncine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır p

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 63 adet koagülaz negatif stafilokok, ve 91 adet Enterococcus spp izolatı kullanıldı. Bakterilerin slime üretimi, Christensen yöntemi (kalitatif tüp yöntemi) ve kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı. Kantitatif mikrodilüsyon plak yönteminde ise 595 nm dalga boyunda mikroplak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) optik dansitesi 1' den büyük olan izolatların slime oluşturduğu kabul edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları; NCCLS M2-A8 ve M100-S13 önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon sıvı yöntemi ile belirlendi. Nöraminidazın, slime oluşumuna ve antibiyotik direncine etkisinin görülmesi amacı ile; bakteriler (0,5 Mc Farland), nöraminidaz ile artan dilüsyonlarda antibiyotik ve nöraminidaz karışımı ile birlikte 96 kuyucuklu U tabanlı polistiren plaklara ekildi. Slime oluşumunun izlenmesi için plaklar kristal violet ile boyanarak 595 nm.' de, antibiyotik direnci için 625 nm.' de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmanın sonucunda hem KNS hem de enterokok suşlarının slime oluşturma özelliklerine göre adhezyon ve çoğalması incelendiğinde, slime-pozitif bakterilerin slime-negatif bakterilerden daha fazla adhere olarak çoğaldığı saptandı ve sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu. Slime oluşturma özelliği ile antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, koagülaz negatif stafilokoklarda slime-pozitif bakterilerin antibiyotik direncinin daha fazla olduğu gözlenirken, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Enterokoklarda ise; ampisilin ve penisilin direncinin slime-negatif suşlarda daha fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, rifampisin ve siprofloksasin direncinin slime-pozitif suşlarda daha fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Nöraminidaz uygulaması sonucu KNS suşlarında slime oluşumunun azaldığı saptandı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Enterokok suşlarında ise nöraminidazın slime oluşumunu azalttığı gözlenmekle birlikte, bu

sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. . Her iki grupta da nöraminidazın, bakterilerin adherans ve çoğalmasına etkili olmadığı görüldü. Koagülaz negatif stafilokoklarda nöraminidazın artan doz siprofloksasin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumunun azalttığı saptandı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Enterokoklarda ise nöraminidazın artan doz vankomisin ile birlikte uygulanmasının slime oluşumunu azalttığı saptandı ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her iki grupta da uygulamanın bakteri adheransına herhangi bir etkisi görülmedi.

**Sonuç:** Bu tez çalışmasında, nöraminidazın slime oluşum, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Nöraminidazın antibiyotikle veya antibiyotik olmaksızın bakterilerin slime oluşturmasına etkili olduğu açıktır. Bu sonuç, siyalik asitin slime tabakasının karbonhidrat içeriğinin önemli bir bileşeni olduğunu ve siyalik asit ile yapılacak çalışmaların slime üreten bakterilere bağlı kronik infeksiyonların tedavisinde hedef molekül olabileceğini düşündürmektedir ve bu konuda daha çok çalışmaya gereksinim vardır. Ayrıca bu çalışma, enterokoklarda nöraminidazın biyofilm oluşumuna etkisinin izlendiği ilk çalışma olması açısından da önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Biyofilm, adherans, nöraminidaz, siyalik asit

## **SUMMARY:**

**Introduction:** Biofilms are microbially derived sessile community characterized by cells that are irreversibly attached to a substratum or interface or to each other. They embedded in a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced, and exhibit an altered phenotype with respect to growth rate and gene transcription.

**Aim:** Biofilm's structured is not well defined, carbohydrate content may plays an important role in biofilm's functions in physiological systems. We hypothesized that sialic acid may take part in carbohydrate structure of slime and may play a critical role in antimicrobial resistance and bacterial adherence.

**Material and Methods:** In this study we examined 63 coagulase negative staphylococci (CNS) and 91 Enterococcus spp obtained from various clinical isolates. The production of slime from all strains was studied by means of two different methods: the Christensen method (qualitative tube method) and quantitative microdilution plate. Optical density (OD) of well content was determined at 595 nm (OD<sub>595</sub>) using a microplate reader and strains which optical density was greater than 1 consider that slime positive. The antibiotic susceptibility of strains was determined that disc diffusion and microdilution broth methods which recommended that NCCLS M2-A8 and M100-S13. To determine neuraminidase effect on slime formation and antibiotic resistance, bacteria (0.5 McFarland) were treated with neuraminidase and/or neuraminidase with increasing dose of antibiotics in 96 well U bottom plates. For slime formation plates were stained with crystal violet and examined at 590 nm and for antibiotic resistance directly examined at 625 nm spectrophotometrically.

**Results:** Adherence of slime-forming CNS and enterococcus were greater than non-slime forming bacteria. Antibiotic resistance in slime-forming CNS is greater than non-slime forming CNS group. In enterococcus group, antibiotic resistance to ampicillin and penicillin in slime-forming bacteria was statistically significant. Rifampicin and ciprofloxacin resistance in slime-forming enterococcus was greater than non-slime forming enterococcus but statistically was not significant. Surface sialic acid mobilization by neuraminidase reduce slime formation in CNS and statistically significant. This reduction also seen in enterococcus group but it's not statistically significant. In both group neuraminidase did not effect on bacterial adherence and growth. Treatment of bacteria with neuraminidase and increasing dose of ciprofloxacin in CNS decreased the slime formation, on the other hand in enterococcus treatment of neuraminidase with increasing dose of vancomycin had not effect in slime formation and in both group, neuraminidase treatment with antibiotics did not effect bacterial adherence.



**Conclusion:** The aim of the study was to show the neuraminidase effect on slime formation, bacterial adherence and antibiotic resistance. It's obvious that the neuraminidase has limited effect on slime formation of bacteria with or without antibiotics. We speculate that this results indicate, the sialic acid is one of the carbohydrate contents of slime and modulation of sialic acid may potential therapeutic target for chronic infections calls by slime-forming bacteria and need more studies on this subject. Also this study is the first study in literature that shows neuraminidase effect on enterococcus biofilm formation.

**Key words:** Biofilm, adherence, neuraminidase, sialic acid

**KAYNAKLAR:**

1. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001;7:277-81
2. Kierek-Pearson K, Karatan E. Biofilm development in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 2005;57:79-111
3. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS and O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003;426:306-10
4. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8
5. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW and Stoodley AP. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002;70:6339-45
6. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11:217-21; discussion 237-9
7. Moller S, Pedersen AR, Poulsen LK, Arvin E and Molin S. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:4632-40
8. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW and Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-8
9. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003;50:101-4
10. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M and Kjelleberg S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 2004;186:692-8
11. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE and Williams P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 2002;4:18-28
12. Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* 2003;5:647-56
13. Williams P. Quorum sensing. *Int J Med Microbiol* 2006;296:57-9
14. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 1997;175:137-240
15. Costerton JW, Geesey GG and Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;238:86-95

16. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45
17. Marshall. *Interfaces in microbial ecology*, 1976:44-47
18. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64
19. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:860-7
20. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881-90
21. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993;75:499-511
22. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;28:449-61
23. Sakarya S, Oncu S, Ozturk B, Tuncer G and Sari C. Neuraminidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative staphylococci. *Arch Med Res* 2004;35:275-8
24. Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ and Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3486-90
25. McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ and Fuqua WC. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 1997;154:259-63
26. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A and Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:179-84
27. Elkins JG, Hassett DJ, Stewart PS, Schweizer HP and McDermott TR. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4594-600
28. Norwood DE, Gilmour A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* 2000;88:512-20
29. Yildiz FH, Dolganov NA and Schoolnik GK. VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol* 2001;183:1716-26

30. Dahlberg C, Linberg C, Torsvik VL and Hermansson M. Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4692-7
31. Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:847-67
32. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* 2004;32:177-83
33. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:677-701
34. Okuda K, Kato T and Ishihara K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis* 2004;10:5-12
35. Characklis. *Biofilms*. John Wiley & Sons Inc., 1990
36. Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD and Lappin-Scott HM. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol Bioeng* 1998;57:536-44
37. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004;236:163-73
38. Flemming. Physico-chemical properties of biofilms. In: V EL, ed. *Biofilms: recent advances in their study and control*: Amsterdam Harwood Academic Publishers, 2000:19-34
39. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93
40. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ and Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585-617
41. O'Toole G, Kaplan HB and Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79
42. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR and Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:3235-8
43. Burne. Gene expression in oral biofilms. In: Wilson M DD, ed. *Medical Implications of Biofilms*, 2003
44. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA and Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004;186:2449-56

45. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 1998;30:285-93
46. Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol* 2003;11:179-84
47. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L and Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 2001;39:223-35
48. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* 1999;34:586-95
49. Moorthy S, Watnick PI. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* 2004;52:573-87
50. Hinsä SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL and O'Toole GA. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 2003;49:905-18
51. Caiazza NC, O'Toole GA. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 2004;186:4476-85
52. Heilmann C, Hussain M, Peters G and Gotz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997;24:1013-24
53. Gross M, Cramton SE, Gotz F and Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* 2001;69:3423-6
54. Timmerman CP, Fleer A, Besnier JM, De Graaf L, Cremers F and Verhoef J. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991;59:4187-92
55. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I and Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001;183:2888-96
56. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW and Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991;173:6558-67
57. Heydorn A, Ersboll B, Kato J, et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2008-17

58. Whiteley M, Bangerla MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001;413:860-4
59. Venturi V. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol Microbiol* 2003;49:1-9
60. Jackson DW, Simecka JW and Romeo T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol* 2002;184:3406-10
61. Stanley NR, Britton RA, Grossman AD and Lazazzera BA. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* 2003;185:1951-7
62. Purevdorj B, Costerton JW and Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4457-64
63. Liu Y, Tay JH. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol* 2001;90:337-42
64. Stoodley P, Jacobsen A, Dunsmore BC, et al. The influence of fluid shear and AICI<sub>3</sub> on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Sci Technol* 2001;43:113-20
65. Vieira MJ, Pinho IA, Gao S and Montenegro MI. The use of cyclic voltammetry to detect biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* on platinum electrodes. *Biofouling* 2003;19:215-22
66. Zhang. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 1998;37:345-348
67. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001;147:3-9
68. Hussain M, Wilcox MH and White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* 1993;10:191-207
69. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996;178:175-83
70. Neu TR, Dengler T, Jann B and Poralla K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *J Gen Microbiol* 1992;138:2531-7
71. Loaec. Uptake of lead, cadmium and zink by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res.* 1997;31:1171-1179

72. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001;183:5395-401
73. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 2004;51:659-74
74. Danese PN, Pratt LA and Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000;182:3593-6
75. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P and Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2000;2:450-64
76. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001;412:442-5
77. Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, Phillips AD and Nataro JP. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2001;41:983-97
78. Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997;65:890-6
79. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D and Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996;20:1083-91
80. Deighton M, Borland R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* 1993;61:4473-9
81. Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM and Simpson WA. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1990;58:2906-11
82. Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:133-7
83. Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994;176:269-75
84. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 2003;112:1291-9
85. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:165-99
86. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8789-93

87. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:27-33
88. Whiteley M, Lee KM and Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13904-9
89. Engebrecht J, Nealson K and Silverman M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 1983;32:773-81
90. Kaplan HB, Greenberg EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 1985;163:1210-4
91. Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6424-8
92. Davey ME, Caiazza NC and O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2003;185:1027-36
93. Lequette Y, Greenberg EP. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 2005;187:37-44
94. De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C and Iglewski BH. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1865-73
95. Lewenza S, Conway B, Greenberg EP and Sokol PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 1999;181:748-56
96. Huber B, Riedel K, Hentzer M, et al. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 2001;147:2517-28
97. Lazazzera BA, Grossman AD. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* 1998;6:288-94
98. Hakenbeck R, Stock JB. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol* 1996;273:281-300
99. J. P. Genetic approaches to signaling pathways and proteins. Victoria, British Columbia, Canada: ASM press, 1995 (Hoch J. ST, ed.
100. Balaban N, Novick RP. Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1619-23
101. Ji G, Beavis RC and Novick RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12055-9



102. Mayville P, Ji G, Beavis R, et al. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1218-23
103. Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B and Moghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* 1993;12:3967-75
104. Vuong C, Gotz F and Otto M. Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2000;68:1048-53
105. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003;48:1429-49
106. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM and Greenberg EP. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 2004;186:1838-50
107. Bunce C, Wheeler L, Reed G, Musser J and Barg N. Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. *Infect Immun* 1992;60:2636-40
108. Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C and Tarkowski A. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* 1993;61:3879-85
109. Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, et al. Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* 1994;94:1815-22
110. Wesson CA, Liou LE, Todd KM, Bohach GA, Trumble WR and Bayles KW. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* 1998;66:5238-43
111. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest* 2003;112:1620-5
112. Raad I, Alrahwani A and Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis* 1998;26:1182-7
113. Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER and Otto M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003;188:706-18
114. Yarwood JM. Expression of the accessory gene regulator quorum sensing system in biofilms of *Staphylococcus aureus*. In: *ASM Conference on Biofilms*. Victoria, British Columbia, Canada, 2003
115. Vuong C, Saenz HL, Gotz F and Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2000;182:1688-93

116. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS and Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13:34-40
117. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 2004;6:269-75
118. Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* 1998;42:33-40
119. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ and Pier GB. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol* 1995;155:2029-38
120. Yasuda H, Ajiki Y, Aoyama J and Yokota T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J Med Microbiol* 1994;41:359-67
121. N. H. The immun response to bacterial biofilms. In: Lappin-Scott HM, Costerton J. W., ed. *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995:233-50
122. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D and Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-6
123. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 1991;37:91-105
124. Anwar H, van Biesen T, Dasgupta M, Lam K and Costerton JW. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1824-6
125. Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F and Critchley I. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997;143 ( Pt 7):2407-13
126. Stewart PS. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol Bioeng* 1998;59:261-72
127. Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H and Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 1997;43:340-5

128. Vransky JD, Stewart PS and Suci PA. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1352-8
129. Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ and Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:317-23
130. Anderl JN, Zahller J, Roe F and Stewart PS. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1251-6
131. Farber BF, Kaplan MH and Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990;161:37-40
132. Tack KJ, Sabath LD. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy* 1985;31:204-10
133. Zabinski RA, Walker KJ, Larsson AJ, Moody JA, Kaatz GW and Rotschafer JC. Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:507-12
134. Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C and Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;181:5993-6002
135. Duguid IG, Evans E, Brown MR and Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:791-802
136. Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA and Bakaletz LO. Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* 2005;73:3210-8
137. Chou HH, Takematsu H, Diaz S, et al. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11751-6
138. Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Chau-in S, et al. Clinical significance of serum total sialic acid in cholangiocarcinoma. *Clin Chim Acta* 2003;327:139-47
139. Sillanauke P, Ponnio M and Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 1999;29:413-25

140. Lindberg G, Rastam L, Nilsson-Ehle P, et al. Serum sialic acid and sialoglycoproteins in asymptomatic carotid artery atherosclerosis. ARIC Investigators. *Atherosclerosis Risk in Communities. Atherosclerosis* 1999;146:65-9
141. Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982;40:131-234
142. Mandic R, Opper C, Krappe J and Wesemann W. Platelet sialic acid as a potential pathogenic factor in coronary heart disease. *Thromb Res* 2002;106:137-41
143. Schauer R. Victor Ginsburg's influence on my research of the role of sialic acids in biological recognition. *Arch Biochem Biophys* 2004;426:132-41
144. Horstkorte R, Rau K, Reutter W, Nohring S and Lucka L. Increased expression of the selectin ligand sialyl-Lewis(x) by biochemical engineering of sialic acids. *Exp Cell Res* 2004;295:549-54
145. Iijima R, Takahashi H, Namme R, Ikegami S and Yamazaki M. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Lett* 2004;561:163-6
146. Sakarya S, Oncu S. Bacterial adhesins and the role of sialic acid in bacterial adhesion. *Med Sci Monit* 2003;9:RA76-82
147. Fogel M, Altevogt P and Schirmacher V. Metastatic potential severely altered by changes in tumor cell adhesiveness and cell-surface sialylation. *J Exp Med* 1983;157:371-6
148. Lefebvre JC, Giordanengo V, Limouse M, et al. Altered glycosylation of leukosialin, CD43, in HIV-1-infected cells of the CEM line. *J Exp Med* 1994;180:1609-17
149. Lichtman MA, Weed RI. Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to cell function. *Blood* 1972;39:301-16
150. Bresalier RS, Rockwell RW, Dahiya R, Duh QY and Kim YS. Cell surface sialoprotein alterations in metastatic murine colon cancer cell lines selected in an animal model for colon cancer metastasis. *Cancer Res* 1990;50:1299-307
151. Tsuji S. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem (Tokyo)* 1996;120:1-13
152. G R. *Nephrology* 1995;1:269-75
153. J D. *CRC Crit Rev Biocompat* 1986;2:219-301
154. L BA. *Infections associated with indwelling medical devices*. Washington: ASM, 1989

155. Kowalewska-Grochowska K, Richards R, Moysa GL, Lam K, Costerton JW and King EG. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. *Chest* 1991;100:1090-5
156. Elliott TS, Faroqui MH. Infections and intravascular devices. *Br J Hosp Med* 1992;48:496-7, 500-3
157. Bos R, van der Mei HC and Busscher HJ. Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res* 1996;75:809-15
158. G R. Microbial biofilms and urinary tract infections. In: Brumfitt W HMT, Bailey RR, ed. *Urinary tract infections*. London: Chapman and Hall, 1998:111-8
159. Jarvik RK. The total artificial heart. *Sci Am* 1981;244:74-80
160. Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318-22
161. L LL. Infective endocarditis. In: Kaye D, ed. *Pathogenesis of infective endocarditis*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:19-35
162. R TA. Infecting microorganisms. In: Kaye D, ed. *Infective endocarditis*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:85-97
163. B RR. Streptococcal endocarditis: the viridans and beta hemolytic streptococci. In: Kaye D, ed. *Infective endocarditis*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992:191-208
164. Joly V, Pagon B, Vallois JM, et al. Value of antibiotic levels in serum and cardiac vegetations for predicting antibacterial effect of ceftriaxone in experimental *Escherichia coli* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1632-9
165. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations. *Br J Exp Pathol* 1972;53:50-3
166. D FR. Otitis media. In: Cherry RDFaJD, ed. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: W B Saunders Co, 1992:174-189
167. Giebink GS, Juhn SK, Weber ML and Le CT. The bacteriology and cytology of chronic otitis media with effusion. *Pediatr Infect Dis* 1982;1:98-103
168. Biedlingmaier JF, Samaranayake R and Whelan P. Resistance to biofilm formation on otologic implant materials. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:444-51
169. Krause PJ, Owens NJ, Nightingale CH, Klimek JJ, Lehmann WB and Quintiliani R. Penetration of amoxicillin, cefaclor, erythromycin-sulfisoxazole, and trimethoprim-sulfamethoxazole into the middle ear fluid of patients with chronic serous otitis media. *J Infect Dis* 1982;145:815-21

170. D HJ. In: Am. Soc. Microbiol. Biofilm 2000 Conf., 2000
171. Domingue GJ, Sr., Hellstrom WJ. Prostatitis. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:604-13
172. Nickel JC, Costerton JW, McLean RJ and Olson M. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 1994;33 Suppl A:31-41
173. Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate* 1993;23:107-14
174. Nickel JC, Costerton JW. Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis. *J Urol* 1992;147:398-400; discussion 400-1
175. Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 1993;341:1065-9
176. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:191-206
177. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996;60:539-74
178. Lam J, Chan R, Lam K and Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1980;28:546-56
179. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 1999;145 ( Pt 6):1349-57
180. Jensen ET, Kharazmi A, Lam K, Costerton JW and Hoiby N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect Immun* 1990;58:2383-5
181. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA and Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun* 1983;42:510-5
182. D MP. Dental plaque. In: Costerton HML-SaJW, ed. *Microbial Biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995:282-300
183. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993;175:3247-52
184. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1244-63
185. L S. Etiology of periodontal disease. In: Stallard RCCaRE, ed. *A textbook of preventive dentistry*. Philadelphia: W B Saunders, 1977:74-80

186. Jones HC, Roth IL and Sanders WM, 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 1969;99:316-25
187. J SD. *Biofouling* 1996;94:293-305
188. E B. Valvular heart disease. In: E B, ed. *Heart disease*. 5th ed. Vol. 2. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1997:1007-66
189. Anwar H, Strap JL, Chen K and Costerton JW. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1208-14
190. Jabra-Rizk MA, Falkler WA and Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 2004;10:14-9
191. Berger M, Gallerstein PE, Benhuri P, Balla R and Goldberg E. Evaluation of aortic valve endocarditis by two-dimensional echocardiography. *Chest* 1981;80:61-7
192. Blenkinsopp SA, Khoury AE and Costerton JW. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:3770-3
193. Aufwerber E, Ringertz S and Ransjo U. Routine semiquantitative cultures and central venous catheter-related bacteremia. *Apmis* 1991;99:627-30
194. L B. Is slime the virulence factor in staphylococcal biomaterial-associated infections. *Microecology Therapy* 1995;25:103-107
195. Switalski LM, Speziale P and Hook M. Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *J Biol Chem* 1989;264:21080-6
196. Patti JM, Jonsson H, Guss B, et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol Chem* 1992;267:4766-72
197. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun* 1994;62:152-61
198. Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P and Hook M. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol Microbiol* 1993;7:99-107
199. Gillaspay AF, Patti JM, Pratt FL, Jr., Iandolo JJ and Smeltzer MS. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin-encoding gene (*cna*) is within a discrete genetic element. *Gene* 1997;196:239-48
200. Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L and Borsetti E. Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials* 1999;20:1945-9

201. Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 1998;351:893-8
202. Elliott TS, Moss HA, Tebbs SE, et al. Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:210-3
203. Raad, II, Sabbagh MF, Rand KH and Sherertz RJ. Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:13-20
204. G MD. Infections due to infusion therapy. In: Bennett JV BP, ed. *Hospital infections*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998:689-724
205. Maki DG, Martin WT. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion products. IV. Growth of microbial pathogens in fluids for intravenous infusions. *J Infect Dis* 1975;131:267-72
206. Anderson RL, Highsmith AK and Holland BW. Comparison of the standard pour plate procedure and the ATP and Limulus amoebocyte lysate procedures for the detection of microbial contamination in intravenous fluids. *J Clin Microbiol* 1986;23:465-8
207. Failla ML, Benedict CD and Weinberg ED. Bacterial and fungal growth in total parenteral nutrition solutions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1975;41:319-28
208. R D. Growing biofilms in intravenous fluids. In: *Biofilms, the good, the bad and the ugly*. Powys, 1999
209. Freeman R, Gould FK. Infection and intravenous catheters. *J Antimicrob Chemother* 1985;15:258
210. Darouiche RO, Raad, II, Heard SO, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. Catheter Study Group. *N Engl J Med* 1999;340:1-8
211. Maki DG. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. In: Bisno A. L. WFA, ed. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994:155-212
212. Illingworth BL, Tweden K, Schroeder RF and Cameron JD. In vivo efficacy of silver-coated (Silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, *Staphylococcus epidermidis*. *J Heart Valve Dis* 1998;7:524-30
213. Carrel T, Nguyen T, Kipfer B and Althaus U. Definitive cure of recurrent prosthetic endocarditis using silver-coated St. Jude Medical heart valves: a preliminary case report. *J Heart Valve Dis* 1998;7:531-3



214. W KA. Infections of prosthetic heart valves and vascular grafts. In: Bisno A. L. WFA, ed. Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994:213-49
215. W HE. Artificial valve disease. In: Schlant R C ARW, ed. The heart arteries and veins. New York: McGraw-Hill, 1994:1539-45
216. Brisset L, Vernet-Garnier V, Carquin J, Burde A, Flament JB and Choisy C. [In vivo and in vitro analysis of the ability of urinary catheter to microbial colonization]. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44:397-404
217. M TM. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. In: J DR, ed. *Methods in enzymology*. San Diego: Academic Press, 1999:558-66
218. RJC M. Biofilm associated urinary tract infections. In: Lappin-Scott HM, Costerton J. W., ed. *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995:261-73
219. Kaye D. Infections associated with foreign bodies in the urinary tract. In: Bisno A. L. WFA, ed. Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994:291-307
220. Stickler D, Hewett P. Activity of antiseptics against biofilms of mixed bacterial species growing on silicone surfaces. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:416-21
221. Pugach JL, DiTizio V, Mittelman MW, Bruce AW, DiCosmo F and Khoury AE. Antibiotic hydrogel coated Foley catheters for prevention of urinary tract infection in a rabbit model. *J Urol* 1999;162:883-7
222. G DJK. Contact lens and prosthesis infections. In: Jaeger WTaEA, ed. *Duane's foundations of clinical ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:1-30
223. Miller MJ, Ahearn DG. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata. *J Clin Microbiol* 1987;25:1392-7
224. Stapleton F, Dart J. *Pseudomonas* keratitis associated with biofilm formation on a disposable soft contact lens. *Br J Ophthalmol* 1995;79:864-5
225. F S. Bacterial adherence and glycocalyx formation on unworn hydrogel lenses. *J. Br. Contact Lens Assoc.* 1993;16:113-117
226. J CP. Infections of the female genital tract. In: Bisno A. L. WFA, ed. Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994:347-374
227. Lewis R. A review of bacteriological culture of removed intrauterine contraceptive devices. *Br J Fam Plann* 1998;24:95-7

228. Wolf AS, Krieger D. Bacterial colonization of intrauterine devices (IUDs). *Arch Gynecol* 1986;239:31-7
229. Marrie TJ, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of the surfaces of intrauterine contraceptive devices. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146:384-94
230. Bank HL, Williamson HO. Scanning electron microscopy of Dalkon Shield tails. *Fertil Steril* 1983;40:334-9
231. Jacques M, Olson ME and Costerton JW. Microbial colonization of tailed and tailless intrauterine contraceptive devices: influence of the mode of insertion in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:648-55
232. Tatum HJ, Schmidt FH, Phillips D, McCarty M and O'Leary WM. The Dalkon Shield controversy. Structural and bacteriological studies of IUD tails. *Jama* 1975;231:711-7
233. Christensen GD, Parisi JT, Bisno AL, Simpson WA and Beachey EH. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1983;18:258-69
234. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL and Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* 1982;37:318-26
235. Standarts TNCfCL. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests. Vol. M2-A8. Pennsylvania, 2003
236. Standarts TNCfCL. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol. M100-S13. Pennsylvania, 2003
237. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:939-41
238. Kotilainen P, Nikoskelainen J and Huovinen P. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococcal blood isolates with special reference to adherent, slime-producing *Staphylococcus epidermidis* strains. *Scand J Infect Dis* 1991;23:325-32
239. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH and Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:510-5
240. Distel JW, Hatton JF and Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93
241. Tunney MM, Gorman SP. Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use. *Biomaterials* 2002;23:4601-8

242. Sabbuba N, Hughes G and Stickler DJ. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. *BJU Int* 2002;89:55-60
243. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F and Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004;72:3658-63
244. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4538-45
245. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR and Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994;176:7335-44
246. Ike Y, Clewell DB, Segarra RA and Gilmore MS. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J Bacteriol* 1990;172:155-63
247. Ike Y, Hashimoto H and Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:1524-8
248. Chow JW, Thal LA, Perri MB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2474-7
249. Kreft B, Marre R, Schramm U and Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992;60:25-30
250. Olmsted SB, Dunny GM, Erlandsen SL and Wells CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1994;170:1549-56
251. Huycke MM, Gilmore MS. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv Exp Med Biol* 1997;418:781-4
252. Huycke MM, Joyce W and Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 1996;173:743-6
253. Guzman CA, Pruzzo C, LiPira G and Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun* 1989;57:1834-8
254. Huycke MM, Sahm DF and Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998;4:239-49

255. Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M and Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000;68:5218-24
256. Lowe AM, Lambert PA and Smith AW. Cloning of an Enterococcus faecalis endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 1995;63:703-6
257. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G and Gilmore MS. Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999;67:193-200
258. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS and Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis. *Infect Immun* 2004;72:6032-9
259. Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J and Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol* 2003;52:547-50
260. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:117-40
261. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998;43:338-48
262. Vaudaux P, Yasuda H, Velazco MI, et al. Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces. *J Biomater Appl* 1990;5:134-53
263. Aguilar B, Amorena B and Iturralde M. Effect of slime on adherence of Staphylococcus aureus isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol* 2001;78:183-91
264. Hatch RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:974-7
265. Amorena B, Gracia E, Monzon M, et al. Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:43-55
266. Chuard C, Vaudaux P, Waldvogel FA and Lew DP. Susceptibility of Staphylococcus aureus growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:625-32
267. Desai M, Buhler T, Weller PH and Brown MR. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of Burkholderia cepacia to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:153-60

268. Reid G, Habash M, Vachon D, Denstedt J, Riddell J and Beheshti M. Oral fluoroquinolone therapy results in drug adsorption on ureteral stents and prevention of biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:317-9; discussion 319-20
269. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R and Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *Jama* 1998;279:1537-41
270. Konig DP, Schierholz JM, Munnich U and Rutt J. Treatment of staphylococcal implant infection with rifampicin-ciprofloxacin in stable implants. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:297-9
271. Zavasky DM, Sande MA. Reconsideration of rifampin: a unique drug for a unique infection. *Jama* 1998;279:1575-7
272. Held TK, Adamczik C, Trautmann M and Cross AS. Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1093-6
273. Soboh F, Khoury AE, Zamboni AC, Davidson D and Mittelman MW. Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1281-6
274. Finch RG, Edwards R, Filik R and Wilcox MH. Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis: the effect of antibiotic on the adherence of coagulase-negative staphylococci to silicone rubber catheter material. *Perit Dial Int* 1989;9:103-5
275. Wilcox MH, Finch RG, Smith DG, Williams P and Denyer SP. Effects of carbon dioxide and sub-lethal levels of antibiotics on adherence of coagulase-negative staphylococci to polystyrene and silicone rubber. *J Antimicrob Chemother* 1991;27:577-87
276. Rupp ME, Hamer KE. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:155-61
277. Sandoe JA, Wytome J, West AP, Heritage J and Wilcox MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:767-70
278. Raad, II, Hanna HA, Boktour M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5046-50