



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

***P. aeruginosa* SUŞLARININ LİNEZOLİD
ORTAMINDA BİYOFİLM YAPISININ
İNCELENMESİ**

Ahmet KÖREMEZLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR, 2022



T.C.

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

***P. aeruginosa* SUŞLARININ LİNEZOLİD
ORTAMINDA BİYOFİLM YAPISININ
İNCELENMESİ**

Ahmet KÖREMEZLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERGİN KARİPTAŞ

Prof. Dr. BELGİN ERDEM

KIRŞEHİR, 2022

KABUL VE ONAY

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı yüksek lisans 181212006 numaralı öğrencimiz Ahmet KÖREMEZLİ tarafından hazırlanan “*P. aeruginosa* İzolatlarının Linezolid Ortamında Biyofilm Yapısının İncelenmesi” adlı tez çalışması 26.05.2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Moleküler Tıp Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

Üye

Prof. Dr. Ergin KARIPTAŞ

Üye

Prof. Dr. Belgin ERDEM

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Esin KIRAY

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Salih SARICAOĞLU

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Ahmet KÖREMEZLİ



TEŞEKKÜR

Bu çalışmada linezolidde dirençli olduğu bilinen klinik *P.aeruginosa* suşlarının linezolid ortamında biyofilm oluşturma durumu ve direnci incelenmiştir. Lisans dönemimden başlamak üzere, yüksek lisans eğitimim süresince desteğini sürekli olarak yanımda hissettiğim bilgi ve birikimlerini her fırsatta benimle paylaşan bugünlere gelmemde büyük emeği olan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ'a içtenlikle saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Bana bir anne şefkatiyle yaklaşıp bildiği her bilgiyi öğreten yaptığım çalışmalarda çok büyük emeği olan bilgi, birikim ve deneyimlerini benimle her fırsatta paylaşan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Belgin ERDEM'e içtenlikle saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerinden istifade ettiğim bana bilgileri ve birikimleriyle her fırsatta desteğini esirgemeyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Rektörü saygıdeğer hocam Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ'ye içtenlikle saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bugünlere gelmemde bana hep öncülük eden, bilgi ve birikimleriyle bana desteklerini esirgemeyen saygıdeğer büyüğüm Öğr. Gör. Mahmut Sami DOĞANCI'ya saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Klinik örneklerin toplanması aşamasında yardımını esirgemeyen Muhammet Fatih TORU'ya içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca hep desteğini aldığım, ilk öğretmenim olan ve yaptığım çalışmalarda beni her zaman destekleyen, manevi destekcim hem annem, hem babam Atike GÜNEŞ'e, her koşulda yanımda olan kardeşim Abdulkadir KÖREMEZLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2022

Ahmet KÖREMEZLİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ.....	VI
KISALTMA LİSTESİ.....	VI
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Biyofilmlerin Tanımı ve Tarihçesi	2
2.2. Biyofilmlerin Yapısı	3
2.3. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Durumları	3
2.4. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri	4
2.4.1. Savunma	4
2.4.2. Adezyon Ve Kolonizasyon	4
2.4.3. Yaşanılabilir Çevre Geliştirmek.....	5
2.4.4. Topluluk Oluşturmak	5
2.5. Bakteriyel Mikroorganizmalarda Biyofilm Oluşum Aşamaları	5
2.5.1. Dönüşümlü Tutunma.....	6
2.5.2. Geri Dönüşümsüz Tutunma	7
2.5.3. Koloni Oluşumu	7
2.5.4. Olgun Biyofilm Oluşumu.....	8
2.5.5. Biyofilm Hücrelerinde Kopma veya Ayrılma:.....	8
2.6. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturarak Kazandıkları Avantajlar	8
2.6.1. Çevresel Faktörlere Direnç	8
2.6.2. Besinlerin Depolanması ve Atıkların Uzaklaştırılması.....	8
2.6.3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma	9
2.6.4. Metabolik İş Birliği ve Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması.....	9
2.7. Biyofilm ve Hastalıklar.....	9
2.8. EPS (Ekstrasellüler Polimerik Substans)'nin Yapı ve Özellikleri.....	12
2.9. Bakteriyel Mikroorganizmaların Çoğunluğu Algılama ve Haberleşme Sistemleri (Quorum Sensing: QS).....	13

2.10. Biyofilmlerin Antimikrobik Ajanlara Karşı Direnci	15
2.11. Biyofilm Analiz Teknikleri.....	15
2.11.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi	15
2.11.2. Standart Cam Tüp Yöntemi	16
2.11.3. Modifiye Tüp Aderans Yöntemi (Christensen yöntemi).....	16
2.11.4. Mikroplak Yöntemi.....	16
2.12. Mikrobiyota Kültür Yöntemleri.....	17
2.12.1. Kolorimetrik Yöntemler.....	17
2.12.2. Mikroskopik Yöntemler	17
2.12.3. Moleküler Yöntemler	18
2.13. Pseudomonas Ailesi.....	19
2.13.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.13.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Tarihi:	19
2.13.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Morfolojisi ve Kültür Özellikleri:	19
2.13.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Epidemisi:.....	20
2.13.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri Ve Patogenezi:	20
2.13.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Biyofilm Oluşumu:	25
2.13.7. <i>P. aeruginosa</i> ve Çoğunluğu Algılama (QS):.....	26
2.13.8. <i>P. aeruginosa</i> ve Enfeksiyonları:	27
2.13.9. <i>P.aeruginosa</i> 'nın Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Mekanizması.....	28
2.13.10. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Tanı Ve Tedavisi:	30
2.14. Oksazolidinonlar (Linezolidler) :.....	30
3. Materyal Metot	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Klinik Örneklerin Toplanması	31
3.1.2. Kullanılan Standart Bakterilerin Temini	31
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	31
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Disklerinin Temin Edilmesi	32
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Linezolidin Temin Edilmesi.....	33
3.2. Metod	33
3.2.1. Klinik İzolatlarda Pigmentli ve Pigmentsiz İzolatların Belirlenmesi	33
3.2.2. Klinik İzolatlarda Proteinaz Testi	33
3.2.3. Klinik İzolatlarda Lipaz Testi	33

3.2.4. Klinik İzolatlarda Katalaz Testi	33
3.2.5. Klinik İzolatlarda Oksidaz Testi	34
3.2.6. Klinik İzolatlarda Motilite Testi.....	34
3.2.7. Klinik İzolatlarda Biyofilm Gelişiminin İncelenmesi.....	34
3.2.8. Klinik İzolatların Farklı Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi	36
3.2.9. Klinik İzolatların Linezolide Duyarlılıklarının (MİK) Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi.....	36
3.2.10. Linezolidin Klinik İzolatlarda Gelişen Biyofilm Oluşumuna Etkinliğinin Optik Dansite (OD) Ölçülerek Belirlenmesi.....	37
3.2.11. Klinik İzolatların Biyofilm İnhibitör Konsatrasyonunu Belirlenmesi (BİK)..	38
3.3. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR	39
4.1. Klinik İzolatların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları	39
4.2. Klinik İzolatlarda Pigment Oluşumu, Proteinaz ve Lipaz Aktiviteleri.....	42
4.3. Klinik İzolatların Biyofilm Test Sonuçları	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR.....	61
EKLER	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Biyofilm Oluşum aşamaları	6
Şekil 2: EPS Yapısı	13
Şekil 3: EPS İçinde Bakteriyel Oluşum	13
Şekil 4: <i>P. aeruginosa</i> 'nın Piyosiyanın Pigmenti	42
Şekil 5: İzolatların Proteaz Aktivitesi	42
Şekil 6: İzolatların Lipaz Aktivitesi	44
Şekil 7: Kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç	45
Şekil 8: Kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç	45
Şekil 9: Tüp yönteminde safranin boyar maddesi ile biyofilm testi	47
Şekil 10: Tüp yönteminde kristal viyole boyar maddesi ile biyofilm testi	48
Şekil 11: Mikroplate yöntemi ile biyofilm oluşumunun kristal viyole kullanılarak değerlendirilmesi	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Enfeksiyon ve Etken Mikroorganizmalar	10
Tablo 2: <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri	23
Tablo 3: Antibiyogram Testinde Kullanılan Antibiyotik Diskleri	39
Tablo 4: <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlı Suş Sayıları ve Yüzde Oranları [n(%)]	40
Tablo 5: <i>P. aeruginosa</i> için CLSI'nın Önerdiği Zon Çapı Değerleri(mm)	40
Tablo 6: <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Seçilen Antibiyotiklere Göre Duyarlılık Durumları. 40	
Tablo 7: İzolatlarda Pigment Oluşumu, Proteaz ve Lipaz Aktivitesi	43
Tablo 8: Farklı Metotlarda Uygulanan Biyofilm Testine Göre İzolatların Biyofilm Oluşturma Güçleri	46
Tablo 9: <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Derecesi Tablosu (%)	47
Tablo 10: Biyofilm Oluşumunun Mikroplate Yöntemi Kullanılarak Değerlendirilmesi ... 49	
Tablo 11: Kristal Viyole Kullanılarak Yapılan 24 Saatlik Biyofilm Absorbans Ölçümlerinin, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853'e göre Oranları (%)	49
Tablo 12: Linezolidin Sub MİK Dozlarında İzolatların Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	50
Tablo 13: Sub MİK Dozdaki Linezolidin (öncesi ve sonrasında) Biyofilm Oluşumuna Etkisi.....	50
Tablo 14: İzolatların MİK ve BİK Değerlerinin Karşılaştırılması	51
Tablo 15: MİK ve BİK Değerlerinin İstatistik Veri Tablosu	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

OD: Optik Dansite

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

BİK: Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon

EPS: Ekstrasellüler Polimerik Substans

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribo Nükleik Asit

QS: Quorum Sensing

AHL: Açıl Homoserin Lakton

QQ: Quorum Quenching

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CFU: Koloni Oluşturan Ünite

SEM: Taramalı Elektron Mikroskopu

TSB: Trypticase Soy Broth

TSA: Tryptic Soy Agar

CRA: Kongo Red Agar

TAB: Tributirin Agar

SMA: Skim Milk Agar

MHB: Müeller Hinton Buyyon

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

STY: Standart Tüp Yöntemi

%: Yüzde

mg: Miligram

L: Litre

PH: Asitlik-Bazlık Birimi

gr: Gram

°C: Santigrat Derece

µm: Mikrometre

µl: Mikrolitre

ml: Mililitre

nm: nanometre

R: Resistance

kDa: Kilodalton

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

DM: Diabetes Mellitüs

KF: Kistik Fibrozis

AIDS: Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu

ADP: Adenozin difosfat

Ca: Kalsiyum

IgG: İmmünoglobulin G

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

P. aeruginosa SUŞLARININ LİNEZOLİD ORTAMINDA BİYOFİLM YAPISININ İNCELENMESİ

Ahmet KÖREMEZLİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Belgin ERDEM

Bu çalışmanın amacı, *P. aeruginosa* izolatlarının dirençli oldukları linezolid ortamında biyofilm oluşturma yetenekleri ve derecesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzole edilen toplam 40 *P. aeruginosa*'nın çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Test sonucuna göre izolatlar kanamycin, oksasilin, teikoplanin, rifampisin, streptomisin ve linezolide dirençli bulunmuştur. Ancak, gentamisin (%97.5), amikasin (%87.5), sefaperazon/sulbaktam (%75) ve netilmisin (%57.5) duyarlı olduğu saptanmıştır. Kongo kırmızılı agar, kristal viyole ve safranin yöntemiyle yapılan biyofilm test sonuçlarına göre izolatların sırası ile %70, %75 ve %72.5'inde biyofilm oluşumu görülmüştür.

Sonuç olarak planktonik yapıdaki *P. aeruginosa* izolatlarına linezolid ile muamele edilmesi sonucu minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) 64 mg/L olarak saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının linezolidli ortamda biyofilm inhibitör konsantrasyonu (BİK) 128 mg/L belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan *P. aeruginosa*'lar planktonik formuna göre linezolide karşı daha dirençli hale gelmiştir. *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların antibiyotik tedavisindeki direnç mekanizmalarının daha detaylı incelenmesi gerekmektedir.

Günümüzde gelişmekte olan teknolojiyle birlikte *P. aeruginosa*'nın biyofilm yapısını ve direnç mekanizmasına etkili olabilecek yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gram negatif bakteriler, Linezolid, Antibiyotik direnci, Biyofilm

Sayfa Adedi: 76

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ, Prof. Dr. Belgin ERDEM



SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE BIOFILM STRUCTURE OF *P. aeruginosa* STRAINS IN LINEZOLID MEDIUM

Ahmet KÖREMEZLİ

Kırşehir Ahi Evran University

Institute of Health Sciences

Department of Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Belgin ERDEM

The aim of this study was to determine the biofilm formation abilities and degree of *P. aeruginosa* isolates in the resistant linezolid medium. The susceptibility of 40 isolated *P. aeruginosa* to various antibiotics was tested by the disk diffusion method. According to the test results, the isolates were resistant to kanamycin, oxacillin, teicoplanin, rifampicin, streptomycin, and linezolid. However, gentamicin (97.5%), amikacin (87.5%), cefoperazone/sulbactam (75%) and netilmicin (57.5%) were also found to be susceptible. According to the biofilm test results performed with congo red agar, crystal violet and the safranin method, biofilm formation was observed in 70%, 75%, and 72.5% of the isolates, respectively.

As a result, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of *P. aeruginosa* isolates in planktonic structure were determined as 64 mg/L after treatment with linezolid. Biofilm inhibitor concentration (BIC) of 128 mg/L was determined in the medium with linezolid

for *P. aeruginosa* isolates. Biofilm-forming *P. aeruginosa* have become more resistant to linezolid than the planktonic form. The mechanisms of resistance in antibiotic therapy of infections caused by *P. aeruginosa* need to be examined in more detail.

Today, with the developing technology, it is necessary to develop new antibacterial drugs that can affect the biofilm structure and resistance mechanism of *P. aeruginosa*.

Key Words: Gram negative bacteria, Linezolid, Antibiotic resistance, Biofilm

Number of Pages: 76

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ, Prof. Dr. Belgin ERDEM

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa; *Pseudomonadaceae* ailesine ait olmakla birlikte klinikte, doğada sık rastlanılan insan, hayvan ve bitkiler için oldukça fırsatçı bir patojen olan, spor ve kapsül oluşturmayan, çomakçık şeklinde, bir ucunda bir veya birkaç tane kirpik (flagella) bulundurabilen, oldukça hareketli, gram negatif boyanan, basil veya kokbasil morfolojisinde olabilen zorunlu aerob mikroorganizmadır.^{1,2}

P.aeruginosa'nın %10 oranında nozokomiyal enfeksiyonların nedeni olduğu bilinmektedir.³ Solunum yolu enfeksiyonları, implant enfeksiyonları, yanık ve yara enfeksiyonları başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarla ilişkili başlıca fırsatçı patojenlerden biridir.⁴ Bağışıklık sistemi zayıf veya baskılı organizmalarda hastalık gelişimi ve ölüm oranı artmaktadır.⁵ Antibakteriyel ajanların hastane ortamında yaygın kullanımı, toplumun bilinçsiz ilaç kullanımı beraberinde mikroorganizmanın antibakteriyel ajanlara dirençliliğini meydana getirmektedir.⁶ Antibakteriyel ajanlara dirençlilik ise bakteriyel mikroorganizmanın tedavisindeki güçlüğü beraberinde getirmektedir.⁷

Mikroorganizmaların yaşamlarına elverişli durumlarda biyofilm içerisinde üreyerek yaşam sürdükları ve biyofilm geliştirmiş mikroorganizma ile geliştirmemiş mikroorganizma arasında ise ayrımların olduğu belirlenmiştir.⁸ Bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm oluşturduğunda serbest hallerine göre daha üst düzey korunma durumuna geçerler. Biyofilm geliştiren mikroorganizma kendi yaşamını tehdit edebilecek tüm unsurlardan kendini sakınır. Bu bağlamda biyofilm oluşumunu gerçekleştirmiş bir mikroorganizma serbest yapıdaki durumuna göre daha korunaklıdır ve bu mikroorganizmanın yaşamdan koparılması oldukça güçtür.^{8,9}

Nozokomiyal nedenli enfeksiyonların %60'ından fazlasının mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilm yapısıyla ilişkili olduğu ve biyofilm yapısıyla ilişkili hastalıkların seyrini (şiddeti, görülme sıklığı, direnci) daha da ağırlaştırdığı bilinmektedir.¹⁰

P. aeruginosa kaynaklı hastalıkların tedavisinde; karbapenemler, tetrasiklinler, monobaktamlar, aminoglikozidler, sefalosporinler, kinolonlar, karboksipenisilinler, fosfomisin ve polimiksinler kullanılmaktadır.¹¹

Bu çalışmada, çeşitli polikliniklere başvuran yetişkin grubu hastaların rutin istenilen idrar örneklerinden izole edilen *P.aeruginosa*'ların dirençli olduğu bilinen linezolid ortamında oluşturdukları biyofilm derecelerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilmlerin Tanımı ve Tarihçesi

Biyofilm, ilk keşfinden itibaren çeşitli bilim adamları vasıtasıyla çeşitli tanımlamalarla anlatılmıştır. Biyofilm 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek'ın farklı maddeler üzerinde hayvana benzer oluşumlar keşfetmesiyle ortaya çıkmıştır. Antonie van Leeuwenhoek dişlerinin yüzeyinden örnekler almış ve bu örnekleri kendi keşfettiği mikroskopik alette tetkik etmiştir. Tetkik sonucu örneklerde yaşayan küçük yapıların olduğunu belirlemiş ve bu şekilde biyofilmin ilk keşfi gerçekleşmiştir.¹²

1970'li senelere gelindiğinde biyofilm ile ilgili gelişmelerde artmaya başlamıştır.⁸ 1970'li senelerde Costerton dere içinde bulunan bakteri popülasyonlarının tamamına yakınının bir yapıya yapışarak yaşamlarını devam ettirdiklerini açıklamıştır. 1978 yılında ise Costerton ve ark. bu mikroorganizma popülasyonlarını açıklamak için ilk kez "Biyofilm" terimini dile getirmişlerdir. Biyofilm ile ilgili gelişmeler bu mikroorganizma popülasyonlarının buldukları alandan faydalandıklarını işaret etmiştir.¹³

Mikroorganizmaların yaşamlarına elverişli durumlarda biyofilm içerisinde üreyerek yaşam sürdükları ve biyofilm geliştirmiş mikroorganizma ile geliştirmemiş mikroorganizma arasında ise ayrımların olduğu belirlenmiştir.⁸ Costerton ve ark. (1999) biyofilmleri bakteri hücrelerinin kendi geliştirmiş oldukları ve herhangi bir maddeye yapışmalarını sağlayan "Glikokaliks" olarak da adlandırılan polimer bir matriks olarak açıklamışlardır. Carpentier ve Cerf (1993) ise biyofilmleri; içinde mikroorganizmaların olduğu herhangi bir cisime tutunumunu gerçekleştirmiş polimerik matriks olarak açıklamıştır.

Biyofilmlerin günümüzde en güncel tanımı ise şöyledir; Mikroorganizmaların bir yüzeye, arabirime veya birbirlerine tutunmalarını sağlayan ve gelişim oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip oluşturabilen kendi oluşturdukları polimer yapıdaki matriks içerisinde gömülmüş olarak yaşayan mikroorganizmalar topluluğudur.^{12,14}

2.2. Biyofilmlerin Yapısı

Biyofilmler oluşturdukları matrikslerde hayatlarını devam ettirirler.¹⁵ Biyofilmlerin hayatlarını devam ettirdikleri matrikslerin yoğunluğu barındırdığı mikroorganizmaların tür ve cins sayısı ile orantılıdır.¹⁶ Biyofilmlerin hem geliştirip ayrıca hayatlarını devam ettirdikleri ekstrasellüler polimerik matriks oluşum biyofilmin özgül özelliğidir. Bu matriks oluşum yarı akışkan özelliğe sahip olup içerisinde barındırdığı mikroorganizmalar ise çoğunlukla immobildir.¹⁷

Biyofilm yapısı; %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır.¹⁴ Biyofilmler aynı mikroorganizmalardan oluşabileceği gibi farklı mikroorganizmalar bir araya gelerek biyofilm oluşturabilmektedirler. Heterojen yapıdaki biyofilmlerin içerisinde aynı türden bakteriler bir araya toplanıp yaşam sürmektedir. Yani aynı türler biyofilm içerisinde küçük koloniler oluşturur. Bu oluşan farklı türlerin kolonileri arasında su kanalları bulunmaktadır. Bu koloniler ihtiyaç duydukları besin, oksijen difüzyonu gibi temel ihtiyaçlarını bu su kanalları aracılığı ile gerçekleştirirler.¹⁶

Özetle biyofilm yapısı şöyle açıklanabilir; bakteriyel mikroorganizmaların kendilerinin oluşturmuş oldukları matriks yapı içerisinde bir türden bakteriyel koloniyi veya farklı türlerin oluşturduğu kolonileri barındıran, İnsan dolaşım sistemine benzer yapıda su kanalları sistemi ile yaşamları için gerekli gereksinimlerini karşılayan, bakteriyel organizmaların kendilerine özel oluşturduğu korunaklı yaşam alanıdır.

2.3. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Durumları

Bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm geliştirdiklerinde serbest hallerine göre daha korunaklı duruma gelirler. Biyofilmler mikroorganizmaların yaşamlarını tehdit eden unsurlardan (pH, ısı değişikliği, ısı, nem değişiklikleri, konağın immün sistem yanıtı, antibakteriyel ajanlar vb.) korunmalarını sağlarlar. Biyofilm oluşturmuş bir bakteriyel

mikroorganizmanın antibakteriyel ajanlar tarafından fagosite edilmesi serbest (planktonik) yaşam süren bir bakteriye göre daha zordur.^{8,9}

2.4. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri

Bu nedenler Savunma, Adezyon ve Kolonizasyon, Yaşanılabilir Çevre Geliştirmek ve Topluluk Oluşturmak olmak üzere 4 başlık altında açıklanabilir.

2.4.1. Savunma

Biyofilm yapısı fizyolojik salgılara, immün sistem yanıtlarına ve ekstrasellüler ortamdan gelebilecek olan tehdit unsurlarına karşı oldukça güçlü kalabilmektedir. Serbest yaşam süren bakterilere karşı; besin maddelerinin eksikliği, pH değişimleri, temizlik ürünleri, antibiyotik etkisi ve fagositoz olayı gibi durumlarda biyofilm gelişimi gösteren bakteriler serbest yaşam süren bakterilere göre daha dayanıklıdır.¹² Bu nedenle inatçı ve tekrar eden hastalıklara neden olan mikroorganizmalar buldukları yerde dış unsurlar tarafından gelebilecek olan herhangi stres faktörüne yanıt olarak biyofilm geliştirirler.¹⁸

2.4.2. Adezyon ve Kolonizasyon

Bakterilerin hayatlarını devam ettirebilmeleri ve çoğalabilmeleri için gerekli maddelerin buldukları ortamda olması gerekmektedir. Ortam şartları mikroorganizmaların hayatlarını devam ettirmelerine uygun olmayabilir. Uygun olmayan ortam şartlarına rağmen mikroorganizmalar hayatlarını devam ettirebilmek için biyofilm geliştirirler.¹⁶

Canlı organizmalar bakteriyel mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirebilmek için seçtikleri öncelikli yaşam alanlarıdır.¹³ Seçtikleri konakçı üzerinde sabit kalmak istedikleri alanda mikroorganizmalar kendi yüzey proteinleri ile konakçının ekstrasellüler matriks proteinlerine (fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi) tutunurlar. Bu bakteri yüzey etkileşimleri yüzeylerin birbirine tutunmasında oldukça değerlidir. Bu tutunma gerçekleşikten sonra bakteriyel mikroorganizmalar hem popülasyonlarını yeteri kadar genişletmek için üremeye başlarken hemde biyofilm oluşturma yeteneği bulunan bakteriler biyofilm oluşumunu gerçekleştirirler.^{16,19}

2.4.3. Yaşanılabilir Çevre Geliştirmek

Bakteriyel mikroorganizmaların tutunup hayat sürdükleri çevrede glikoz bulundurulması, EPS (hücre dışı polimerik madde) üretimini ve biyofilm oluşumunu büyük miktarda artırmıştır. Bulunduğu yüzeye tutunmuş bakteriyel mikroorganizmaların biyofilm geliştirmesi için gerekli genetik hücresel sinyaller ise karbon katabolitleri aracılığı ile gönderilir.^{20,21}

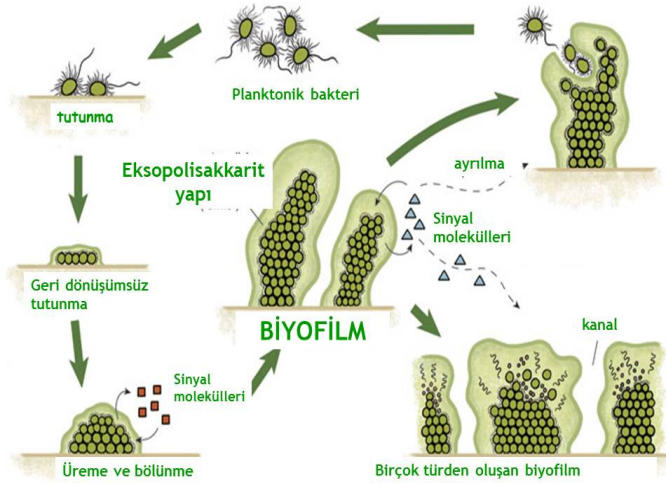
2.4.4. Topluluk Oluşturmak

Bakteriyel organizmaların yaşam sürdürdükleri çevreye adapte olması, biyofilm yapım kalitelerini artırmakta ve biyofilm geliştirmek için harcadıkları süreyi kısaltmaktadır. Biyofilm geliştirmiş bakterilerin çevresel tehdit unsurlarına ve uyarılara göstermiş oldukları tepkiler aynı olsada fenotipik olarak birbirlerinden farklı olmaları toplu yaşamı göstermektedir.¹⁶ Yani biyofilm oluşturma yeteneğine sahip farklı bakteriyel mikroorganizmalar aynı ortamda bir topluluk oluşturarak ve birbirleriyle ihtiyaçları doğrultusunda yardımlaşarak yaşarlar.

2.5. Bakteriyel Mikroorganizmalarda Biyofilm Oluşum Aşamaları

Bakteriyel mikroorganizmalarda biyofilm oluşum aşamaları beş şekilde açıklanmaktadır (Şekil 1).

- 1) Geri Dönüşümlü Tutunma
- 2) Dönüşümsüz Tutunma
- 3) Koloni Oluşumu
- 4) Olgun Biyofilm Oluşumu
- 5) Biyofilm Hücrelerinde Kopma ve Ayrılma



Şekil 1: Biyofilm oluşum aşamaları.²²

Bakteriyel mikroorganizmaların biyofilm gelişiminin başlaması gerekli yaşam şartlarıyla doğrudan bağlantılıdır. Ortamdaki besin maddeleri, gerekli pH düzeyi ve uygun sıcaklık gibi çevre faktörlerinin mevcudiyetine göre biyofilm gelişim aşamaları devam eder. Ancak gerekli koşullar oluşmazsa biyofilm oluşturan mikroorganizmalar yüzeylerden ayrılarak serbest yaşamlarına geri dönüş sağlarlar. Biyofilm gelişim adımlarından birincisi tutunma olayıdır. Ancak öncesinde mikroorganizmanın tutunum sağlayacağı yüzey uygun hale gelmelidir. Tutunma öncesi su içerisindeki partiküller, elementler, organik ve inorganik maddeler yüzeylere yapışıp ince bir film tabaka meydana getirirler. Bununla birlikte biyofilm oluşumu için hem yüzey hazır hale gelmiş olur hem de mikroorganizmaların tutunumu kolaylaşmış olur.²³

2.5.1. Geri Dönüşümlü Tutunma

Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmasıyla başlayan hareketli bir süreçtir. Tutunum sonucunda biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan genetik işlemler dizisi başlar. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunabilmeleri için yüzeye temasa geçtiklerini anlamaları gerekir. Bakteriyel mikroorganizmalar bu uyarıyı fenotipik farklılıklara dönüştürebilmek amacıyla, bir verici ve alıcıdan oluşan sisteme sahiptirler. Tutunmadan sonra biyofilm oluşumunun başlaması “Quorum Sensing” denilen diğer bir haberleşme sisteminden gelecek sinyallere bağlıdır. Bu sistem ile bakteriyel mikroorganizmalar bulunduğu ortamdaki bakteri yoğunluğunu tespit ederler. Bulunduğu yüzeye tutunan her bakteriyel mikroorganizma ortama sinyal moleküller göndererek adeta “ben buradayım” mesajı gönderir. Ortamda yüzeye tutunmuş bakterilerin miktarı

çoğaldıkça bölgesel sinyal yoğunluğuda çoğalacaktır. Sinyal molekül trafiğindeki artış sonrası biyofilm oluşumuna yönelik işlemler dizisi başlamış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler hücre içi düşük molekül ağırlığına sahip haberciler aracılığı ile iletişim sağlayarak biyofilm gelişiminde etkin rol oynarlar.¹² Bu aşamada EPS miktarı bakteriyel mikroorganizmalarda oldukça azdır. Biyofilm oluşumu tam gerçekleşmediğinden bağımsız hareket edebilirler.¹⁶ Bu aşamada yüzeyle bakteri arasında uzaktan kurulmuş zayıf elektriksel etkileşim olan Van der Waals bağları gibi etkileşimler mevcuttur.¹⁹

2.5.2. Geri Dönüşümsüz Tutunma

Bakteriyel mikroorganizmaların EPS gelişimi göstererek yüzeylere ayrılmayacak biçimde tutunumlarıdır.²⁵ Bu aşamada bakteriyel mikroorganizmalar yüzeyle elektrostatik etkileşimler kurar. Bu etkileşimler yüzeyle daha yakın mesafede gerçekleştirdikleri hidrofobik etkileşimler, dipol-dipol etkileşimi, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağları etkileşimleridir. Bu etkileşimlerle birlikte bakteriyel mikroorganizmalar yüzeylere geri dönüşümsüz tutunur. Yani ilk aşamadaki zayıf etkileşimin bakteriyel mikroorganizmaların EPS oluşturmasıyla ve elektrostatik etkileşimlerle, kurulan bağlarla birlikte kalıcı, dönüşümsüz bir tutunmanın oluştuğu sonucuna varılabilir. Bakteriyel mikroorganizmalar EPS oluşumuyla dönüşümsüz tutunum sağlayabilirken bir diğer geri dönüşümsüz tutunma yolu ise organelleri olan “flagella (kamçı) ve pili (kıl)” sayesinde olur. Yüzeye yapışan bakteriler gelişim sağlarlar ve mikrokoloniler meydana getirirler.¹⁶

2.5.3. Koloni Oluşumu

Yüzeylere kalıcı olarak yapışmış bakteriyel mikroorganizmalar EPS gelişimi gösterirler, gelişim sağlarlar. EPS oluşturmuş bakteriyel mikroorganizmalar serbest bakterilerin mikrokoloniye dahil edilmesini EPS yardımıyla kolaylıkla sağlarlar. Bir bakteri bir yüzeye koloni oluşturduktan sonra yani ilk koloni oluştuktan sonra aynı yüzey üzerinde birçok çeşitli bakteri koloni geliştirebilir yani diğer bakterilerde ikincil koloniyi geliştirebilirler. Oluşan mikrokolonilere serbest yaşayan bakterilerin katılım göstermesiyle birlikte koloni oluşumu meydana gelir. Ayrıca EPS çevresel stres faktörlerinden koloniyi korumasının yanı sıra yüzey ve alt birimleriyle de bağ oluşumunda kolaylık sağlar.^{16,23}

2.5.4. Olgun Biyofilm Oluşumu

Gelişen ve çoğalan mikrokoloniler büyük karmaşık farklı boyutlarda mantarimsı yapıyı andıran bir şekil alırlar. Bu mantarimsı yapılar ortamdaki metabolik atıkların atılması, besin maddesi, oksijen ihtiyacı gibi gereksinimlerini aralarında bulunan adeta dolaşım sistemi görevi yapan su kanalları sayesinde sağlarlar.^{26,27}

2.5.5. Biyofilm Hücrelerinde Kopma veya Ayrılma

Biyofilm hücrelerinin yüzeylerden koparak serbest yaşamlarına geri dönüşümüdür. Bu ayrılmanın nedeni iç ve dış nedenler olabilir yani dışta bir stres faktörü olabilir veya besin yetersizliği, enzimatik bozulma, yüzeye tutunumu sağlayan bağlayıcı proteinlerin açığa çıkışı gibi birçok neden olabilir. Biyofilmlerde kopma dış faktör etkili olabileceği gibi hücre veya birçok hücrenin ayrılmasıyla da olabilir.²⁸

2.6. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturarak Kazandıkları Avantajlar

Bakteriyel mikroorganizmaların herhangi bir yüzeyde sürekli kalabilmek için bir takım yöntemleri bulunmaktadır. Bakteri konakçı ile ilişkisinde bakterinin tutunmayı gerçekleştirecek hücresel proteinleri ile konakçının matriks proteinleri (fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi) arasında yapışma gerçekleşir. Bakteri ile yüzey proteinleri arasındaki bu uyumlu anlaşma bakteriyel mikroorganizmaların yapışmasında yüksek öneme sahiptir.²⁹ Yapışma sonrası bakteriler gelişir, üreme gösterir ve biyofilm oluşturma derecelerine göre biyofilm geliştirmeye başlarlar. Bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak birçok avantaj elde ederler.³⁰

2.6.1. Çevresel Faktörlere Direnç

Bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm gelişimi göstererek çevresel tehdit unsurlarından (nem, ısı, pH değişimi gibi) kaçınırlar. Bu unsurlar fiziksel güçlerde olabilir (Kan akımı, tükürüğün yıkama gücü vb.).³⁰

2.6.2. Besinlerin Depolanması ve Atıkların Uzaklaştırılması

Biyofilm gelişiminin temelinde yer alan mikrokolonilerin arasında tıpkı bir dolaşım sistemi görevi yapan aralarında besin, madde alışverişi ve metabolik artıkların uzaklaştırılması görevlerini yapan su kanalları sistemi bulunur.³⁰

2.6.3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma

Bakteriyel mikroorganizmaların koloni oluşturarak ve ekzopolisakkarit matriks geliştirerek yaşam sürmeleri fagosite edilmelerini ve vücut savunma elemanlarının kendilerine ulaşmalarını zorlaştırır. Ayrıca ekzopolisakkarit matriks yapı bakteriyel mikroorganizmaları elektrostatik etkilerden koruyarak antibakteriyel ajanların bakterileri fagosite etmesine engel olur. Biyofilm yapısına sahip bakteriler planktonik formda yaşam süren bakteriyel mikroorganizmalara göre stres faktörlerine ve antibiyotiklere, fagosite özelliği olan hücrelere ve vücut savunma elemanlarına karşı daha dayanıklı yapıdadırlar.¹⁴

2.6.4. Metabolik İş Birliği ve Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması

Bakteriyel mikroorganizmalar, buldukları ortama uyum sağlamak amacıyla biyofilm üretirler. Bu organizmalar biyofilm ürettikten sonra seri şekilde planktonik yaşamlarına dönüş yaparlar. Bunlar bakterilerin buldukları ortamlara ekprese etmiş oldukları genler vasıtasıyla gerçekleştirmektedirler. Biyofilm oluşturan bakterilerin çevresel uyarılara aynı reaksiyonları geliştirmeleri ortak yaşam sürdürdüklerinin önemli bir belirtisidir. Bakteriyel mikroorganizmalar aralarında gerçekleşen yatay (horizontal) gen aktarımları mikroorganizma topluluklarının genetik çeşitliliği açısından oldukça değerlidir.³¹ Bu olay çoklu ilaç dirençli bakteriyel mikroorganizmaların ortaya çıkışında oldukça önemlidir. Ayrıca biyofilm ortamında genetik materyal aktarımlarının kolaylıkla gerçekleşmesini sağlarlar.³²

2.7. Biyofilm ve Hastalıklar

Biyofilmler, uzun süredir endüstri alanında bir problem olarak bilinmekteydi. Son yıllarda tekrarlayan, inatçı enfeksiyonlarda yabancı cisim enfeksiyonlarında biyofilm yapısının oldukça fazla tespiti sonucu tıp alanındaki önemi ortaya çıkmıştır.¹² Aynı tür bakteriyel mikroorganizmada biyofilm geliştirmiş bakteri serbest yaşam süren bakteriye göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir.³³ Bu durum antibiyotik tedavisinden sonra enfeksiyonun tekrarlaması olasılığını yükseltmekte dolayısıyla biyofilm oluşturmuş bakteriyel mikroorganizmaların canlı konakçıdan dışa atılımının ne kadar güç olduğunu göstermektedir.¹² Biyofilm üretebilen mikroorganizmalar canlılarda akut veya kronik seyirli farklı enfeksiyonlar geliştirebilmektedir.¹⁶

Biyofilm oluşturan bakteriyel mikroorganizmalarla Tablo 1’de bahsedilen hastalıklar ve enfeksiyonlar arasındaki epidemik ilişki netlik kazanmıştır. Bu bağlamda bazı önemli mekanizmalar saptanmıştır.

Tablo 1: Enfeksiyon ve Etken Mikroorganizmalar.^{23,34}

Enfeksiyon	Etken Mikroorganizma
Diş Çürüğü, Diş Enfeksiyonları	Asidojenik gram- pozitif koklar (<i>Streptococcus sanguis</i> vb.)
Periodontitis	Gram- negatif anaerobik oral bakteriler(<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Actinobacillus spp.</i>), <i>Candida albicans</i>
İnatçı Enfeksiyonlar	
Otitis Media	Tiplendirilemeyen <i>Haemophilus Influenzae</i>
Kas-İskelet Enfeksiyonları	Gram-pozitif koklar örn: Stafilokoklar
Safra yolu enfeksiyonları	Enterik bakteriler örn: <i>Escherichia coli</i> vb.
Kemik Enfeksiyonu(Osteomyelit)	Çeşitli bakteriyel ve fungal mikroorganizmalar genelde karışık olarak.
Nefrolitiazis	Gram-negatif basiller
Kronik Tonsillit	Çeşitli Anaerop ve Aerop bakteriler
Kistik fibrozis pnömonisi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis (Ruam)	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Bakteriyel Prostatit	<i>E.coli</i> ve diğer gram-negatif bakteriler
Nekrozitan fasiit	A grup streptokoklar
Gastrointestinal ve bilier traktus	<i>E.coli</i> gb. Enterit Bakteriler
İmplant Kaynaklı Enfeksiyonlar	
Yapay kalp kapakçığı (endokarditis, septisemi)	Koagülaz negatif stafilokoklar, <i>Staphylococcus aureus</i> , enterokoklar
Kontakt lensler (keratitis)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (gram pozitif koklar)
Üriner kateter enfeksiyonları (bakteriüri)	<i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Candida spp.</i>
İntravasküler kateterler (septisemi, endokarditis)	<i>S.epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Gram-negatif bakteriler.
Merkezi venöz kateterler (septisemi)	<i>S.epidermidis</i> ve diğerleri (koagülaz- negatif <i>Staphylococcus spp.</i>), <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Hickman kateterleri (kontaminasyon, borularda tıkanma)	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>
ICU (yoğun bakım) pnömoni	Gram negatif basiller

Tablo 1 (devam)

Enfeksiyon	Etken Mikroorganizma
Kırık, çıkıklarda yerleştirilen platin vb. ortopedik aletler (septisemi)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , Peptokoklar, Streptokoklar, Gram-negatif bakteriler, <i>Propionibacterium acnes</i>
Endotrakeal tüpler (pnömoni)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , geniş bir bakteri ve fungus çeşitliliği
Yapay ses telleri	<i>Streptococcus</i> spp. , <i>Staphylococcus</i> spp. , <i>Candida</i> spp.
Periton diyaliz kateterleri	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , diğer Gram-negatif bakteriler
Meme implantları	<i>Stafilokoklar</i> , <i>E. coli</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp. , <i>Clostridium perfringens</i>
Penis protezleri	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.aureus</i>

Hücrelerin Kopması veya Hücre Toplulukları

Biyofilmin olgunlaşması veya çevresel streslerin baskısı biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmaları kopartabilir hatta biyofilm yapısının regülasyonunu sağlayan açıl homoserin lakton molekülü biyofilm oluşumunda rol oynadığı gibi bakteri tutunumunu bozarak bakterilerin ayrılmasına ve dolaşım sisteminde hastalık gelişimine sebebiyet verebilir.¹²

Endotoksin Üretimi

Biyofilm oluşturabilen gram-negatif bakteriler endotoksin üretim düzeyini çoğaltıp enfekte olmuş hasta bireyin immün yanıt düzeyini artırır. Oluşan immün yanıtın büyüklüğü enfeksiyonun kuvvetliliğini etkiler.^{21,32}

Konağın İmmün Yanıtına Direnç

Biyofilm yapısına konağın immün sistem elemanlarının verdiği yanıtın yeterli olmadığı belirlenmiştir. Biyofilm konağın immün sistemine karşı dirençlidir.¹²

Bakterilere Direnç Aktarımı

Bakteriyel mikroorganizmaların sahip olduğu direnç genlerinin, plazmidlerin biyofilm yapılarına konjugasyonu ile farklı tür bakteriyel mikroorganizmalara geçebildiği açıklanmaktadır.^{35,36}

2.8. EPS (Ekstrasellüler Polimerik Substans)'nin Yapısı ve Özellikleri

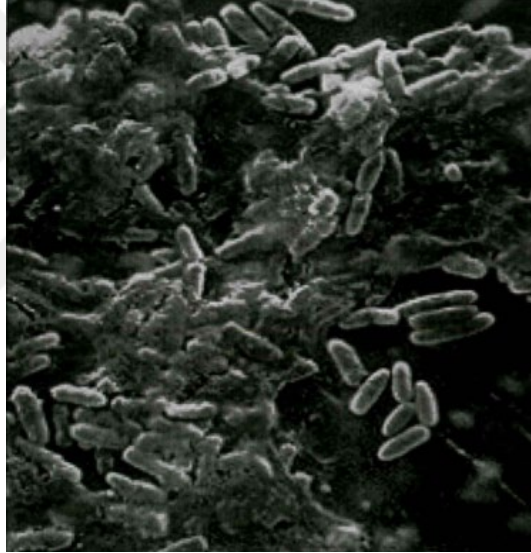
Bakteriyel mikroorganizmaların oluşturduğu EPS sonrasında ekstrasellüler ortama sentezi gerçekleşen polisakkarit yapıda oluşumdur.³⁷ Ekstrasellüler polimerik substans (**Şekil 2**), mikroorganizmaların bulunduğu ortamla iletişimde de görevli mikrobik kökenli organik yapıda polimerdir. Hücre dışı polimerik maddeler, yapısal proteinler, lipit, polisakkaritler ve ekstrasellüler DNA (eDNA)'dan oluşur. EPS biyofilm oluşumunda hücreler arasında eşit dağılmamıştır. EPS'lerin birbirleriyle kaynaşması sonucu bakteriyel mikroorganizmaları içeren biyofilm matriksi meydana gelir.³⁸

EPS oranı; ortamdaki besin miktarı, biyofilm yaşı, mikroorganizma gelişimi için gerekli maddelerin yeterliliği ve mikroorganizmanın türü ile doğru orantılıdır. Bu bağlamda EPS biyofilm oluşumunun %40 ile %95'ini oluşturmaktadır.³⁹ Ekstrasellüler polimerik maddelerin büyük kısmı yineleyen oligosakkaritlerin bağlanmasıyla meydana gelmiş heteropolisakkarid yapıdayken bazı ekstrasellüler polimerik substanslar ise aynı cins glikoz moleküllerinden meydana gelmiş homopolisakkarid oluşumlardır. EPS'deki regülatör genlerin oluşumu kromozomal veya plazmit DNA kodlu olabilmektedir. Karmaşık yapıda seyreden EPS oluşumu hem pozitif hem negatif düzenleyiciler tarafından regüle edilir. EPS oluşumu çevresel streslerden ve uyarılardan etkilenir.

EPS bakteriyel mikroorganizmaları çevresel tehditlere ve oluşumlara karşı korur. Mikroorganizmaların yüzeylere yapışmasında görevlidir. Ortamı kuruluştan korur ve yabancı istenmeyen maddelerden arındırır. Yararlı ve ihtiyaç olan maddeleri de alır. Antibiyotik etkisine, fagositik ajanlara, toksik ajanlara karşı koruma görevi vardır. Bunların hepsi Şekil 3'deki gibi EPS oluşturmuş bakteriyel mikroorganizmaya, tutunum sağladığı yüzeye aidiyet duygusunu geliştirir ve fizyolojik olarak gelişimini sürdürmesinin sağlar.¹³



Şekil 2: EPS Yapısı.¹²



Şekil 3: EPS İçinde Bakteriyel Oluşum.¹²

2.9. Bakteriyal Mikroorganizmaların Çoğunluğu Algılama ve Haberleşme Sistemleri (Quorum Sensing: QS)

Gelişmiş canlı organizmalarda, insan vücudunda hücrelerin yanıtları sinyal molekülleri vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Tıpkı gelişmiş organizmalarda ki gibi mikroorganizmalarda yaşam aktivitelerini gerçekleştirirken sinyaller aracılığı ile gerçekleştirirler. QS, yada “çoğunluğu algılama” olarak da bilinen bu sistem ile mikroorganizmalar oluşturdukları sinyallerin miktarını algılayabilmekte ve yaşam sürdüğü bölgedeki başka mikroorganizmaların da yoğunluğunu anlayabilmektedir. Bu sinyal molekülleri sayesinde

toplu olarak gerçekleştirmeleri gereken bir olayı bir hücreden diğerine aktarabilmektedirler. QS sistemi sinyaller üretebilen ve ‘oto-indükleyici’ moleküllerden meydana gelen sistemdir.⁴⁰ QS mekanizması ile bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm gelişim sürecinin haberleşme kısmını organize ederler.⁴¹

Bakteriyel mikroorganizmalar buldukları ortama uyumunu gerçekleştirdikten sonra ortamdaki gelen uyarıları anlar ve cevap verir. Ortamdaki değişikliklere göre kendi metabolik faaliyetlerini de o değişimlere uygun hale getirir.⁴² Ortama gelen tüm bakteriyel mikroorganizmalar ‘ben buradayım’ mesajı veren sinyaller gönderirler. Ortamdaki bakteriyel mikroorganizma sayısı arttıkça sinyal yoğunluğuda artacaktır.⁴³ QS sistemi sayesinde sinyaller vasıtasıyla bakteriyel mikroorganizmalar belli bölgede topluluk oluşturup biyofilm gelişiminin temel yapısını meydana getirirler.⁴⁴

QS sinyal molekülleri bakteriyel mikroorganizmaların oluşturduğu toplulukta hastalık yapıcı etkenlerin gelişiminin regülasyonunda işlevseldirler.²³ QS (çoğunluğu algılayabilme) sisteminin bakteriyel mikroorganizmalarda aynı türler arası ve farklı türler arası olmak üzere iki farklı “oto-indükleyici” formu vardır. Gr (-) bakterilerde türe göre farklılık gösterir ve oto-indükleyici sinyal molekülleri AHL (N-açıl homoserin lakton) ve oligopeptidlerdir. Gr (+) bakterilerde genellikle oligopeptidler bu görevi üstlenir. Hem Gr (-) hem Gr (+) bakteriyel mikroorganizmalarda ise Al-2 (otoindükleyici-2) bu görevi yerine getirir.⁴³

QS sisteminin sinyal moleküllerinin, mikroorganizmalarda; gen ekspresyonlarının düzenlenmesi, biyofilm oluşumu, bakteriyel mikroorganizmaların hastalık etkenlerinin üretiminin kontrolü, antibiyotiklere direnç gelişimi, ortam adaptasyonu, yeterli çoğunluğa ulaşılabilme gibi birçok görevi vardır.⁴⁰

Quorum sensing sisteminin özü mikrobik mikroorganizmaların çoğunluğu algılama sisteminin nasıl çalıştığını anlayabilmektir. Bu sistemin çalışmasının baskılanması veya bozunumu ile birlikte mikrobik mikroorganizmaların kontrolü sağlanabilir. Bu bağlamda mikroorganizma hücrelerinin haberleşme sinyallerinin baskılanmasıyla ilgili sistem ise “Quorum Quenching” (QQ) olarak isimlendirilmektedir.^{45,46}

2.10. Biyofilmlerin Antimikrobik Ajanlara Karşı Direnci

Bakteriyel mikroorganizmalar biyofilm oluşturdıklarında antibiyotiklere, biyositlere, dezenfektanlara, antimikrobik ajanlara ve çevresel hertürlü stres faktörüne karşı planktonik formda yaşam süren bakteriyel mikroorganizmalara karşı anlamlı bir farkla daha dirençli olmaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar bu çoklu direnç mekanizmasıyla birlikte biyofilmin matriks yapısının geçişleri zorlaştırması, antimikrobiyal ajanların biyofilm yapısının tamamına penetrasyonuna ve derinlere etki etmesine engel olmuştur.^{12,21} Biyofilmin matriks yapısı antimikrobiyal ajanların difüzyon gücünü azaltarak yavaşlatır. Bu durumda antimikrobiyal ajanların tam nüfuzu gerçekleşmez ve antimikrobiyal ajanların etkinliği kısıtlanmış olup biyofilm kendini korumuş olur.⁴⁷

Biyofilm içerisinde yaşam süren bakteriyel mikroorganizmaların planktonik formlarına göre daha yavaş gelişim gösterdiği anlaşılmış olup yani bir kısım mikroorganizma yaşam için gerekli maddelerden yoksun bir şekilde hayatını devam ettirmektedir. Bu yaşam için gerekli maddelerden yoksun yaşam süren mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanların etkisine duyarsız olup yaşamlarına devam etmektedirler.^{12,21}

2.11. Biyofilm Analiz Teknikleri

Son yıllarda enfeksiyon gelişiminde biyofilmlere rastlanmanın artış göstermesiyle birlikte; biyofilm oluşumunun önlenmesi, biyofilm direnç mekanizmasının açıklanması, biyofilm gelişimine uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için biyofilm çalışmaları artış ve gelişim göstermeye başlamıştır. Teknolojik gelişimlerinde sağladığı kolaylıkla birlikte çeşitli biyofilm tespit metotları kullanılmaktadır.⁴⁸

2.11.1. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi

Biyofilm üretim özelliğine bakılacak mikroorganizma içinde belirli miktarda sükröz, beyin kalp infüzyon buyyonu, Kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerine tek koloni ekimi gerçekleştirilir. 37°C de 24 saatlik kuluçka süresi sonrasında kolonilerdeki renk değişiklikleri ölçü alınarak sonuca varılır. Siyah koyu kırmızı renkte koloni oluşturan suşlar biyofilm üretimi açısından pozitif, pembe kırmızı renkli koloni oluşturan suşlar ise negatif suşlar olarak kabul görürler.^{48,49,50}

2.11.2. Standart Cam Tüp Yöntemi

İçinde TSB (Triptik Soy Buyyon) besiyeri bulunan cam tüplere mikroorganizma ekimi sonrasında tüpler 24 ile 48 saat aralığında kuluçkaya bırakılır. Kuluçka sonucunda tüp içeriği tahliye edilip tüplere metilen mavisi ilave edilir. Bir süre sonra tüp içeriği tekrar tahliye edilir tüplerin iç yüzeylerinin kontrolü sağlandığında eğer boyalı bir oluşum varsa mikroorganizma biyofilm üretimi açısından olumlu kabul edilir.⁴⁸

2.11.3. Modifiye Tüp Aderans Yöntemi (Christensen yöntemi)

İçerisinde glikozda bulunduran triptik soy buyyonlu besiyeri bulunan tüplere mikroorganizmaların ekimi yapılır ve 24 ile 48 saat aralığında kuluçkaya bırakılır. Sonra tüplerin içerisi tahliye edilir. PBS (fosfatla tamponlanmış salin) ile yıkanır. Tüplere aynı miktarlarda “trypan blue”safranin veya kristal viyole eklenip beklenir. Belirli bir süre geçtiğinde tüpler tekrar tahliye edilir. Daha sonra tüplerin ters pozisyonda kurumması beklenir. Tüplerin iç yüzeyinde renkli bir oluşum varsa biyofilm oluşumu olumlu demektir. Renk koyuluğuda mikroorganizmanın biyofilm oluşturma derecesini belli etmektedir.^{48,51}

2.11.4. Mikroplak Yöntemi

Mikroplak yöntemi biyofilm gelişiminin belirlenmesi çalışmalarında oldukça sık tercih edilen ve daha belirgin sonuçların alınabildiği bir yoldur. Daha derine inerek spektrofotometrik mikroplak yöntemi diğer yöntemle göre daha duyarlı, özgül daha nicel sonuçlar vermektedir. Bu yöntemde daha çok 96 kuyucuklu mikroplaklardan yararlanılır. Belirli hacimde (%1-3 glikoz içeren beyin kalp infüzyon buyyon veya TSB) içeren mikroplak kuyucuklara mikroorganizma ekimi gerçekleştirilir ve uygun koşullarda kuluçkaya bırakılır. Sonrasında mikroplaklar ters çevrilir ve kuyucuklar tahliye edilir. Kuyucuklar fosfatla tamponlanmış salin (PBS) veya türevi uygun bir sıvı ile arındırıldıktan sonra her kuyuya eşit olarak boya enjekte edilir. Boya için safranin veya trypan blue tercih edilebilir ancak en çok kristal viyole tercih edilmektedir. Kristal Viyole kuyucuklara eklenir ve biyofilm içerisine girmesi için biraz beklenir. Süre sonunda kuyucuklar tahliye edilip arındırılır. Bu bağlamda Kristal Viyole biyofilm üretimi yapan mikroorganizmaları belirleyecek geriye kalanlar yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırılacaktır. Yüzeve tutunum sağlamış mikroorganizmalara zarar vermemek adına yıkama titizlikle ve yavaş yapılmalıdır. Bu işlemden sonra oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kurutulduktan sonra mikroplaklar etanol, asetik asit, aseton gibi maddelerle etkileşime sokulur. Bu durumda

spektrofotometrik ölçüm yapan mikropalak okuyucu aletde belirli dalga boyu hesabı yapılarak her bir kuyucuk adına optik dansite miktarı belirlenir. Alet tarafından kaydedilen bu miktar kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite (yoğunluk) miktarıyla karşılaştırılıp biyofilm oluşumunun derecesi ve miktarı anlaşılabilir.^{48, 52, 53}

2.12. Mikrobiyota Kültür Yöntemleri

Mikroorganizma miktarının tespiti amacıyla kullanılır. Özünde besiyerlerinde üretilen kültürlerin yüzeylerde biyofilm üretmesi ve yüzeylere tutunum gerçekleştiren mikroorganizmaların miktarının koloni oluşturma birimi (CFU) olarak açıklanması vardır. Bu ölçümler biyofilmlerde üreyen mikroorganizma seviyesinin belirlenmesinde fayda sağlar. Biyofilmlerin incelenmesinde çeşitli metotlar uygulanmaktadır.⁵⁴

2.12.1. Kolorimetrik Yöntemler

Bu yöntem biyofilm geliştirebilen mikroorganizmaların boyayı penetrasyonunu esas alır. Bu yöntemle mikroorganizmalar belirli boyaarla boyanıp alkol etanol gibi maddelerle yüzey boyadan arındırıldıktan sonra spektrofotometre aletiyle ölçüm yapıp boyanın yayılımının miktarına bakılıp biyofilm oluşumundaki mikroorganizma miktarı belirlenebilir.⁵⁴

2.12.2. Mikroskopik Yöntemler

Farklı mikroskopların mikroorganizma ile ortam etkileşimini biyofilm gelişim süreci, biyofilm yapısı, biçimi, dağılışı ve canlılığının anlaşılması için kullanılır.⁵⁴

Işık Mikroskobu

Işık mikroskobuyla biyofilm yapısının ilk defa görüntülediği bilinmektedir. Hem laboratuvar ortamında hem canlılarda biyofilm gelişiminin incelenmesi için kullanılmaktadır. Ulaşılabilir olması, basit kullanıma sahip olması ve hızlı, doğru sonuçlar vermesi ışık mikroskobunun rahatlıkla kullanılabilir olmasını göstermektedir. Mikroorganizma araştırmalarında kullanılan bir yöntemdir.⁵⁵

Taramalı Elektron Mikroskobu

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) geliştirildiğinden itibaren biyofilm araştırmalarında geniş kullanım alanına sahip bir yöntemdir. Biyofilm gelişimi ve yapılarının incelenmesinde kullanılmakla birlikte yüksek çözünürlük özelliğı ile kazançlı kılsada numunelerin hazır hale gelişi süreci uzun sürdüğünden SEM'i dezavantajlı duruma getirmektedir.^{54,55}

Geçirimli Elektron Mikroskobu

Numune oluşumu zor uzun uğraşlar gerektiren bir metot olmasıyla birlikte görüntü kalitesi ve netliğı sayesinde biyofilm araştırmalarında bu yönleme başvurulmaktadır.⁵⁵

Epifloresans Mikroskobu

Biyofilm yapısındaki mikroorganizmaları, biyofilmlerdeki hücrelerin dağılımını pH ve kimyasal madde incelemesi yapılabilmektedir. Gelişmiş biyofilm yapısını görüntülemek için floresan boyanarak bu mikroskob ile görüntülenebilir.⁵⁴

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop

Bu mikroskop daha çok laboratuvar ortamında biyofilm çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılır. Diğere metotlardaki belli başlı olumsuzluklara bakıldığında bu metotla aksine daha kötü durumlarda bile biyofilm çalışılabilir. Bu metotla biyofilmlerin içerisinde mikrokolonilerin incelenmesi, mikroorganizmaların dağılımının incelenmesi, üç boyutlu yapı ve canlılık incelenebilmektedir.¹⁶

2.12.3. Moleküler Yöntemler

Biyofilm oluşumunu gerçekleştiren mikroorganizmaların genetik araştırmalarının ve incelemelerinin yapılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Biyofilm yapısına sahip olan mikroorganizmaların faaliyetlerini incelemeye sıkça başvuru olan bir metottur. Bu bağlamda ELİSA değerlendirmesi ve PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) bu yöntemlerden bazılarıdır.⁵⁴

2.13. Pseudomonas Ailesi

Pseudomonas cinsinin su ve toprak gibi nemli ortamlarda yaşamlarını sürdüren, gram negatif, non-fermentatif, aerobik özelliklere sahip türleri bulunmaktadır. *Pseudomonas* cinsinin insanlarda hastalık etkeni olan en sık rastalanan türü *Pseudomonas aeruginosa*dır. *P. aeruginosa* immünolojik açıdan zayıf organizmalarda oldukça fırsatçıdır.^{2,56}

2.13.1. Pseudomonas aeruginosa

2.13.2. P. aeruginosa'nın Tarihi

P. aeruginosa, 1850 yıllarında Sedillotun tanımı ile yara yerinde mavi ve yeşilimsi renk değişimi yapan mikroorganizma olarak ifade edilmiştir. Lucke ise 1862'de mavi, yeşilimsi renk oluşumlarına sebep olan piyosiyonini saptamıştır. 1882'de ise *Bacillus pyocyaneus* ardından *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Sonrasında Gessard 1882'de mikroorganizmayı saf kültür şeklinde izole etmesiyle birlikte 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1925'de ise Osler mikroorganizmanın fırsatçı patojen olduğunu tariflemişlerdir. 1926'da Dooren de Jong *Pseudomonasları* farklı organik yapıları, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına göre gruplandırmıştır. 1966'da ise Buchanon ve ark. *Pseudomonasları* fenotipik karakterlerine göre sınıflamışlardır. 1960'larda DNA hibriditasyon metoduyla genotip özelliklere göre gruplandırma yapılsada taksonomik heterojenitelerinden ötürü Palleroni 1984'de rRNA homolojilerine bakarak *Pseudomonasları* sınıflamıştır. 1990'da Migula yunanca anlamı yalancı olan "pseudos" ve anlamı birim olan "monas" sözcüklerinin harmanlamış ve *Pseudomonas* ismini vermiştir.⁵⁷

2.13.3. P. aeruginosa'nın Morfolojisi ve Kültür Özellikleri

Boyutu 1,5-3 µm civarı, eni 0,5-0,8 µm civarı olan *P. aeruginosa*, spor ve kapsül oluşturmayan çomakçık şeklinde bir ucunda bir veya birkaç tane kirpik (flagella) bulundurabilen, oldukça hareketli gram negatif boyanan basil veya kokbasil morfolojisinde olabilen mikroorganizmadır. *P. aeruginosa*, 5.6-8.0 civarı pH aralığında olmak üzere optimal 6.6-7.0 pH aralığında ve optimal 37 °C' de olmak üzere 21-42 °C' de üreyebilen zorunlu aerob bakteridir. Ortamdaki oksijenin yetersiz olduğu durumlarda ise ortamdaki yeterli nitrat varlığında, nitratı nitrite dönüştürerek oksijensiz ortamda da varlığını sürdürebilmektedir. Üremesi ve izole edilmesi basit olmakla birlikte izole edilebilmeleri

için gerekli inkübasyon süresi 24-48 saattir. Üreyebilmeleri için çok fazla ortam ayırt etmezler. Organik üreme etkenlerine gereksinim duymazlar. Çoğu suşlar kanlı agarda beta hemoliz yaparken, McConkey agarda ise mavi-yeşil koloni meydana getirirler. Çoğaldıkları ortamda, triptofan 2- aminoasetofenon nedeniyle aromatik meyve kokusu (üzüm benzeri) oluşması *P. aeruginosa*'nın spesifik özelliğidir.^{1,2,58}

2.13.4. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Epidemisi

P. aeruginosa, ekstrem ortam şartlarında, çoğu çevresel koşullarda, canlı, cansız yüzeylerde kolaylıkla çoğalıp yaşamını sürdürebildiği için toplum nedenli enfeksiyonlarda özellikle de hastane enfeksiyonlarında ciddi bir etkindir. İnsanlarda, hayvanlarda, su ve bitkilerde bulunabilir. Sulu, nemli ortamlardan hoşlanırlar. Kolaylıkla üreme ve yaşam için bu ortamları tercih ederler. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde, yanık vakalarında, yara yerlerinde, hastaların nemli (nazal, mukozal, aksillar, kulak, perinal vs.) bölümlerinde, kistik fibrozis hastalarının solunum yollarında oldukça oportünisttir. Ventilatörlerden, kateter uçlarından ve hastane ortamında bulunan birçok tıbbi malzemeden ve ortamda kullanılan malzemelerden basitçe izole edilebilmektedirler. *P. aeruginosa*, nedenli hastane enfeksiyonlarının daha çok; solunum cihazı kullanımına, bazı hastalıkların tedavisinde uzun süreli antibiyotik kullanımıyla birlikte bozulan GİS sistem florasına ve cerrahi operasyonlar nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlar da kaynağın ve prevelansın belirlemesi *P. aeruginosa* nedenli enfeksiyonların epidemiyolojik açıdan kontrol altında tutulması için önemlidir.⁵⁹

2.13.5. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri Ve Patogenezi

Virülans, herhangi bir mikroorganizmanın veya mikroorganizma topluluklarının konaktaki duyarlılığını ve patojenitesini tariflemektedir.⁶⁰ *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların konak hücrede meydana getirdiği değişikliklerin temelinde konak hücreye ve mikroorganizmaya özgü etmenler yer almaktadır. Virülans faktörlerinin ekspresyonu çoğalmanın başladığı, hücre dansitesinin arttığı logaritmik evrede artış göstermektedir. Virülans faktörlerinin ekspresyonu ve düzeni kaotik ve düzenleyici bir sistemle denetlenmektedir. Bu sistemde, düzenin sağlanmasında hücreler arası iletişimin payı oldukça büyüktür.⁶¹ Hücre yoğunluğu sebebiyle meydana gelen “çoğunluğu algılama (Quorum Sensing)” molekülleri virülans genlerinin denetim ve düzenlenmesinde oldukça etkin bir role sahiptir. Etiyolojisinde *P. aeruginosa* olan hastalıklar özellikle konak immün sisteminin yetersiz olduğu durumlarda meydana gelmekle birlikte, birçok virülans

etmenlerinin desteği ile farklı enfeksiyonlarda (septisemi, üriner enfeksiyonlar, akciğer enfeksiyonları, endokardit vs.) meydana getirirler. Bakteri ilk olarak konak immün sisteminin ilk bariyerini geçerek tutunur ve kolonize olur. Tutunduğu yüzeyde üreyip yeterli çoğunluğu oluşturmaya çalışır. Yeterli çoğunluk oluştuktan sonra bölgesel yayılım yani “lokal invazyon” gelişir. Bu bölümde mikroorganizma kontrol edilmezse yaygın sistemik enfeksiyon meydana gelir.⁵⁹

Adezyon Ve Kolonizasyon

P. aeruginosa konak hücre üzerinde birincil ve ikincil olmak üzere iki evrede tutunumunu gerçekleştirir. Birincil adezyonda mikroorganizma konak epiteline veya herhangi bir yüzeye geri dönüşümlü, kopabilir düzeyde tutunum sağlamakla birlikte birincil adezyonun oluşumunda bazı etmenlerde rol oynamaktadır. Bakteri ve hücre yüzeyinin hidrofobisitesi en etkili etmen olmasıyla birlikte, van der Waals kuvveti, hidrodinamik faktörlerde mikroorganizmanın hücre yüzeyine adezyonunda oldukça önemli etmenlerdir. Deri bütünlüğünün hasara uğradığı vakalarda, DM (Diabetes Mellitus), KF (Kistik Fibrozis), AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu) gibi konak savunma sisteminin baskın olduğu durumlarda mikroorganizma tutunumunu daha kolay gerçekleştirmektedir.

İkincil adezyon, özgül proteinler ve bu proteinlerin karşılıklı etkileşimleriyle meydana gelmektedir. Bakteri ligandlarının (pilus, fimbria, fimbriil gb.) konak epitelindeki almaçlara tutunumu sonucu gelişen geri dönüşümsüz tutunum evresidir. Elektron mikroskobuyla görüntülenebilen *P. aeruginosa* fimbriaları, mikroorganizmaların farklı yüzeylere ve birbirlerine adezyonunda, çoğalmalarında ve biyofilm geliştirmelerinde etkindir. Mikroorganizmaların meydana getirdiği belirli proteazlar konak epiteli üzerindeki fibronektin yapısını yıkılıma uğratarak adezin ve pilusların tutunabileceği almaçların boş hale gelmesini sağlarlar. İkincil tutunumun gerçekleşmesiyle birlikte mikroorganizma çoğalır ve konağın immün sistemine karşı virülans etmenlerinin ekspresyonunu artırır. Konağın savunma sisteminin mikroorganizmaya karşı etkisiz kalması sonucu mikroorganizma kolonizasyonunu oluşturur. Konağın savunma sisteminin baskılandığı ve mikroorganizmanın gerekli çoğunluğa ulaştığı evrede ise mikroorganizma “çoğunluğu algılama (QS)” moleküllerinin etkinliği ile sistemli biçimde çalışarak lokal invazyonu geliştirir. Lokal invazyon gelişimi ile birlikte konak immün sisteminde gerekli etkinliği sağlayamaması sonucu yaygın sistemik enfeksiyon gelişir.^{59,62,63}

Tablo 2’de gösterildiği gibi *P. aeruginosa* virülans faktörleri hücre yüzeyine ait ve ekstrasellüler virülans etmenleri olarak incelenebilir.⁶⁴

Hücre Yüzeyine Ait Virülans Faktörleri

Adezyon Faktörleri

Flagella (kirpik)

P. aeruginosa’nın hücre yüzeyine ait virülans faktörlerinden olan flagella mikroorganizmanın yüzme ve kayma hareketlerini sağlamaktadır. Flagella sitoplazma da sentezlenen flagellin proteinlerinden meydana gelmektedir. Konak epitelinin AsiolaGM1 zar bileşenine tutunarak adezyonda önemli yer tutar. Filagellin proteini *P. aeruginosa*’da *filC* geni aracılığıyla kodlanmaktadır. *P. aeruginosa* flagelleri sayesinde beslenme, korunma, hareket ihtiyaçlarını kolaylıkla sağlar ve konak hücreye translokasyon gerçekleştirir.⁶⁵

Fimbria (pili)

Fimbria sitoplazma zarından köken alır, çok sayıdadır, kısa, düz ve incedir. Fimbria; fimbrilin(pilin) denilen proteinlerden meydana gelmektedir. Fimbrialar “nörominidaz” enzimiyle birlikte mikroorganizmanın konak epiteline kolay bir biçimde tutunumunu gerçekleştirir.⁶⁵ *P. aeruginosa*’da tip IV fimbria bulunmaktadır. Bakteri “Seğirme” hareketinin tip IV fimbria aracılığı ile gerçekleştirmekte ve ilerlemektedir. Seğirme ile birlikte pilus uzayıp yüzeye yapışmakta sonrasında tekrar kısalarak mikroorganizmayı yapıştığı yüzeye getirmektedir. Tip IV fimbria biyofilm gelişiminde, tutunumunda ve kolonizasyonunda etkindir.⁵⁹

Aljinat

P. aeruginosa’nın ürettiği aljinat mannuronik ve glukuronik asitin yineleyen formlarından oluşan mukoid yapıda ekzopolisakkarittir. Aljinat mikroorganizmayı konak savunma sisteminin yanıtından, antibakteriyel ajanların etkisinden ve antibiyotiklerden korumaktadır.⁵⁶

Tablo 2: *P. aeruginosa*'nın Virülans Faktörleri

Hücre Yüzeyine ait Virülans Faktörleri	Hücre Dışı Virülans Faktörleri		
Adezyon Faktörleri	Enzim ve Proteazlar	Pigmentler	Toksinler
Flagella	Fosfolipaz C	Piyosiyenin	Endotoksin
Fimbria(pili)	Elastaz	Piyoverdin	Ekzotoksin A
Aljinat	Kollagenaz	α -oksifenazin	Ekzoenzim S
Lipopolisakkarit	Jelatinaz	Piyorubin	
	Alkalın Proteaz	Piyosin	
	Nötral Proteaz	Fluoresein	
	Lökosidin		
	Lesitinaz		
	Ramnolipid		

Lipopolisakkarit

P. aeruginosa'da dış membran bileşenlerinden olan LPS; Lipid A, merkez oligosakkarit ve O-polisakkarit bulunduran hidrofilik kuyruktan meydana gelmiştir. LPS konak immün yanıtından ve antibakteriyel ajanların etkisinden mikroorganizmayı kollamaktadır.⁶⁶

Hücre Dışı Virülans Faktörleri

Enzim Ve Proteazlar

Fosfolipaz C

Hemolitik ve nonhemolitik fosfolipaz c olmak üzere iki farklı türü vardır. Hemolitik fosfolipaz c, fosfatidil kolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Nonhemolitik fosfolipaz c ise fosfatidil kolin ve fosfatidil serini hidrolize eder. Fosfolipaz c ekstrasellüler ortama tip 2 salgı mekanizmasıyla taşınır. Pulmoner enfeksiyonlar da doku harabiyetinde ve bakterinin dokuya tutunumunda etkindir. Konak immün sisteminin nötrofil oksidatif cevabında baskılayabilmektedir.⁶⁷

Elastaz

Elastin; akciğerlerin şişip büzülmesinde etkin akciğer proteinlerindedir. Elastaz; *P. aeruginosa*'nın elastolitik aksiyonunu kazandıran elastin ve kollajenin yıkımını gerçekleştiren metalloproteinazdır. LasA (serin proteaz) ile LasB (çinko metallo proteaz)

birlikte enzimatik reaksiyon göstererek elastini yıkılıma uğrattılar. Elastaz ekstrasellüler ortama tip 2 salgı mekanizmasıyla gönderilerek yeni başlayan enfeksiyonlarda özellikle de pulmoner enfeksiyonlarda akciğer parankiminde harabiyete ve hemorojik lezyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca elastaz konak immün sisteminde harabiyetler geliştirerek serum α 1-proteinaz inhibitörünü yıkılıma uğrattırıp, nötrofil kemotaksisini ve etkinliğini baskılayarak başlangıç enfeksiyonların seyrini hızlandırmaktadır. IgG, fibrin, sürfektan proteinleri A ve D' yi yıkılıma uğrattır. Konak epitelinde ve doğal bariyerlerde harabiyetler yaparak mikroorganizmanın invazyonunu kolaylaştırır. İnterlökin-8 üretimini uyararak proinflamatuvar aksiyon göstermektedir.⁶⁵

Alkalin Proteaz

Alkalin Proteaz 49 kDa ağırlığında olup *apr* geni aracılığı ile kodlanmaktadır. Optimum alkali pH'da aksiyon göstermektedir. Pulmoner enfeksiyonların oluşturduğu harabiyetle birlikte alveollerde bulunan fibrinin alkali proteaz tarafından yıkılıma uğratılması pulmoner enfeksiyonun seyrinide olumsuz etkilemektedir.⁶⁸

Ramnlipid

Ramnlipid hemolitik özellik sergileyen yapısal olarak ramnoz ve yağ asidi içeren hemolizindir. Konağın pulmoner hücre yüzeylerindeki fosfolipidleri yıkılıma uğratarak fosfolipaz c'nin daha çok etkinlik göstermesini sağlamaktadır.⁶⁷

Pigmentler

Piyosiyenin

P. aeruginosa, tarafından üretilen piyosiyenin mavi renklidir ve kloroformda eriyebilmektedir. Birincil formu olan korizmik asitten sentez olur. Mavi rengi tanılamada spesifiktir. Yapılan çalışmalara göre, piyosiyenin hücresel solunumu baskıladığı siliyer işlevlerin etkinliğini kısıtladığı, epidermis üretimini baskıladığı ve Ca dengesizliği meydana getirdiği sonucuna varılmıştır. α 1-proteaz inhibitörünü baskılayarak proteaz-antiproteaz dengesini bozup pulmoner harabiyete neden olduğu bilinmektedir. Konağın immün sistem aksiyonunu bozar ve nötrofillerde apoptozisi uyandır.^{59,67}

Piyoverdin

P. aeruginosa üremesi için demire ihtiyaç duymaktadır. Piyoverdin siderofordur. Ortamdaki demiri mikroorganizmanın metabolizması için bağlar ve kullanımına sunar.^{59,67}

Toksinler

Ekzotoksin A ve Ekzoenzim S

Ekzotoksin A (ExoA), *P. aeruginosa*'nın salgıladığı hücre dışı bir toksindir ve infeksiyonların seyrinde etkindir. ExoA difteri toksinini andırmakta ve konak hücrelerinde Adenozin difosfat riboliz transferaz (ADP- riboliz transferaz) özelliği ile protein sentezi için gerekli EF-2 (elongasyon faktör-2)'yi baskılayarak protein sentezini engellemektedir. ExoA konak epitelinin harabiyeti ve mikroorganizmanın invazyonunda etkindir.⁶⁹

Ekzoenzim S (ExoS), hücre iskelet yapısını bozan adenozindifosfat ribozil transferaz aksiyonunu üstlenir. ExoS iki aktif bölgesi (c-terminal ADP-ribozil transferaz ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP)) olan bir toksindir. ExoS hücrel apoptozis için gereklidir.⁶⁹

2.13.6. *Pseudomonas aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, mikroorganizmaların bir ortama tutunum sağlayıp bir düzen ve sistem içerisinde yaşamlarını sürdürdükleri kaotik yapıdır.⁷⁰ *P. aeruginosa*, birçok ortam şartlarında yaşamını sürdürebilmekte ve biyofilm geliştirebilmektedir. Biyofilm yapısı "su kanalları" sistemine sahiptir. Bu sistem aracılığı ile yaşamını sürdürebilmek için gerekli temel ihtiyaçlarını sağladığı bilinmektedir.⁷¹ Nozokomiyal nedeni *P. aeruginosa*, infeksiyonlarının %60'ından fazlasının mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilm yapısıyla ilişkili olduğu ve biyofilm yapısıyla ilişkili infeksiyonların hastalıkların seyrini (şiddeti, görülme sıklığı, direnci) daha da ağırlaştırdığı bilinmektedir. *P. aeruginosa* kirpikleriyle yüzeylere tutunur ve biyofilmin ilk aşaması olan geri dönüşümlü tutunumu gerçekleştirir. Ayrıca ilk aşamada mikroorganizmanın alginat salgılamasında önemli yer tutmaktadır. Yüzeye tutunum gerçekleştikten sonra mikroorganizma yüzeyde üreyip koloniler geliştirir ve biyofilmin ikinci aşaması olan yüzeye geri dönüşümsüz tutunumu gerçekleştirir. Yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar twitching (seğirme) hareketiyle mikrokolonileri meydana getirir. Gelişen mikrokoloniler ise mantara benzeyen olgun biyofilm formunu oluşturur. *P.aeruginosa*'da twitching hareketi tip IV pili aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Tip IV pilinin mutasyona uğradığı durumlarda olgun biyofilm formunda mantarimsı yapı oluşmamaktadır. Olgun biyofilm geliştirmiş mikroorganizmalar antibiyotiklere ve antibakteriyellere karşı oldukça dayanıklıdır.^{56,72} Ayrıca *P. aeruginosa*'da ramnolipid gelişiminin, gelişmiş biyofilm yapılarının mantarimsı yapılara dönüşümünde etkinliği bilinmektedir. *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişimi için ise ramnolipid sentezinde görevli *rhlA* geninin etkinliğinin gerekli olduğu bilinmektedir. Enfekte olmuş bireylerde biyofilm gelişiminin sonuçlanabilmesi için QS sisteminin etkinliğide oldukça önemlidir. Pilus yapısında bulunan LecA (tip I lektin) ve LecB (tip II lektin) üretimi “quorum sensing” sistemi tarafından regüle edilmekle birlikte, LecA ve LecB yokluğunda olgunlaşmamış ince tabakada biyofilm gelişmektedir.⁵⁶

2.13.7. *P. aeruginosa* ve Çoğunluğu Algılama (QS)

P. aeruginosa'nın birçok virülens faktörü varolmakla birlikte, virülens faktörlerinin QS sistemi aracılığıyla denetlendiği bilinmektedir. *P. aeruginosa*'da ve birçok gram negatif bakterilerde QS sinyal molekülü AHL'dir. Ortamdaki mikroorganizma yoğunluğunun artması sebebiyle, ortamdaki AHL yoğunluğu artar ve hücre içi AHL yoğunluğunu optimal seviyeye ulaştır. Böylece transkripsiyonel regülatörler optimal etkinliğine sahip olur. QS mekanizması ve AHL sinyal molekülü mikroorganizmanın gen ekspresyonunun denetlenmesinde ve haberleşmenin sağlanmasıyla, birlikte hareket edebilmelerini sağlamaktadır.⁷³

Her bakteri farklı QS mekanizması kullanmakla beraber bazen bakteriler birbirinden farklı birkaç QS mekanizmasını birlikte kullanabilmektedirler. Aynı QS mekanizmalarını kullanmayan bakteriler birbirleriyle iletişim kuramamaktadır. QS Sinyal molekülleri “AHL”, “autoinducer peptitler” ve “autoinducer 2” molekülleri olarak gruplandırılabilir.

AHL sinyal sistemi, gram negatiflerde görülmekle birlikte ışık yayılımından (biyoluminesans) sorumlu gen kümesi LuxI/LuxR (LuxR, LuxI, LuxC, LuxD, LuxA, LuxB, LuxE) aracılığı ile denetlenmektedir. AHL sentezinde gerekli gen LuxI'dır. LuxR geni ise AHL transkripsiyonunu denetleyen bir düzenleyiciyi kodlamaktadır.^{56,74}

A1-2 (autoinducer-2) gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmaların LuxS geni aracılığı ile kodlanmaktadır. AIP (autoinducer peptit) gram pozitif mikroorganizmalar aracılığı ile üretilmektedir. Gram negatif mikroorganizma olan ve birçok hastalığın temelinde etken olan *P. aeruginosa*'nın birçok virülens etmenleri bulunmakla birlikte virülens etmenleri

QS sistemi aracılığı ile denetlenmekte ve regüle edilmektedir. *P. aeruginosa*'da QS sinyal molekülü Açıl Homoserin Lakton'dur. *P. aeruginosa*'da "Las" ve "Rhl" olmak üzere iki QS mekanizması bulunmaktadır. Las mekanizması, LasI sentez proteini ve LasR transkripsiyonel regülatör proteininden oluşur ve LasI açıl homoserin lakton sinyal moleküllerinden "N-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone" (3-O-C₁₂-HSL) yapımında etkindir. Rhl mekanizması Rhll ve RhIR proteinlerinden oluşur. Rhll açıl homoserin lakton sinyal moleküllerinden "N-butyryl-L-homoserine lactone" (C₄-HSL) yapımında etkindir. RhIR ise transkripsiyonel regülasyonda etkindir. QS mekanizması *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişiminde ve dinamiklerinde önemli yer tutmaktadır.⁵⁶

2.13.8. *P. aeruginosa* ve Enfeksiyonları

P. aeruginosa, özellikle immün sistemi baskılanmış ve hastane ortamında uzun süre vakit geçirmiş bireylerde olmak üzere vücudun farklı bölümlerinde farklı enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Mikroorganizmanın virülens etmenlerini salgılamasında, hastalıkların oluşumunda ve seyirinde QS sisteminin etkinliği göz ardı edilemez.⁶⁵

Bakteriyemi

P. aeruginosa, nedenli bakteriyemi diğer etken mikroorganizmalara göre daha patojenik olmakla birlikte ölüm oranı yaklaşık %50'lere kadar çıkmaktadır. Konak savunma sistemi yetersizliği ve diğer hastalıklar bakteriyemi riskini yükseltmekte ve bakteriyeminin patolojisinde nekrotik, gangrenöz oluşumlar meydana gelebilmektedir.⁶⁸

Endokardit

P. aeruginosa, madde (ilaç) kullananlarda doğal kalp kapakçığında diğer bireylerde prostetik kapakta tutunum gerçekleştirerek endokardit geliştirir. Diğer mikroorganizma kaynaklı hastalıklar, kronik hastalıklar, bazı invaziv girişimlerde endokardit meydana getirebilmektedir.^{65,68}

Göz Enfeksiyonları

P. aeruginosa, keratit, konjunktivit gibi göz enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler. Kontrakt lensler, ek hastalıklar, immün sistemin baskılanmış olması enfeksiyon gelişimini kolaylaştırır ve tutulumu hızlandırır. *P. aeruginosa*'nın salgıladığı virülans faktörlerinden

elastaz, alkali proteaz gibi hücre dışı enzimler enfeksiyon gelişme hızını ve şiddetini artırır.⁶⁸

Kulak Enfeksiyonları

P. aeruginosa, hafif seyirli enfeksiyonlara neden olabileceği gibi ileri yaş grubunda ve kronik hastalıkları olan bireylerde daha ağır klinik tablo ile seyredebilecek maling eksternal otit, nekrozitan otitis eksterna, otitis media gibi enfeksiyonlarda neden olabilir.⁶⁸

Solunum Sistemi Enfeksiyonları

P. aeruginosa, üst solunum yollarında geliştirdiği enfeksiyonların ilerlemesi durumunda özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde daha ağır klinik tablolar gelişebilmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların büyük kısmı ventilasyon ihtiyacı olan bireylerde ventilatöre bağlı gelişen bakteriyel pnömonilerdir. Kistik fibrozis hastalarında nedenin genellikle *P. aeruginosa* olduğu bilinmektedir.⁶⁵

Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner kateterizasyon veya üriner sistem cerrahi operasyonlarının postopunda gelişen *P. aeruginosa* kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarına ileri yaş grubunda daha sık rastlanılmaktadır.⁷⁵

Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

Sık aralıklarla antibakteriyel tedavi gören nötropenik bireylerde *P. aeruginosa*'nın gastrointestinal sistem enfeksiyonu geliştirmesi muhtemeldir. *P. aeruginosa*'nın virülans etmenlerinin konak gis epitelinde meydana getirdiği harabiyet sonrası mikroorganizmanın tutunumu ve çoğalımı artar. Bakteri genellikle çekum ve rektumda tutulum sağlamakla birlikte mikroorganizmanın venöz invazyonu sonrası ülserasyonlarda görülebilmektedir.^{65,76}

2.13.9. *P.aeruginosa*'nın Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Mekanizması

P. aeruginosa'nın antibiyotiklere direnç mekanizmasını doğal (intrensek) direnç ve edinilmiş direnç mekanizmalarıyla açıklanmaktadır.⁷⁷

Doğal direnç, mikroorganizmanın kendi özündeki yapısal işlevleriyle antibiyotik inhibisyonunu gerçekleştirmesini ifade etmektedir. *P. aeruginosa*'lar dış membran

geçirgenliğinin zorluğu, antibakteriyel ajanların intrasellüler ortamdan dışarı atan pompa sistemleri ve antibiyotiklerin inhibisyonunu sağlayan enzimlerinin varlığı ile birlikte mikroorganizmanın yapısal özelliği olarak, kullanılan antibakteriyel ajanın etki edeceği mekanizmayı buldurumaması nedeniyle mikroorganizmaya etki edememesi sonucu doğal direnç geliştirmektedirler.^{77,78,79}

Antibakteriyellere direnç gelişimine sebep sistemlerden olan ve regülatör genler ile denetlenen aktif dışa atım pompaları, regülatör genlerdeki mutasyonlar nedeniyle normalden fazla reaksiyon göstererek antibakteriyellerin dışa atılımına sebep olurlar. Bu mekanizma protein yapılı üç komponentten meydana gelmektedir. Bu komponentlerin sitoplazmik ve periplazmik proteinlerine “Mex” dış membran proteinine ise “Opr” denilmektedir. Periplazmik protein diğer iki komponent arasında adeta köprü vazifesi görmektedir.⁸⁰ *P. aeruginosa* dört büyük dışa atım pompa mekaniması “MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY OprM” olmak üzere antibakteriyel direnç gelişiminde etkin rol üstlenen on iki adet dışa atım pompası oluşturmaktadır.^{77,81} *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonlara yönelik kullanılan antibakteriyeller, hücre içindeki amacına ulaşabilmek için bakterinin dış membranını geçmek zorundadır.⁸² *P.aeruginosa*’larda antibakteriyel geçişini önlemek için selektif bariyer vazifesi gören dış zar porin kanalları, lipopolisakarit ve fosfolipid yapılarından oluşur.⁸³

İyon ve şeker geçişinde görevli olan ancak antibakteriyel geçirgenliği minimum olan oprF porini *P. aeruginosa*’lar da yüksek düzeyde bulunmakla birlikte OprF porininin varlığının bakterinin biyofilm gelişiminde pozitif reaksiyon göstermesinde etkin olduğu bilinmektedir.⁷⁷ Bakteriyel mikroorganizmaların, antibakteriyel ajanların inhibisyonunu sağlayan enzimatik yapılar üretmesi intrensik direnç sistemlerindedir.

Bakteriyel mikroorganizmaların genetik özelliklerinde veya regülatör genlerinde meydana gelen değişimler sonucunda bakteriye önceden etkin olan antibakteriyel ajan etkinliğini kaybedebilmektedir. Böylelikle kazanılmış bağışıklık meydana gelmektedir. Kazanılmış bağışıklıkla birlikte mikroorganizma, antibakteriyellere karşı direnç genleri elde edebilir ve antibakteriyellerin bakteri hücresinde etki edeceği bölgede değişimler meydana getirebilmektedir.⁸⁴

2.13.10. *P. aeruginosa*'nın Tanı Ve Tedavisi

P. aeruginosa'nın tanılanmasında kullanılacak numuneler cerrahi yara yerlerinden, vücut sıvılarından, sekresyonlardan vs. izole edilebilirler. İzolasyonu sağlamak için laboratuvar ortamında kanlı agar, McConkey agar kullanılabilir. Bakterinin oksidaz pozitif, nonfermentatif olması tanılamada kolaylık sağlamakla birlikte tatlı aromatik üzüme benzeyen kokuya sahiptir. *P. aeruginosa*, piyosiyanın salgılamasıyla mavi pigment, piyoverdin salgılamasıyla sarı-yeşil pigmentasyonu oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* nedeni hastalıkların tedavisinde penisilin, sefalosporin, karpanem, florokin, gentamisin, aminoglikozid ve kolitsin grubu antibiyotikler etkin olarak kullanılmakla birlikte amoksisilin, seftriakson, ampisilin grubu antibiyotiklere ise doğal dayanıklılığı vardır.⁷⁶

P. aeruginosa, etkenli hastalıkların tedavisinde genellikle üçüncü nesil sefalosporin grubu ile β -laktamlara dayanıklı olan seftazidim tercih edilmektedir. Tedavide tek tür antibiyotik tercihi mikroorganizmaya direnç kazandıracığı için bu direncin engellenmesi amacıyla daha çok ikili kombin antibiyotikler tercih edilmektedirler. Böylelikle antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin engellenmesi amaçlansada *P. aeruginosa*, çoğu antibiyotiğe karşı dayanıklı olduğu için kusursuz bir tedavisi henüz söz konusu değildir.^{85,86}

2.14. Oksazolidinonlar (Linezolidler)

Linezolid oksazolidinon antibiyotik grubunun birinci üyesidir. 2000 yılında, FDA'nın onay vermesi ile birlikte kullanımına başlanmıştır. Linezolid, rRNA'ya tutunarak hem 30S hem 50S subunitine bağlanıp protein sentezini erken aşamasında baskılayarak etkinlik gösteren sentetik bir antibiyotiktir. Linezolidin, dirençli gram pozitif bakterilere etkinliği olduğu bilinmektedir.⁸⁷ Gram negatif bakterilerde ise antibakteriyel direnç mekanizması olan dışa atım pompa sistemlerinin etkinliği sonucu linezolidin antibakteriyel etkisi baskılanmakta ve linezolide karşı direnç gelişmektedir.⁸⁸

3. Materyal Metot

3.1. Materyal

3.1.1. Klinik Örneklerin Toplanması

Çeşitli polikliniklerden toplanan 40 adet idrar kültürleri hastanenin merkez laboratuvarına getirilmiş ve örnekler önceden hazırlanmış kontaminasyon testi yapılmış Müller Hinton Buyyon bulunan besiyerine öze ile yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. *P. aeruginosa* olduğu düşünülen izolatlar bio-merieux marka vitek-2 de uygun kartlar ile çalışılmış ve *P. aeruginosa* oldukları belirlenmiştir. *P. aeruginosa* izolatları içerisinde 3'er ml %30 gliserol içeren ependorf tüplere besiyerlerinden ekim yapıp -20 °C' de arçelik marka buzdolabında stoklanmıştır. Çalışma yapılmak üzere laboratuvarımıza gelmeden önce oda sıcaklığında 3-5 dk beklendikten sonra canlandırmak için önceden hazırlanmış kontaminasyon testi yapılmış içerisinde MHB bulunan besiyerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış ve çalışma yapılmak üzere Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarına uygun şartlarda getirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Standart Bakterilerin Temini

Çalışmada, pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Tüm standart suşlar Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Besiyerlerinin tamamı üretici firmalarının tarifi üzerine hazırlanmıştır.

Triptic Soy Agar (TSA) Besiyerinin Hazırlanması

Triptic Soy Agar hazırlanırken 40 gr TSA'ya 1000 ml distile su eklenip çözdürülmüştür. 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Önceden pastör fırında 180 °C' de steril edilmiş cam petrilere eklenip 37 °C' de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

Trypticase Soy Broth (TSB) Besiyerinin Hazırlanması

Trypticase Soy Broth hazırlanırken 30 gr TSB'ye 1000 ml distile su eklenip çözdürülmüştür. Tüplere 4'er ml eklenerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. 37 °C'de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

Kongo Red Agar (CRA) Besiyerinin Hazırlanması

Kongo Red Agar hazırlanırken 37 gr kalp beyin infüzyonu, 15 gr agar agar, 50 gr sakkaroz, 0.8 gr Kongo kırmızısı eklendi 1000 ml distile su ile çözdürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. 37 °C de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

Tributyryn Agar (TAB) Besiyerinin Hazırlanması

Tributyryn Agar hazırlanırken 20 gr agar 1000 ml distile su ile çözdürülmüştür. 121 °C de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. 37 °C de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

Skim Milk Agar (SMA) Besiyerinin Hazırlanması

Skim Milk Agar hazırlanırken 20 gr agar 1000 ml distile su ile çözdürülmüştür. 121 °C de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. 37 °C de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

Mueller Hinton Buyyon (MHB) Besiyerinin Hazırlanması

Mueller Hinton Buyyon hazırlanırken 21 gr agar 1000 ml distile su ile çözdürülmüştür. 121 °C de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. 37 °C de 24-48 saat kontaminasyon kontrolü için etüve kaldırılmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotik Disklerinin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan klinik izolatlara antibiyogram testi için kullanılan antibiyotik diskleri Bioanalyse firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Linezolidin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan Linezolid 10 mg, CAYMAN CHEMICAL (Cayman Chemical 1180 East Ellsworth Road Ann Arbor, Michigan 48108 USA) temin edilmiştir. -20 °C’ de soğuk zincir olarak gelmiş ve -20 °C’de saklanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Klinik İzolatlarda Pigmentli ve Pigmentsiz İzolatların Belirlenmesi

40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB’de üreyen 24-48 saatlik taze kültürlerinden TSA besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 37 °C’ de 24- 48 saat inkübasyon sonrasında besiyerleri gözle incelenmiştir. Belirgin şekilde yeşil pigment oluşturmuş izolatlar pigmentli (+) oluşturmamış izolatlar pigmentsiz (-) kabul edilmiştir.⁶⁸

3.2.2. Klinik İzolatlarda Proteinaz Testi

40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB’de üreyen 24-48 saatlik taze kültürlerinden skim milk agar besiyerine her izolatdan birer öze dolusu ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında besiyerleri gözle incelenmiştir. İzolatların oluşturduğu zon miktarına göre 4+, 3+, 2+, +, - olarak proteinaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.⁶⁸

3.2.3. Klinik İzolatlarda Lipaz Testi

40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB’de üreyen 24-48 saatlik taze kültürlerinden tributyrin agar besiyerine her izolattan birer öze dolusu ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında besiyerleri gözle incelenmiştir. İzolatların oluşturduğu zon miktarına göre 4+, 3+, 2+, +, - olarak lipaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.

3.2.4. Klinik İzolatlarda Katalaz Testi

40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB’de üreyen 24-48 saatlik taze kültürlerinin her birinden birer öze alınarak, lam üzerine damlatılmış %3’lük H₂O₂ üzerine yayılmıştır. Her izolat için ayrı lam üzerinde test yapılmıştır. Tüm izolatlarda reaksiyon izlenmiştir. Tüm izolatlar Katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Klinik İzolatlarda Oksidaz Testi

Gram boyanma testinde negatif sonuç veren izolatların oksidaz aktivitelerine, oksidaz çubukları (Oxoid) ile bakılmıştır. İzolatların 24-48 saatlik saf kültürüne oksidaz çubuğu daldırılıp, 25-30 saniye beklenmiştir. Çubuğun eflatun mor renk alması (+) reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Test her izolat için ayrı tekrar edilmiştir. Tüm İzolatlar oksidaz pozitif gözlemlenmiştir.⁶⁵

3.2.6. Klinik İzolatlarda Motilite Testi

40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB'de üreyen 24-48 saatlik taze kültürlerinden bir öze dolusu lam üzerine konulmuştur, lamel kapatılmıştır ve karanlık ortam oluşturulmuştur. 40'lık obje ile izlenmiştir. Bu test 40 izolat için ayrı ayrı tekrar edilmiştir. Tüm izolatlar motilite pozitif olarak izlenmiştir.

3.2.7. Klinik İzolatlarda Biyofilm Gelişiminin İncelenmesi

Biyofilm gelişimi Christensen vd. (1985) tanımladıkları tüp yöntemi, mikroplate (96 kuyucuklu) ve Freeman ve ark. tanımladıkları CRA (Congo Red Agar) metodlarıyla incelenmiştir. Biyofilm oluşumunu incelerken Kongo Kırmızılı Agar (KKA), Standart Tüp Yöntemi (STY), ve 96 Kuyucuklu Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak 40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle biyofilm testi yapılmıştır. Test sonucunda 28'i (%70) biyofilm pozitif olarak tespit edilirken 12'si (%30) negatif olarak tespit edilmiştir.

Tüp yönteminde, kristal viyole boyar madde kullanılarak ve safranin boyar madde kullanılarak ayrı ayrı biyofilm testi yapılmıştır. Kristal viyole boyar madde kullanılarak yapılan biyofilm testi sonucunda izolatların 30'u (%75) biyofilm pozitif olarak tespit edilirken 10'u (%25) negatif olarak tespit edilmiştir. Safranin boyar madde kullanılarak yapılan yapılan biyofilm testinde ise izolatların 29'u (%72,5) pozitif olarak tespit edilirken, 11'i (%27,5) negatif olarak tespit edilmiştir. Yapılan testler sonucunda biyofilm pozitiflik oranı en çok kristal viyole kullanılarak yapılan tüp testinde olmuştur.

Yaptığımız biyofilm testleri sonucunda gözle değerlendirme yapılarak pozitif sonuç veren en iyi biyofilm oluşumu görülen 10 izolat seçilip bu izolatlarda mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm testi yapıp çalışmaya seçilen izolatlarla devam edilmiştir.

Klinik İzolatlarda Biyofilm Gelişiminin Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle Belirlenmesi

Hazırlanmış ve sterilizasyon testi yapılmış kongo kırmızılı agarlara, TSB'de üreyen 24-48 saatlik 40 adet klinik *P.aeruginosa* taze kültürlerinden ekim yapılmış ve biyofilm gelişimini test etmek için 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerleri tek tek gözle değerlendirilerek koyu kırmızı renk oluşturanlar (3+), kırmızı renk oluşturanlar (2+), pembe renk oluşturanlar (+), beyaz kalanlar (-) olarak değerlendirilmiştir.⁸⁹

Klinik İzolatlarda Biyofilm Gelişiminin Tüp Yöntemiyle Belirlenmesi

Biyofilm gelişiminin değerlendirilmesinde kullanılan (Christensen ve ark., 1985) tanımladığı tüp testi ile biyofilm gelişiminin incelenmesi metodunda bazı farklılıklar yapılarak biyofilm gelişimi incelenmiştir. Kristal viyole ve safranin ile ayrı iki test yapıp değerlendirilmiştir.⁵¹

TSA'da 24 saat 37 °C'de inkübe edilen izolatlar inkübasyon sonrası, hazırlanmış ve steril edilmiş, sterilizasyon testi yapılmış tüp içerisinde 2 ml TSB bulunan tüplere ekim yapıp 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüp içeriği boşaltılıp steril tamponlanmış PBS (fosfat tuzu) ile yıkanmıştır. Tüpler ters pozisyonda kuruma kağıdına bırakılıp kurutulduktan sonra %1'lik kristal viyole ile boyanıp 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında tüpler steril distile su ile yıkanıp tekrar kurutma kağıdına ters pozisyonda kurumaya bırakılmıştır. Tüp içerisindeki boyanma durumuna göre 3+ kuvvetli, 2+ orta seviyede, + zayıf, - negatif olmak üzere değerlendirilmiştir.⁵¹

Safranin ile boyanarak yapılan tüp testinde ise TSA'da 24 saat 37 °C'de inkübe edilen klinik izolatlar inkübasyon sonrasında, hazırlanmış ve steril edilmiştir, sterilizasyon testi yapılmış tüp içerisinde 2 ml TSB bulunan tüplere ekim yapıp 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüp içerikleri mikropipetlerle boşaltılıp boşaltılan tüplere 2 ml hacminde %0,25'lik safranin eklenmiştir.⁵¹

1 dakika boyanmaya bırakılıp sonrasında mikropipetler yardımıyla tüp içerikleri boşaltıldıktan sonra tüpler kurutma kağıdına ters pozisyonda bırakılıp 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonraki gün tüp içerisinde boyanma durumuna göre 3+ kuvvetli, 2+ orta seviyede, + zayıf, - negatif olmak üzere değerlendirilmiştir.⁵¹

Klinik İzolatlarda Biyofilm Gelişiminin Mikroplak Yöntemiyle Belirlenmesi

TSA'ya ekilmiş *P.aeruginosa* izolatlarının taze kültürlerinden 4'er ml TSB içeren tüplere alınarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürler 1/20 dilüe edilerek 200 µl'si 96 kuyucuklu mikroplate'de 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sıvı besiyerleri dökülüp kuyucuklar distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Kurutma kağıdında kurutulduktan sonra %1'lik kristal viyole solüsyonundan kuyucuklara 100 µl eklenmiştir. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdında ters pozisyonda kurutulmuştur. Kuyucuklara 200 µl etanol/aseton (40:10) eklenmiştir ve 10 dakika beklenip boya çözdürülmüştür. Plak dalga boyu 540 nm olan mikroplate okuyucuda (Mikroplate reader, BioTek ELx808) okutulmuştur. Sonuçlar biyofilm gelişimi görülmeyen *E.coli* ATCC 25922 ve biyofilm geliştiren *P.aeruginosa* ATCC 27853'den elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.^{12,90}

3.2.8. Klinik İzolatların Farklı Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Klinik *P.aeruginosa* izolatlarının TSB'de 24-48 saat inkübasyonu sonrası taze kültürlerinden steril swap ile TSA'ya sürülerek ekim yapılmıştır. Sonrasında önceden belirlenmiş 10 farklı antibiyotik diskleri numaralandırılarak her izolat için ayrı ayrı eklenmiştir. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası disklerin etrafında oluşmuş zonların ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9. Klinik İzolatların Linezolide Duyarlılıklarının (MİK) Standart Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan Linezolid Cayman'dan (Cayman Chemical 1180 East Ellsworth Road Ann Arbor, Michigan 48108 USA) satın alınmıştır. Linezolid, etanol ile 1 mg/ml olacak şekilde çözdürülerek TSB ile sulandırılarak 2560 mg/L stok konsantrasyonu hazırlanmıştır. Antibiyotik dilüsyonu hazırlanırken stok 1/20 oranında sulandırılarak 128 mg/L antibiyotik elde edilmiştir. Çalışmada 96 kuyucuklu mikroplate kullanılmıştır. Steril 96 kuyucuklu mikroplağın tüm kuyucuklarına TSB besiyerinden 100 µl eklenmiştir. Daha sonra 1.sütundaki kuyucukların ilk dördüne 128 mg/L linezolid içeren besiyerinden 100 µl eklenip seri dilüsyon yapılmıştır. 11. Sütuna kadar her sütunun ilk 4 kuyucuğuna Linezolid içeren besiyerinden 100 µl eklenip seri dilüsyona devam edilmiştir. 11. Sütun boş bırakılıp

12. Sütuna sadece TSB besiyeri üreme kontrolü için bırakılmıştır. Sütunların 5. Kuyucuğuna antibiyotik dilüsyonu yapılmayıp bir sonraki aşamada sadece bakteri dilüsyonu eklenilmesi planlanmıştır. 1. ve 2. Sütunun 6., 7., 8., kuyucukları pozitif kontrol ve negatif kontrol suşları için kullanılmıştır. 1. ve 2. Sütunun 6. Kuyucuklarından başlanarak 128 mg/L linezolid içeren besiyerinden 100 µl eklenip seri dilüsyonları yapılmıştır. 40 adet klinik *P.aeruginosa* izolatlarının içinden biyofilm geliştirme derecelerine göre seçilmiş 10 adet izolat ve pozitif kontrol için belirlenmiş *P.aeruginosa* ATCC 27853 ile negatif kontrol için belirlenmiş *E.coli* ATCC 25922' nin 24 saatlik taze kültürlerindeki kolonilerden 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır ve 1/100 oranında dilüe edilmiştir. Her sütuna farklı bir izolat gelecek şekilde önceden linezolid eklenmiş sütunların ilk 4 kuyucuğuna bakteri süspansiyonundan 11.kuyucuğa kadar 100 µl eklenmiştir. 11. Sütun boş bırakılmıştır 12. Sütunda sadece TSB besiyeri bırakılmıştır ve bakteri süspansiyonu eklenmemiştir. İlk 10 sütunun antibiyotik dilüsyonu eklenmemiş 5. Kuyucuklarına sütundaki bakteri izolatının aynısından antibiyotiksiz besiyerleri üzerine 100 µl eklenmiştir. İlk sütunun 6., 7., 8. Kuyucuğuna pozitif kontrol olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 süspansiyonundan 100 µl eklenmiştir. İkinci sütunun 6., 7., 8., kuyucuğuna negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 süspansiyonundan 100 µl eklenmiştir. Mikroplak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası göz ile ve dalga boyu 540 nm olan mikroplate okuyucuda (Mikroplate reader, BioTek ELx808) okutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre gözle değerlendirme yapıldığında *P.aeruginosa*'nın linezolide dirençli olduğu kuyucuklarda üremelerin olduğu görülmüştür. Üremenin en az olduğu antibiyotik konsantrasyonu mik olarak kabul edilmiştir. Mikroplate reader okuyucudan elde edilen sonuçlarda gözle görülen sonuçları desteklemiştir.^{12,90}

3.2.10. Linezolidin Klinik İzolatlarda Gelişen Biyofilm Oluşumuna Etkinliğinin Optik Dansite (OD) Ölçülerek Belirlenmesi

Taze TSA'da bir gece 37 °C'de üretilen izolatlar TSB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında ayarlanarak 1/100 dilüe edilmiştir. 200'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikroplağa aktarılmıştır ve bir gece önceden kuyucuklarda biyofilm geliştirilmiştir. Ertesi gün kuyucuklar 2 kez distile su ile yıkanarak kurutma kağıdın da kurutulmuştur. Biyofilm geliştirilen kuyucuklara klinik izolatlar için linezolidin farklı konsantrasyonları (128-16 mg/L) TSB içerisinde sulandırılarak 200 µl eklenmiştir. 37 °C' de 24 saat bekletilip plak

yıkanmıştır ve %1'lik kristal viyole ile boyanmıştır. Plağın OD'si mikropate reader de okutulmuştur.^{12,90}

3.2.11. Klinik İzolatların Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonunu Belirlenmesi (BİK)

Biyofilm geliştirme kapasitelerine göre seçilmiş 10 adet *P.aeruginosa* izolatu 24 saat 37 °C'de TSB besiyerinde biyofilm oluşturmaları için inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün TSB besiyeri ile 1/20 sulandırılarak 200'er µl 96 kuyucuklu mikroplağa eklenmiştir. Plaklardaki her bir kuyucuğa steril boncuk eklenmiştir. 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Başka bir mikroplağa taze hazırlanmış TSB içinde Linezolid 128 mg/L'lik konsantrasyondan başlatılarak seri dilüsyon yapılmıştır. Biyofilm oluşturan boncuklar linezolid dilüsyonu yapılan mikroplağın kuyucuklarına eklendikten sonra 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün kuyucuklardaki boncuklar 200'er µl TSB içeren ependorf tüplerine alınarak hızlı devirde 5 dk vortekslenmiştir. Bu işlem sonrası tüplerden 100'er µl alınarak yeni bir mikropakta içinde 100'er µl TSB bulunan kuyucuklara aktarılıp 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası gözle ve mikropate okuyucu ile değerlendirme sonrası üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon BİK olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak ekim yapılmamış TSB içeren kuyucuklar kullanılmıştır.^{12,90}

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında, Klinik *P. Aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Tabakası Üzerine Linezolidin Etkisinin Belirlenmesi (Optik Dansite Ölçülerek=OD) amacıyla antibiyotik öncesi ve sonrası (128, 64, 32, 16) gruplarının ortalamaları arasındaki farklılık eşleştirilmiş gruplar için t-testi ile incelenmiştir. MİK ve BİK değerlerini temsil eden gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olup olmadığı bağımsız gruplarda t-testi yöntemi ile ele alınmıştır. Analizlerde t-testlerini gerçekleştirmek üzere normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov ve ShapiroWilk testleri ile ele alınmıştır. Analizlerde yer alan bazı gruplarda normal dağılım koşulunu sağlamak üzere logaritmik transformasyonlar kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS (version 21.0, SPSS Inc, USA) istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde önemlilik düzeyi $p<0.05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik İzolatların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Çalışmada polikliniğe başvurmuş hastalardan istenen idrar örneklerinden izole edilen 40 *P. aeruginosa* izolatı kullanılmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları; çalışmaya alınan *P. aeruginosa* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre kanamisin, oksasilin, teikoplanin, rifampin, streptomisin ve linezolidde dirençli bulunmuştur. Gentamisine karşı ise %97.5 duyarlı %2.5 orta duyarlı bulunmuştur. Yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde amikasine %87.5, sefaperazon/sulbaktama %75, netilmisine %57.5 duyarlılık saptanmıştır. İzolatların %2'si amikasine, %10'u sefaperazon/sulbaktama, %6'sı netilmisine orta duyarlı bulunurken, %7.5'i amikasine, %15'i sefaperazon/sulbaktama %27,5'i netilmisine dirençli saptanmıştır. İzolatların antibiyotiklere duyarlılıkları değerlendirilirken CLSI'ı önerileri dikkate alınmıştır.

Tablo 3: Antibiyogram Testinde Kullanılan Antibiyotik Diskleri

No	Antibiyotik
1	Gentamisin
2	Amikasin
3	Kanamisin
4	Oksasilin
5	Teikoplanin
6	Rifampin
7	Sefaperazon/Sulbaktam
8	Netilmisin
9	Streptomisin
10	Linezolid

Tablo 4: *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlı Suş Sayıları ve Yüzde Oranları [n(%)]

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	Suş Sayısı (N)
Gentamisin	39 (%97.5)	1 (%2.5)	0	40
Amikasin	35 (%87.5)	2 (%5)	3 (%7.5)	40
Kanamisin	0	0	40 (%100)	40
Oksasilin	0	0	40 (%100)	40
Teikoplanin	0	0	40 (%100)	40
Rifampin	0	0	40 (%100)	40
Sefaperazon/Sulbaktam	30 (%75)	4 (%10)	6 (%15)	40
Netilmisin	23 (%57.5)	6 (%15)	11 (%27.5)	40
Streptomisin	0	0	40 (%100)	40
Linezolid	0	0	40 (%100)	40

Tablo 5: *P. aeruginosa* için CLSI'nın Önerdiği Zon Çapı Değerleri(mm)

Antibiyotik ^a	<i>P. aeruginosa</i> Duyarlı \geq /Orta Duyarlı/Dirençli \leq		
Gentamisin	15	13-14	12
Amikasin	17	15-16	14
Kanamisin	-	-	-
Oksasilin	-	-	-
Teikoplanin	-	-	-
Rifampin	-	-	-
Sefaperazon/Sulbaktam	18	15-17	14
Netilmisin	15	13-14	12
Streptomisin	-	-	-
Linezolid	-	-	-

^a CLSI M100 klavuzundan yararlanılmıştır.⁹¹

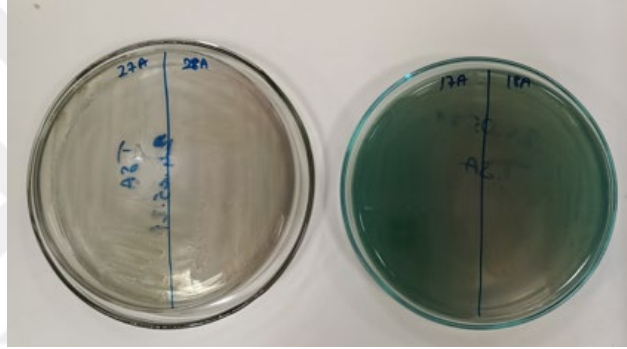
Tablo 6: *P. aeruginosa* İzolatlarının Seçilen Antibiyotiklere Göre Duyarlılık Durumları

Antibiyogram Testi Zon Çapları (mm)										
Suş No	Antibiyotik No									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	20	30	R	R	R	R	R	R	R	R
2	20	20	R	R	R	R	20	10	R	R
3	20.8	20.2	R	R	R	R	R	10	R	R
4	20	11	R	R	R	R	21	10.1	R	R
5	13	10	R	R	R	R	22	15	R	R
6	20	20	R	R	R	R	20	16	R	R
7	22	20	R	R	R	R	25	18	R	R
8	25	26	R	R	R	R	12	11	R	R
9	20.2	20	R	R	R	R	20	16	R	R
10	22	18	R	R	R	R	24	18	R	R
11	23	20	R	R	R	R	20	20	R	R
12	22	20	R	R	R	R	22	20	R	R
13	24	20	R	R	R	R	22	20	R	R
14	24	23	R	R	R	R	20	18	R	R
15	22	20	R	R	R	R	20	20	R	R
16	20	20	R	R	R	R	20	22	R	R
17	20	18	R	R	R	R	20	18	R	R
18	20	20	R	R	R	R	16	14	R	R
19	20	18	R	R	R	R	20	16	R	R
20	19	14	R	R	R	R	19	12	R	R
21	20.2	18.6	R	R	R	R	18	14	R	R
22	20	19.4	R	R	R	R	22	12	R	R
23	20	20	R	R	R	R	12	16	R	R
24	20	18	R	R	R	R	16	12	R	R
25	20.2	20.6	R	R	R	R	14.2	13.4	R	R
26	18	20	R	R	R	R	12	10	R	R
27	20	18	R	R	R	R	20	17	R	R
28	20	18	R	R	R	R	18	14	R	R
29	20.4	20.2	R	R	R	R	18	12	R	R
30	20.2	20	R	R	R	R	19.8	18.4	R	R
31	20	15	R	R	R	R	18	10.8	R	R
32	20	19.6	R	R	R	R	16.2	10	R	R
33	22	21.4	R	R	R	R	18	20	R	R
34	23.8	20	R	R	R	R	18.2	16.8	R	R
35	21	18	R	R	R	R	20	16	R	R
36	18	16	R	R	R	R	16.3	15.8	R	R
37	20	20	R	R	R	R	12	13	R	R
38	18	20	R	R	R	R	18	16	R	R
39	22	20	R	R	R	R	14	13.1	R	R
40	21	20	R	R	R	R	20	19	R	R

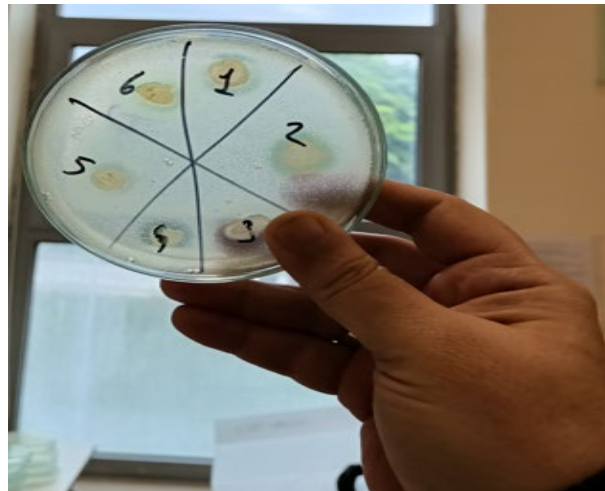
1: Gentamisin , 2: Amikasin , 3: Kanamisin ,4: Oksasilin, 5:Teikoplanin,
6: Rifampin, 7: Sefaperazon/Sulbaktam , 8: Netilmisin,9: Streptomisin ,10: Linezolid

4.2. Klinik İzolatlarda Pigment Oluşumu, Proteinaz ve Lipaz Aktiviteleri

Çalışmamızda kullandığımız 40 adet *P. aeruginosa* izolatlarına yapılan pigment oluşumu testi sonucuna göre izolatların 8'inde (%20) pigment oluşumu görülmezken 32'sinde (%80) pigment oluşumu gözlenmiştir. Proteinaz aktivitesi için yapılan test sonucuna göre izolatların 23'ü (%57.5) 4+ yüksek derecede, 10'u (%25) 3+ orta derecede, 2'si (%5) 2+ düşük derecede proteinaz aktivitesi gösterirken 5'i (%12.5) proteinaz aktivitesi göstermemiştir. Lipaz aktivitesi için yapılan test sonucuna göre izolatların 2'si (%5) 2+ düşük derecede lipaz aktivitesi gösterirken 38'i (%95) lipaz aktivitesi göstermemiştir.



Şekil 4: *P. aeruginosa*'nın Piyosiyenin Pigmenti

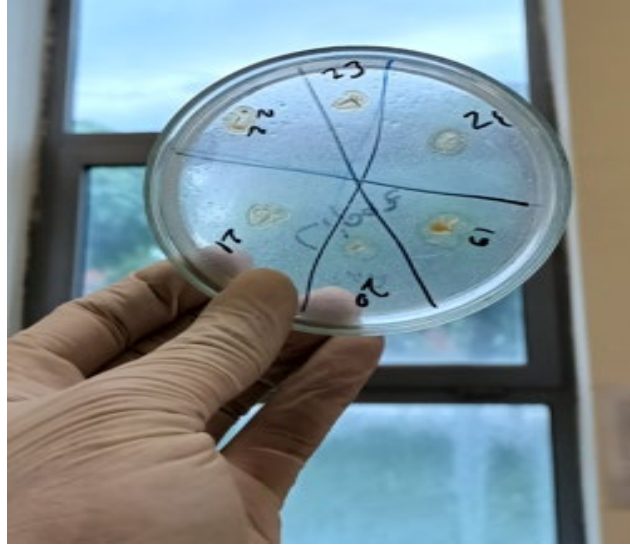


Şekil 5: İzolatların Proteaz Aktivitesi

Tablo 7: İzolatlarda Pigment Oluşumu, Proteaz ve Lipaz Aktivitesi^b

İzolat No	Pigment Oluşumu	Proteinaz Aktivitesi	Lipaz Aktivitesi
1	+	4+	-
2	+	4+	-
3	+	4+	-
4	+	4+	-
5	+	3+	-
6	+	4+	-
7	+	4+	-
8	+	4+	-
9	-	4+	-
10	+	4+	-
11	+	4+	-
12	+	4+	-
13	+	3+	-
14	+	3+	-
15	-	3+	-
16	-	4+	-
17	+	3+	-
18	+	3+	-
19	+	4+	2+
20	+	4+	-
21	+	4+	-
22	+	4+	-
23	+	4+	-
24	+	4+	2+
25	+	3+	-
26	+	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	+	-	-
30	+	-	-
31	-	4+	-
32	+	4+	-
33	-	4+	-
34	-	4+	-
35	+	3+	-
36	+	4+	-
37	+	2+	-
38	+	3+	-
39	+	3+	-
40	+	2+	-

^b Proteinaz Lipaz ve Pigment Oluşumu Sonuçları Pigment Oluşumu: + = var, - = yok
Proteinaz ve Lipaz Aktivitesi: 4+ = Yüksek Derecede Var 3+ = Orta Derecede Var 2+ = Düşük Derecede Var = yok



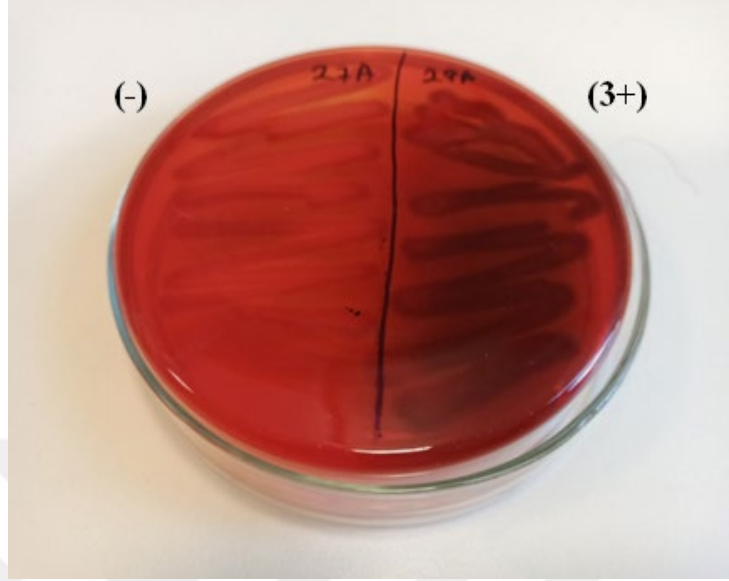
Şekil 6: İzolatların Lipaz Aktivitesi

4.3. Klinik İzolatların Biyofilm Test Sonuçları

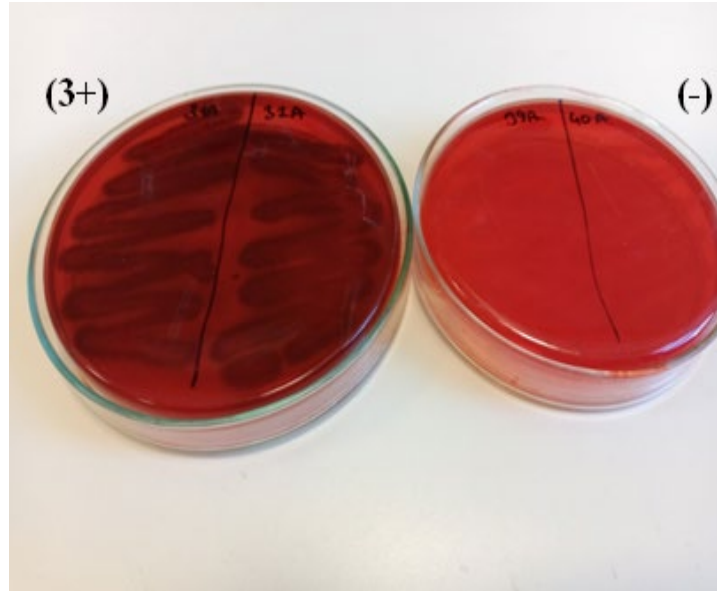
Çalışmada izolatların biyofilm testi tüm izolatların kongo kırmızılı agar ve tüp yöntemleri ile yapılırken yapılan testler sonucunda en güçlü biyofilm oluşumu gözlenen 10 izolat seçilerek mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm testi yapılarak çalışmaya seçilen 10 izolat ile devam edilmiştir. Kongo kırmızılı agar yöntemiyle yapılan test sonuçlarına göre 28 (%70) izolatta biyofilm oluşumu gözlenirken 12 (%30) izolatta biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Biyofilm oluşumu gözlenen 28 izolatın 15 (%37.5) izolat güçlü biyofilm, 10 (%25) izolat orta derecede biyofilm oluşumu gözlenirken 3 (%7.5) izolat ise zayıf biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Tüp yöntemiyle biyofilm testi kristal viyole boyar maddesi ve safranin boyar maddesi kullanılarak iki ayrı test şeklinde yapılmıştır.

Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm tüp testi sonuçlarına göre 30 (%75) izolatta biyofilm oluşumu gözlenirken 10 (%25) izolatta biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Biyofilm gelişimi gösteren 30 izolatın 14 (%35) izolat güçlü biyofilm, 12 (%30) izolat orta derecede biyofilm geliştirirken 4 (%10) izolat ise zayıf biyofilm gelişimi gözlemlenmiştir. Safranin boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm tüp testi sonuçlarına göre 29 (%72.5) izolatta biyofilm oluşumu görülürken 11 (%27.5) izolatta biyofilm oluşumu görülmemiştir. Biyofilm oluşumu görülen 29 izolatın 16 (%40) izolat güçlü biyofilm, 9 (%22.5) izolat orta derecede biyofilm oluştururken 4 (%10) izolat ise zayıf biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşumu görülen 10 izolat için mikrotitrasyon plağı yöntemiyle yapılan biyofilm test sonuçlarına göre 10 (%100) izolat

biyofilm pozitif bulunurken negatif bulguya rastlanmamıştır. İzolatlardan 8 (%80) tanesi orta derecede biyofilm geliştirirken 2 (%20) tanesi güçlü biyofilm geliştirmiştir.



Şekil 7: Kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç



Şekil 8: Kongo kırmızılı agar yöntemiyle biyofilm testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç

Tablo 8: Farklı Metotlarda Uygulanan Biyofilm Testine Göre İzolatların Biyofilm Oluşturma Güçleri

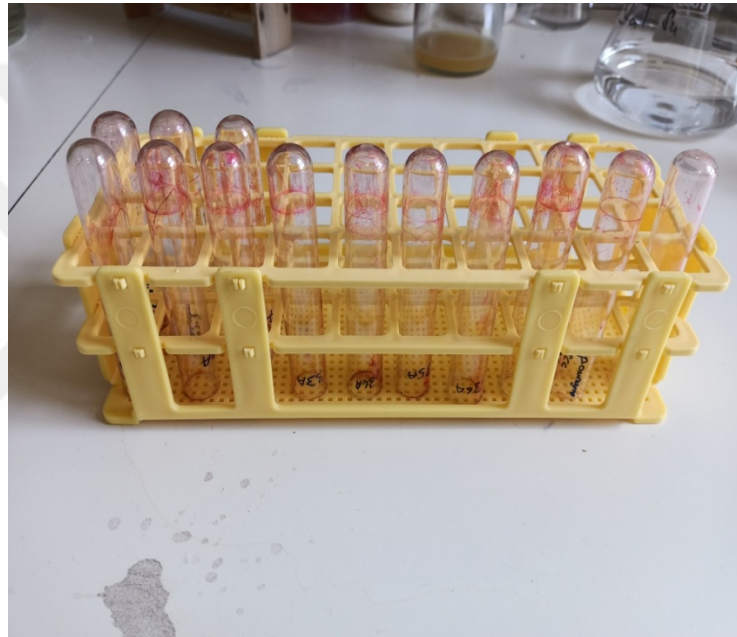
İzolat No	Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle	Kristal Viyole Boyar Maddesi Kullanılarak	Safranin Boyar Maddesi Kullanılarak
1	2+	2+	3+
2	-	-	-
3	+	2+	+
4	-	+	+
5	2+	2+	2+
6	-	-	-
7	3+	3+	3+
8	3+	3+	3+
9	+	2+	+
10	2+	2+	2+
11	+	+	+
12	3+	3+	3+
13	2+	2+	3+
14	2+	2+	2+
15	-	-	-
16	-	-	-
17	3+	3+	3+
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	2+	2+	2+
22	-	-	-
23	3+	3+	3+
24	2+	2+	2+
25	3+	3+	3+
26	3+	3+	3+
27	-	+	-
28	3+	3+	3+
29	2+	2+	2+
30	2+	2+	2+
31	3+	3+	2+
32	3+	2+	3+
33	3+	3+	3+
34	3+	3+	3+
35	3+	3+	3+
36	3+	3+	3+
37	2+	+	2+
38	3+	3+	3+
39	-	-	-
40	-	-	-
S.Ş	3+	3+	3+

S.Ş: *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşu

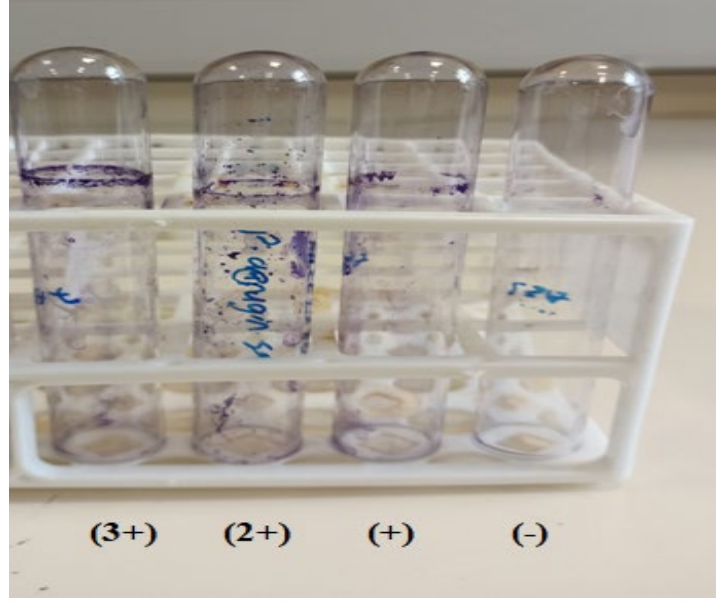
Tablo 9: *P. aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Derecesi Tablosu (%)

Biyofilm Şiddeti	Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle N=40	Kristal Viyole Boyar Maddesi Kullanılarak N=40	Safranin Boyar Maddesi Kullanılarak N=40
-	N=12 (%30)	N=10 (%25)	N=11 (%27.5)
+	N=3 (%7.5)	N=4 (%10)	N=4 (%10)
2+	N=10 (%25)	N=12 (%30)	N=9 (%22.5)
3+	N=15 (%37.5)	N=14 (%35)	N=16 (%40)

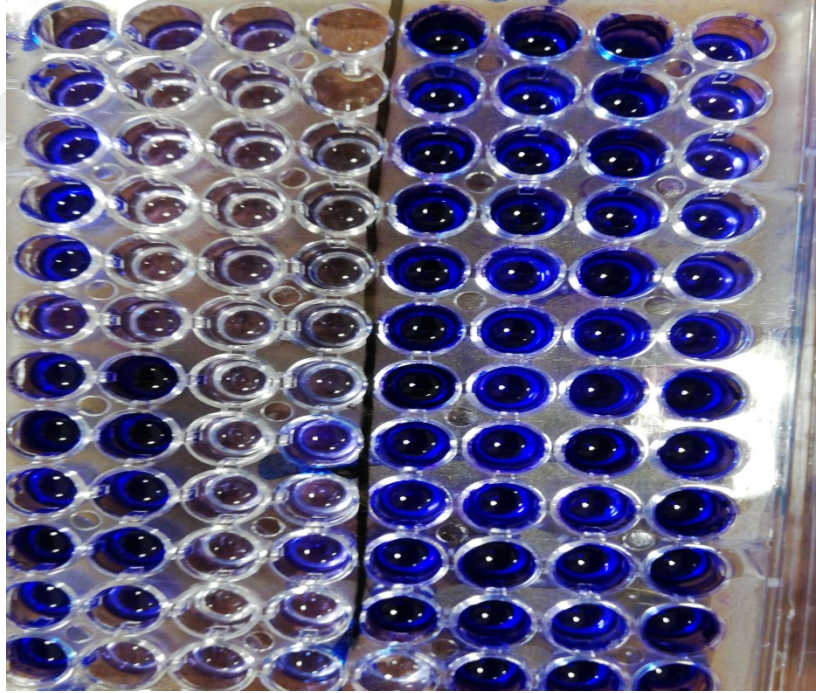
(-) : Biyofilm negatif (+) : Zayıf biyofilm (2+) : Orta derede biyofilm (3+) : Güçlü biyofilm



Şekil 9: Tüp yönteminde safranin boyar maddesi ile biyofilm testi



Şekil 10: Tüp yönteminde kristal viyole boyar maddesi ile biyofilm testi



Şekil 11: Mikroplate yöntemi ile biyofilm oluşumunun kristal viyole kullanılarak değerlendirilmesi

Tablo 10: Biyofilm Oluşumunun Mikroplate Yöntemi Kullanılarak Değerlendirilmesi

Mikroplate ile Biyofilm Testi		
İzolat No	Absorbans Değeri	Biyofilm Şiddeti
7A	0.009	Orta Derece
8A	0.012	Orta Derece
25A	0.014	Orta Derece
26A	0.014	Orta Derece
28A	0.018	Güçlü
33A	0.018	Güçlü
34A	0.014	Orta Derece
35A	0.016	Orta Derece
36A	0.017	Orta Derece
38A	0.010	Orta Derece
<i>P.aeruginosa</i> Kontrol (+)	0.018	Güçlü
<i>E.coli</i> Kontrol (-)	0.002	Negatif

Negatif kontrolün eşit ve altında absorbans verenler "negatif", güçlü biyofilm oluşturduğu bilinen pozitif kontrolün eşit ve üzerinde absorbans verenler "güçlü", her iki kontrol grubu arasında absorbans verenler "orta derece" olarak değerlendirilmiştir.⁹²

Tablo 11: Kristal Viyole Kullanılarak Yapılan 24 Saatlik Biyofilm Absorbans Ölçümlerinin, *P. aeruginosa* ATCC 27853'e göre Oranları (%)

Biyofilm Derecesi	Mikroplate ile Biyofilm Testi N=10
Negatif	N=0 (%0)
Orta Derece	N=8 (%80)
Güçlü	N=2 (%20)

P. aeruginosa izolatlarının oluşturduğu biyofilm tabakası üzerine linezolidin etkinliği mikrotitrasyon plağında 1 gece önceden oluşturulmuş biyofilme linezolidin farklı konsantrasyonları eklenerek mikroplate reader'da OD'leri ölçülerek tespit edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde antibiyotik öncesi ve sonrası (128, 64, 32 ve 16) gruplarının ortalamaları arasındaki farklılık eşleştirilmiş gruplar için t-testi ile incelenmiştir. Antibiyotik öncesi OD ve antibiyotik sonrası OD arasında anlamlı fark bulunmuştur

($P < 0.05$). Ancak bu farkı şu şekilde yorumlayabiliriz; 128 mg/L antibiyotik konsantrasyonundan 16 mg/L antibiyotik konsantrasyonuna doğru antibiyotik konsantrasyonu azaldıkça direnç artmaktadır ve OD artmaktadır. İstatistiki açıdan bir anlamlı azalış olsa da en anlamlı azalış 128 mg/L de görülmüştür ve 128 mg/L konsantrasyonunda azalışa rağmen bir direnç söz konusudur. Bu doğrultuda *P. aeruginosa* izolatları geliştirdiği biyofilm yapısıyla linezolidde direnç göstermiş linezolid *P. aeruginosa* izolatlarına karşı etkin olmamıştır. Bu sonuç bizim hipotezimizi istatistiki açıdan desteklemektedir.

Tablo 12: Linezolidin Sub MİK Dozlarında İzolatların Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

İzolat No	Antibiyotik Öncesi OD	Antibiyotik Sonrası OD 128 (mg/L)	Antibiyotik Sonrası OD (64mg/L)	Antibiyotik Sonrası OD (32mg/L)	Antibiyotik Sonrası OD (16mg/L)
7A	0.009	0.005	0.006	0.007	0.008
8A	0.012	0.008	0.009	0.010	0.011
25A	0.014	0.005	0.008	0.012	0.013
26A	0.014	0.006	0.008	0.010	0.012
28A	0.018	0.005	0.009	0.012	0.015
33A	0.018	0.008	0.011	0.013	0.016
34A	0.014	0.006	0.008	0.010	0.012
35A	0.016	0.006	0.009	0.012	0.014
36A	0.017	0.007	0.009	0.011	0.013
38A	0.010	0.004	0.005	0.007	0.009
<i>P.aeruginosa</i> Kontrol (+)	0.018	0.009	0.011	0.014	0.016
<i>E.coli</i> Kontrol (-)	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002

Tablo 13: Sub MİK Dozdaki Linezolidin (öncesi ve sonrasında) Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Antibiyotik öncesi- Sonrası	Antibiyotik öncesi Mean \pm SE	Antibiyotik Sonrası Mean \pm SE	p sig.
OD - OD128	0,0135 \pm 0,001367923	0,00591667 \pm 0,000556754	0.000*
OD - OD64	0,0135 \pm 0,001367923	0,0079167 \pm 0,00073297	0.000*
OD - OD32	0,0135 \pm 0,001367923	0,01 \pm 0,000953463	0.000*
OD - OD16	0,0135 \pm 0,001367923	0,01175 \pm 0,001142333	0.000*

t- test,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Linezolidin biyofilm hücrelerine etkinliği 96 kuyucuklu mikroplate’de steril boncukla BİK değerleri belirlenerek saptanmıştır. MİK testinde elde edilen değerler ve BİK testinde elde

edilen değerler **Tablo 14** de verildi. En düşük MİK değeri 64 mg/L konsantrasyonda bulunurken izolatların çoğunluğunda MİK değeri 128 mg/L konsantrasyonda bulunmuştur. BİK değerleri ise izolatların tamamında 128 mg/L konsantrasyonda bulunmuştur. Bazı izolatlarda BİK değeri MİK değerinin 2 katı olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre planktonik formunda linezolide dirençli olan *P. aeruginosa* biyofilm geliştirerek linezolide daha dirençli hale gelmiştir.

Tablo 14: İzolatların MİK ve BİK Değerlerinin Karşılaştırılması

İzolat No	MİK Mikroplate Reader Değeri	MİK Antibiyotik Konsantrasyonu (mg/L)	BİK Mikroplate Reader Değeri	BİK Antibiyotik Konsantrasyonu (mg/L)
7A	1.274	64	1.745	128
8A	1.618	128	1.638	128
25A	1.655	128	1.708	128
26A	1.684	128	1.690	128
28A	1.420	64	1.593	128
33A	1.371	128	1.633	128
34A	1.472	128	1.549	128
35A	1.346	128	1.392	128
36A	1.410	128	1.494	128
38A	1.141	64	1.680	128
<i>P. aeruginosa</i> (+) Kontrol	1.636	128	1.743	128
<i>E. coli</i> (-) Kontrol	1.121	64	1.153	64

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

BİK: Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu

MİK ve BİK değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olup olmadığı bağımsız gruplarda t-testi yöntemi ile ele alınmıştır. MİK ve BİK değerleri arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tablo 15: MİK ve BİK Değerlerinin İstatistik Veri Tablosu

Linezolidin Bakteri ve Biyofilm Hücrelerine Etkinliği Testleri	N:12	Mean ± SE	p sig.
MIK	12	1,4290±0.055	0.048*
BIK	12	1,5848±0.049	

* p<0.05

MİK değerleri ortalamaları 1,4290 bulunurken BİK değerleri ortalamaları 1,5848 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *P. aeruginosa* biyofilm yapısıyla birlikte planktonik formuna göre linezolide daha çok dirençli hale gelmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

P. aeruginosa nozokomiyal enfeksiyonların önemli nedenlerin olmakla birlikte oluşturduğu biyofilm yapısıyla antibiyotik direncinde önemli rol oynamaktadır. Planktonik formda olan bakteri hücreleri ile biyofilm geliştirmiş bakteri hücreleri karşılaştırıldığında, biyofilm geliştirmiş bakteri hücrelerinin antibiyotik direncinde önemli derecede artış saptanmıştır.⁹³

P. aeruginosa, çevresel kaynaklardan izole edilebileceği gibi hastane ortamında tıbbi cihazlardan, ventilatörlerden, kateterlerden de izole edilebilmektedir. İnsanlarda solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolları enfeksiyonları, yara ve yanık enfeksiyonları, sepsis, deri enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları gibi birçok hastalığa neden olabilmekle birlikte oldukça fırsatçı bir patojendir.⁹⁴

Yaptığımız çalışmada çeşitli polikliniklere başvuran hastaların rutin istenen idrar örneklerinden izole edilmiş 40 adet *P. aeruginosa* izolatları kullanılmıştır. Er ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada ise belirli dönemde hastanede yatmakta olan hastalardan idrar yolları enfeksiyonu etkeni olarak izole edildiği bilinen 103 adet *P. aeruginosa* izolatu ile çalışıldığı görülmüştür.⁹⁵ Zhang ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada belirli dönemde hastanede idrar yolları enfeksiyonuna neden olduğu belirlenen çoğu ilaca karşı direnç göstermiş olan 198 adet *P. aeruginosa* izolatu ile çalışıldığı görülmüştür.⁹⁶

Estaji ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada İdrar yolu enfeksiyonu olan hastaların idrarlarından izole edilmiş 70 adet *P. aeruginosa* izolatu ile çalışıldığı görülmüştür.⁹⁷ Yaptığımız literatür taramasında gerek ülkemizde gerekse dünya ülkelerinde *P. aeruginosa*'nın idrar yolu enfeksiyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma değerlendirildiğinde yapılmış çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Nozokomiyal enfeksiyonların önemli nedenlerinden olan *P. aeruginosa* özellikle kistik fibrozisli hastalar ve immün sistemi baskılanmış bireylerde yüksek morbitide ve mortalite oranları ile izlenmektedir.⁹⁸

P. aeruginosa'nın çoğu antibakteriyel ajana karşı dirençli olması ve duyarlı olduğu antibakteriyellere karşıda kolaylıkla direnç geliştirebilmesi bu mikroorganizmanın tedavisini güçleştirmektedir. Bu nedenle, *P. aeruginosa*'nın etkin tedavisi için genellikle

bakterinin duyarlı olduğu bilinen iki farklı antibiyotik kombine edilerek tedaviye başlanılmaktadır.⁷

P. aeruginosa'nın tedavisinde kinolonlar, aminoglikozitler, karbapenemler, sefalosporinler ve antipseudomonal penisilinler tercih edilmektedir. Kombine tedavi seçeneği olarak ise β -laktamlar ile aminoglikozid veya β -laktamlar ile florokinolonlar kullanılmaktadır.^{99,100,101}

Kombine antibiyotik tedavi seçenekleri uygulandığında mikroorganizmanın antibiyotiklere direnç geliştirmesi baskılanarak, daha güçlü etkinlik göstererek antibiyotiklerin MİK değerlerinde azalma görölmektedir.¹⁰² Çalışmamızda, disk difüzyon yöntemiyle yaptığımız antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre çalışma yaptığımız *P. aeruginosa* izolatlarında gentamisine %97.5, amikasine %87.5, sefaperazon/sulbaktama %75, netilmisine %57.5 duyarlılık saptanmış olup aynı test sonucuna göre çalışma yaptığımız izolatlarımız, kanamisin, oksasilin, teikoplanin, rifampin, streptomisin ve linezolidde ise dirençli tespit edilmiştir. İzolatların %2.5' i gentamisine %2'si amikasine, %10'u sefaperazon/sulbaktama, %6'sı netilmisine orta duyarlı bulunurken, %7.5'i amikasine, %15'i sefaperazone/sulbaktama %27,5'i netilmisine dirençli saptanmış olup gentamisine dirençli izolat saptanmamıştır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada belirli dönemlerde hastanede yatmış olan hastaların idrar örneklerinden izole edilmiş 103 *P. aeruginosa* izolatlarıyla yapılan çalışmada seftazidime %85.4, gentamisine %33, meropeneme %23.3, imipeneme % 20.4 siprofloksasine %32 olmak üzere çalışmada kullanılan diğer antibakteriyel ajanlara ise aynı şekilde *P. aeruginosa* tarafından direnç saptanmıştır.⁹⁵

Yapılan diğer bir çalışma 80 adet klinik *P. aeruginosa* izolatlarına çeşitli antimikrobiyallerle yapılmış olup gentamisine %18.75, amikasine % 12.5 seftazidime %17.5 direnç tespit edilmiş ve çalışmadaki diğer antimikrobiyallere de *P.aeruginosa* benzer şekilde direnç geliştirmiştir.¹⁰³

Çalışmamızda sonuç aldığımız veriler yapılan diğer çalışmalarda saptanan direnç gelişimleriyle benzer şekildeydi literatür çalışmaları bize klinik *P. aeruginosa* izolatlarının direnç ve tedavi problemini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre; Armengol ve ark. (2020) yılında *P. aeruginosa*'nın dirençli olduğu rifampin ve linezolid ve duyarlı olduğu kolistin kombinasyonlarıyla yapmış oldukları çalışmada *P. aeruginosa* izolatları linezolidde dirençli (mik > 256) bulunmuştur.

Kolistine duyarlı bulunan *P. aeruginosa* izolatlarına linezolid ve kolistin kombinasyonunda sinerjik bir etki göstermedikleri bildirilmiştir.¹⁰⁴

Gültepe ve ark. (2014) yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise belirli dönemlerde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 636 *P. aeruginosa* izolatı retrospektif olarak değerlendirilmiş, farklı antibiyotiklere dirençleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucuna göre izolatlarda amikasine %26, seftazidime %30, gentamisine %25, sefepime %33, siprofloksasine %31, levofloksasine %32, inipeneme %33, meropeneme %29, piperasiline %51, piperasilin-tazobaktam %51 direnç geliştiği gözlemlenmiştir.¹⁰⁵

Ülkemizde yapılmış olan diğer bir çalışmada ise çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 178 *P. aeruginosa* izolatının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları piperasilin %46,1, piperasilin-tazobaktam %29,8, tikarsilin-klavunik asit %34,8, sefepim %43,8, seftazidim %24,7, seftazidim-avibaktam %3,9, seftolozan-tazobaktam %13,5, aztreonam %9,6, meropenem %22,5, imipenem %30,9, siprofloksasin %25,8, levofloksasin %30,9, amikasin %9,6, torbamisin %20,8, çoklu ilaç direnci ise %100 olarak tespit edilmiştir.⁷

Bhuiya ve ark. (2018) farklı kaynaklardan izole ettikleri 17 adet *P. aeruginosa* izolatını farklı antibiyotiklere karşı test etmişler ve sonuç olarak izolatlar imipenem ve meropeneme %100 duyarlı bulurken aztreonam %11,76, sefotaksim %82,35, seftazidime %5,88 direnç göstermişlerdir.¹⁰⁶

Javiya ve ark. (2008) Hastane ortamındaki çeşitli kültürlerden izole ettikleri bakterileri incelediklerinde 56 adetinin *P. aeruginosa* izolatı olduğunu tespit etmişlerdir. Kültürlerin arasında en çok *P. aeruginosa*'ya idrar kültürlerinde rastlanılmıştır. Bu çalışmada *P. aeruginosa*'nın farklı antibiyotiklere duyarlılığı test edilmiş ve sonuç olarak sefalosporin sınıfında en yüksek direnç sefalekssin %94,64, aminoglikozid sınıfında tobramisin %66,07, florokinolon sınıfında siprofloksasin %69,64 ve ofloksasin %69,64, tetrasiklin sınıfında doksisisiklin %91,07, makrolid sınıfında ise azitromisin %85,71 dirençli bulmuşlardır.¹⁰⁷

Raja ve Singh (2007). 505 klinik *P. aeruginosa* izolatını farklı antibiyotikler ile test etmişler ve izolatların antimikrobiyal direnç oranlarını amikasin %6,73, gentamisin %12,9, netilmisin %10,1, seftazidime %10,9, siprofloksasine %11,3, imipeneme %9,9, piperasilin %10,8, piperasilin-tazobaktam %9,4 tespit etmişlerdir.¹⁰⁸

Bizim yaptığımız çalışmada linezolidin *P. aeruginosa* ya duyarlılık testi sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiş (128-16 mg/L) ve mik değeri 128 mg/L

bulunmuştur. Bu sonuç çalışma yaptığımız klinik *P. aeruginosa* izolatlarının linezolide dirençli olduğunu ve literatür çalışmaları ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

P. aeruginosa farklı direnç mekanizmaları ve virülans faktörleri aracılığı ile antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. *P. aeruginosa*'da ekstrasellüler membranının geçirgenliğinin az olması, antibiyotiklerin bağlanabileceği yapıları içermemesi ve eflüks pompa sistemlerine sahip olması doğal yoldan antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olur. Bu mikroorganizma mutasyonlar ve gen transferleriyle antibiyotiklere sonradan direnç geliştirebilir. Sonradan kazanılan bu direnç enzimatik değişiklikler ve regülatör genlerdeki mutasyonlar aracılığı ile ortaya çıkmaktadır.^{109,110,111}

P. aeruginosa immün sistemi baskılanmış bireylerde akut veya kronik seyirli fırsatçı bir mikroorganizma olmasıyla birlikte nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir kısmını oluşturmaktadır.¹¹² *P. aeruginosa* 2017'de Dünya sağlık örgütü tarafından insan yaşamını tehdit eden ölümcül patojen olarak kabul edilerek yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi için öncelikli bakteri olarak belirlenmiştir.¹¹³

P. aeruginosa'lar biyofilm geliştirerek kendilerini çevresel tehditlerden ve konak hücrenin immün yanıtından korurlar. Bu durumda enfeksiyonların seyrinde önemli rol oynarlar. Son yıllarda *P. aeruginosa* biyofilmleri *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının neden olduğu hastalıklarda tedavilerin zorlaşması, antibiyotik dirençliliğinin artışı gibi nedenlerden dolayı ciddiye kazanmış ve daha ayrıntılı incelenmeye başlamıştır.^{112,114}

Biyofilm, bakterilerin kendilerini çevresel faktörlerden ve değişimlerden, antibakteriyel ajanlardan korumak için ayrıca yaşamını devam ettirebilmek için gerekli olan koşulları sağlayabilmek için oluşturdukları bir yaşam stratejisidir.¹¹⁵

Bakterilerin biyofilm geliştirmesi minimum üç adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda bakterinin hücreye veya cansız maddeye adezyonu gerçekleşir. Adezyon sonrası bakteri hücrede veya yüzeyde çoğalmaya başlar ve ekzopolisakkarit madde sentezler. Son aşamada ise bakterinin atık maddeleri uzaklaştırabildiği kanal sisteminin de bulunduğu biyofilm yapısı oluşmaktadır.¹¹⁶

P. aeruginosa biyofilm matrisinin polisakkarit, ekstrasellüler DNA (eDNA), protein ve lipidlerden oluştuğu bilinmektedir.^{117,118} Bu matris yapı yüzeylere adezyonda iskele görevi görür ve bakterinin yaşamını tehdit eden ajanlardan (immün sistem elemanları, antibiyotikler vs.) bakteriyi korur.^{118,119,120}

P. aeruginosa biyofilm oluşumunda ürettiği üç ekzopolissarit yapı (Psl, Pel, ve aljinat) biyofilm oluşumu ve yüzeylere adezyonu için oldukça önemlidir.^{117,121}

Biyofilm gelişiminin incelenmesi ve antibiyotik direnci çeşitli bakteriyel mikroorganizmalarda farklı araştırmacılar tarafından çeşitli antimikrobiklerle ile çok kez araştırılmıştır.

Biyofilm yapısı içindeki mikroorganizmaların antibakteriyellere ve dışarıdan gelebilecek tehditlere karşı planktonik yapıdaki mikroorganizmalara göre 100-1000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir.¹²² Tıp alanındaki gelişmelerle birlikte biyofilm test yöntemleride artmaktadır. Günümüzde biyofilm tespitinde genellikle Kongo kırmızılı agar yöntemi, standart tüp yöntemi, mikroplate yöntemi kullanılmaktadır. Mikroplate yöntemi kullanılan diğer yöntemlere göre biyofilmin tespiti, ölçümü ve incelenmesi için daha sık kullanılan bir biyofilm test yöntemidir.^{53,123}

Çalışmamızda, biyofilm testi Kongo kırmızılı agar yöntemi, standart tüp yöntemiyle yapılmış olup standart tüp yöntemiyle kristal viyole boyar maddesi ve safranin boyar maddesi kullanılarak iki farklı şekilde yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda gözle değerlendirme yapılmış olup en iyi biyofilm gelişimi gösteren on adet izolat seçilip bu izolatlara mikroplate ile biyofilm testi yapıp çalışmaya seçilen on adet *P. aeruginosa* izolatu ile devam edilmiştir.

2018 yılında ülkemizde çeşitli kliniklerden izole edilmiş nonfermantatif 150 klinik izolat ile yapılan çalışmada Kongo kırmızılı agar yöntemi, tüp yöntemi ve mikroplate yöntemi ile biyofilm testi yapılmış olup Kongo kırmızılı agar yönteminde 71 (%47,33), mikroplate (kristal viyole) yönteminde 61(%40,66), mikroplate(safranin) yönteminde 83 (%55,33), tüp(kristal viyole) yönteminde 57 (%38) tüp(safranin) yönteminde 65 (%43.3) izolat biyofilm pozitif bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen 150 nonfermantatif izolatın 42(%28) tanesi *P. aeruginosa* olarak saptanmıştır. Kırk iki adet *P. aeruginosa* izolatının Kongo kırmızılı agar yöntemiyle yapılan biyofilm testinde 25 tanesi, mikroplate (kristal viyole) yöntemiyle yapılan biyofilm testinde 20 tanesi, mikroplate (safranin) yöntemiyle yapılan biyofilm testinde 28 tanesi, tüp (kristal viyole) yöntemiyle yapılan biyofilm testinde 18 tanesi, tüp (safranin) yöntemiyle yapılan biyofilm testinde 17 tanesi biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir.¹²⁴

Kunwar ve ark., (2021) yapmış oldukları çalışmada ise yanık enfeksiyonlarından izole edilen 275 klinik izolattan 60 ı *P. aeruginosa* olarak saptanmış olup bu izolatlara tüp ve mikroplate yöntemiyle biyofilm testi yapılmıştır. Test sonuçlarına göre tüp yönteminde 60 izolattan 22 tanesi biyofilm üretirken mikroplate yöntemiyle yapılan testte 60 izolatin 15 tanesi biyofilm üretmiştir.¹²⁵

Yaptığımız çalışmada klinik idrar örneklerinden izole edilen 40 *P. aeruginosa* izolatu kullanıldı. İzolatlara Kongo kırmızılı agar yöntemiyle yaptığımız biyofilm test sonucuna göre 40 klinik *P. aeruginosa* izolatından 28(%70) tanesi biyofilm geliştirirken, tüp(kristal viyole) yöntemiyle yaptığımız biyofilm test sonucuna göre izolatların 30(%75) tanesi, tüp(safranin) yöntemiyle yaptığımız biyofilm test sonucuna göre 29(%72.5) tanesinde biyofilm gelişimi görülmüştür. Yapmış olduğumuz testlere göre en iyi biyofilm oluşturan izolatlardan seçilen 10 izolata ise mikroplate yöntemiyle biyofilm testi yapılmıştır test edilen izolatların %100'ünde biyofilm gelişimi görülmüştür. Elde edilen sonuçlar önceden yapılmış çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda linezolid dirençli olan klinik *P. aeruginosa* izolatlarının linezolidli ortamda biyofilm derecesini değerlendirdik. 40 adet *P. aeruginosa* izolatına biyofilm testleri yapılarak en iyi biyofilm gelişimi gözlenen 10 izolat seçildi. Bu izolatların planktonik formlarına linezolidin farklı konsantrasyonlarıyla (128-16 mg/L) yapılan testte MİK değeri 128 mg/L bulunmuş olup konsantrasyon azaldıkça direnç dahada artmıştır ($p<0.05$). Aynı doğrultuda biyofilm inhibitör konsantrasyonu (BİK) testi ile minimal inhibitör konsantrasyonları karşılaştırıldığında ise MİK 64 mg/L ve BİK 128 mg/L tespit edilmiştir. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde ise MİK ve BİK arasında önemli farklılık görülmüştür ($p<0.05$). Linezolidli ortamda *P. aeruginosa* izolatları biyofilm geliştirerek planktonik formlarına göre daha fazla direnç göstermişlerdir.

Delissalde ve Cuevas (2004) yılında yapmış oldukları çalışmada klinik *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm üreten formlarının üretmeyen formlarına göre çeşitli antibiyotiklerde daha dirençli olduklarını saptamışlardır.¹²⁶

Masadeh ve ark. (2013) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise Biyofilm geliştiren *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Yapılan çalışmada *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın biyofilmlerine ve planktonik hücrelerine karşı seçilen antibiyotiklerin MİK değerleri belirlenmiştir. Alınan sonuçlara göre MİK değerleri

bakterinin planktonik formuna göre biyofilm oluşturmuş formlarında daha yüksek saptanmıştır.¹²⁷

Yapılmış olan diğer bir çalışmada ise Abdi-Ali ve ark. (2006) klinik *P. aeruginosa* suşlarının geliştirdiği biyofilm yapılarına farklı antibiyotik sınıflarının aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda antibiyotiklerin etkinliği açısından planktonik hücre popülasyonu ile biyofilm hücre popülasyonu arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Örneğin; Gentamisin için MİK değeri planktonik formdaki bakteri için 4 mg/L olarak ölçülürken biyofilm geliştirmiş bakteri için 512 mg/L olarak saptanmıştır. Çalışma sonucunda diğer antibiyotik sınıfına göre florokinonların daha güçlü aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.¹²⁸

Ahmed ve ark. (2018) Ciprofloxacinin (CIP) *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturması üzerine yapmış olduğu çalışmada biyofilm popülasyonundan seçilen CIP'ye dirençli izolatlarda siprofloksasinin MIC'leri, planktonik kültürlerden elde edilen CIP'ye dirençli izolatların MIC'lerinden daha düşüktü olarak belirlemişlerdir.¹²⁹

Swapna ve ark. (2022) yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise çeşitli klinik örneklerden izole edilen 87 *P. aeruginosa* izolatlarına farklı antibiyotikler için duyarlılık testleri yapılmış sonuç olarak bakterilerin biyofilm oluşumuyla antibiyotik direnci arasında pozitif uyumun olduğu vurgulanmıştır.¹³⁰

Öte yandan, bakteri izolatları, antibiyotiklerin MİK altı maruziyetini takiben yüzeylere önemli ölçüde artan bir yapışma derecesi göstermiştir. Birkaç çalışma, bakterileri öldüremeyen bazı antibiyotiklerin alt MİK'lerinin biyofilm oluşumunu engelleyebileceğini göstermiştir; azitromisin, düşük konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe eden iyi bir örnektir.⁹³ Buna karşılık çok sayıda çalışma, bazı antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarında, çeşitli bakteri türlerinde biyofilm oluşumunu önemli ölçüde indükleyebileceğini göstermiştir.¹³¹

Sonuç olarak; *P. aeruginosa* güçlü biyofilm geliştirme kapasitesi olan ve antibiyotiklere yüksek direnç geliştirebilen bir bakteriyel mikroorganizmadır. Bu nedenle tedavisi oldukça güçtür. Biyofilm gelişimi mikroorganizmayı daha güçlendirerek tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Çalışmada linezolidin alt MİK'lerinin yüksek konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumunu engelleyebileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bu çalışma, biyofilm oluşumunu baskılayabilecek ve antibiyotik tedavisine

rehberlik edecek tıbbi uygulamaların oluşturulmasına yardımcı olacaktır. *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonların daha kolay ve daha etkin tedavi edilebilmesi için gelişen teknolojiyle birlikte yeni antibiyotik adayları olabilecek maddeler araştırılmalıdır, *P. aeruginosa*'nın genotip ve fenotipine uygun olmakla birlikte biyofilm yapısına da tam penetre olabilecek yeni antibakteriyel ilaçlar geliştirilmelidir. *P. aeruginosa* linezolidi efluks pompa sistemiyle dışarı atmaktadır ve linezolid bakteriye yüksek düzeyde penetre olamadığı için etkin olamamaktadır. Bu doğrultuda linezolidi gram negatif bakterilerin dışarı atım pompa sistemi gibi direnç faktörlerinden koruyacak bir maddenin varlığında ve linezolidin mikroorganizmaya penetrasyonu durumunda gram negatif bakteriler için etkinliği merak konusu olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın ve biyofilm yapısının genetik ve moleküler boyutta daha detaylı incelenerek araştırılması gereken birçok noktası bulunmaktadır. Günümüzde gelişmekte olan teknolojiyle birlikte *P. aeruginosa*'nın biyofilm yapısına ve direnç mekanizmasına etkili olabilecek yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1].Çufalı D. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antimikrobilyallere Direnci [Yüksek Lisans Tezi]. Afyon: T.C. Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2011.
- [2].Sırıken B, Öz V. *Pseudomonas aeruginosa*: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi. 2017; (18): 42-52.
- [3].de Bentzmann S, Plésiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. Environ Microbiol. 2011; 13(7):1655–1665.
- [4].Lima J, Alves LR, Paz J, Rabelo MA, Maciel M, Morais M. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. Bras Ter Intensiva. 2017; 29(3): 310–316.
- [5].Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Brady C, Guill M, Lahiri T ve ark. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. Ann Am Thorac Soc. 2014; 11(10): 1640–1650.
- [6].Harman R, Günseren F. Uygunsuz antibiyotik kullanımı ve antibiyotik kullanımına bağlı advers olayların araştırılması. Turk Hij Den Biyol Dergisi. 2021; 78(1): 3-14
- [7].Aslan S. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Çoklu İlaç Direncinin ve Metallo Beta Laktamaz Aktivitesinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi; 2021.
- [8].Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhata BD. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Helyon. 2019; 5(8): 1-7
- [9].Çiftçi Z. Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
- [10].Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A ve ark. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. Epidemiol Infect. 2011; 139(11): 1740–1749.
- [11].Talaro KP, Chess P, Foundations in Microbiology. 8. New York: McGraw Hill; 2012.

- [12]. Milletli SF. *Acinetobacter Baumannii* İzolatlarında Biyofilm Üretimi ve Kolistin Duyarlılıklarının Biyofilm Formasyonunda Araştırılması [Uzmanlık Tezi]. Samsun: T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2012.
- [13]. Arar D. Bakteriyal Biyofilm Oluşumu [Yüksek Lisans Tezi]. Denizli: T.C. Pamukkale Üniversitesi; 2015.
- [14]. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin microbiol rev.* 2002; 15(2): 167–193.
- [15]. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, et al. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31(3). 1-49.
- [16]. Akyüz A. Bazı Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Yeteneği Üzerine Dezenfektanların Etkisinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Tekirdağ: T.C. Namık Kemal Üniversitesi; 2019.
- [17]. Chalabı AH. Kortikosteroidlerin Candıda Albicans Biyofilm Yapımına Etkisinin In Vitro İncelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: T.C. Ege Üniversitesi; 2019.
- [18]. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318–1322.
- [19]. Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature.* 2001; 413(6858): 860–864.
- [20]. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49–79.
- [21]. Özkök Z. Kandan İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2018.
- [22]. İnci R. Biyofilm Oluşum Aşamaları [Internet]. 2016 [Erişim Tarihi: 14 Ağustos 2021]. Erişim adresi: <http://oralmikrobiyoloji.blogspot.com/2016/12/>
- [23]. Çalı A. Hastanede Yatan Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyofilm Formasyon Aktiviteleri [Yüksek Lisans Tezi]. Sivas: T.C. Cumhuriyet Üniversitesi; 2017.
- [24]. Biçer M. Bakteriyal Biyofilm Oluşumunu Engelleyecek Moleküllerin Sentezi ve Anti- Biyofilm Etkinliklerinin İncelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Çorum: T.C. Hitit Üniversitesi; 2018.

- [25]. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev of Microbiol.* 2002; 56: 187–209.
- [26]. Danese PN, Pratt LA, Kolter R, Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 2000; 182 (12): 3593-3596.
- [27]. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34 (3): 586-595.
- [28]. Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. U. Techn.* 1999; 32 (6): 321-326.
- [29]. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol.* 1994; 48: 585–617.
- [30]. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(3), 185–190.
- [31]. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4): 847–867.
- [32]. Şahin R. *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Denizli: T.C. Pamukkale Üniversitesi; 2007.
- [33]. Sharma D, Misba L, Khan UA. Antibiotics Versus Biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect. Control.* 2019; 8(76): 1-10.
- [34]. Güvensen CN, Ekmekcioğlu S. Biyofilm Kontrolünde Biyositler ve Etki Tarzları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.* 2016; 14(1): 1-19.
- [35]. Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(8): 3710–3713.
- [36]. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999; 177(1): 63–66.
- [37]. Er, F. *E. coli*'de Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumunda Rollerinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Bilecik: T.C. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi; 2018.
- [38]. Martino DP. Polymeric Substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(2). 274-288.

- [39]. Mei P, Liang Z, Lin C, Yunpeng Q, Jun W. Detection Techniques for Extracellular Polymeric Substances in Biofilms: A Review. *BioResources*. 2016; 11(3): 8092-8115.
- [40]. Yeniçeri M. Bakterilerde Quorum Sensing ve Antimikrobiyal Dirence Olan Etkisi. *CUSBED*. 2018; 3(1): 41-45.
- [41]. Açıklın, D. Salmonella Infantis Suşlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Çevresel ve Genetik Faktörlerin Etkisinin Araştırılması [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: T.C. Ankara Üniversitesi; 2017.
- [42]. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*. 2003; 46(4): 207–214.
- [43]. Efe F. Lactobacillus Cinsi Bakterilerde Biyosümfektan Üretimi ve Biyosümfektanın *Staphylococcus aureus* Bakterilerinin Oluşturduğu Biyofilmi Engellemesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2017.
- [44]. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 415–428.
- [45]. Song XN, Chneg YY, Li WW, Li BB, Sheng GP, Fang C.Y, et al. Quorum quenching is responsible for the underestimated quorum sensing effects in biological wastewater treatment reactors. *Bioresource Technology*. 2014; 171: 472–476.
- [46]. Ulrich RL. Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(10): 6173–6180.
- [47]. López Y, Soto MS. The Usefulness of Microalgae Compounds for Preventing Biofilm Infections. *Antibiotics*. 2019; 9(1): 1-16.
- [48]. Temel A, Eraç B. Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. *TMCD*. 2018; 48(1): 1-13.
- [49]. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LTT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 417247: 1-7.
- [50]. Yaşar KK, Aybar YB, Pehlivanoglu F, Şengöz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*. 2011; 25(2): 89 - 93.
- [51]. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates:

- A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22 (6): 996–1006.
- [52]. Ozturk I, Yurtman AN, Erac B, Gul-Yurtsever S, Ermertcan S, Hosgor-Limoncu M. In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratisl Lek Listy.* 2014; 115(8): 483–486.
- [53]. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007; 115(8): 891–899.
- [54]. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontics Topics.* 2010; 22(1): 58-78.
- [55]. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi, S. Microbial biofilms in endodontic infections: an updatereview. *Biomed J.* 2013; 36(2): 59-70.
- [56]. Tepeli ÇE. *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında Biyofilm Yapımının Ve Quorum Sensing’de Rol Alan Genlerin Araştırılması [Tıpta Uzmanlık Tezi]. Denizli: T.C. Pamukkale Üniversitesi; 2009.
- [57]. Ekselli S. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Biyofilm Üretimi İle Antibiyotik Dirençlilik İlişkisinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Samsun: T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2019.
- [58]. Thomas AJS, Shyre M, Pattermore PK, Epton M, Laing R, Pearson J, et al. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Medicine.* 2010; 10: 56.
- [59]. Bayraktar N. Endotrakeal Tüp Üzerinde Oluşmuş *Pseudomonas Aeruginosa* Biyofilmi Üzerine Kolistin Ve Ambroksolün Etkisi [Tıpta Uzmanlık Tezi]. Ankara: T.C. Ankara Üniversitesi; 2011.
- [60]. Aydemir DH. Klinik *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarının Çevreyi Algılama Sistemine Tıbbi Ve Aromatik Bitki Özütlerinin Etkisinin Araştırılması [Doktora Tezi]. Isparta: T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi; 2012.
- [61]. Woods, DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *trends microbiol.* 2004; 12 (10): 437-439.
- [62]. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2007; 387(2): 409-414.

- [63]. Yağcı A, Yağcı T, Şener B, Suziki Y, Ahmed K. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. *New Microbiol.* 2007; 30 (2): 167-171.
- [64]. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Nielsen TT. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2010; 59 (3): 253-268.
- [65]. Yavuz C. Hastane Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virülans Faktörlerinin Quorum Sensing Yönünden Değerlendirilmesi ve Epitel Hücrelerindeki Etkileri [Doktora Tezi]. Eskişehir Anadolu Üniversitesi; 2018.
- [66]. King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity.* 2009; 15 (5): 261-312.
- [67]. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2008; 38 (1): 42-51.
- [68]. Maçın S. Pigmentli ve Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virülans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: T.C. Hacettepe Üniversitesi; 2014.
- [69]. Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A., Olson, J. C. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A.1 Macrophages. *Infect Immun.* 2003; 71 (9): 5296-5305.
- [70]. Kumar MA, Kasirajan KT, Anandapandian, Parthiban K. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium. *Braz. arch. biol. technol.* 2011; 54(2): 259-265.
- [71]. Subhadra B, Kim DH, Woo K, Surendran S, Choi C. Control of Biofilm Formation in Healthcare: Recent Advances Exploiting Quorum-Sensing Interference Strategies and Multidrug Efflux Pump Inhibitors. *Materials.* 2018; 11(9): 1676.
- [72]. Kekeç Ö. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Suşunda Sıcaklık, Ph ve Klor Streslerine Karşı Biyofilm Oluşumunu Tetikleyen Genlerin Etkinliğinin Real-Time Pcr Yöntemi İle Belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2014.
- [73]. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *JCI.* 2003; 112(10): 1460–1465.
- [74]. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT et al. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312(2): 417–423.

- [75]. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Infect Public Health*. 2009; 2 (3): 101-111.
- [76]. Timur D. Yoğun Bakım Hastalarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi ve Antibiyotik Duyarlılığı [Tıpta Uzmanlık Tezi]. Kayseri: T.C. Erciyes Üniversitesi; 2016.
- [77]. İbrahim B, Heydarlou MM. Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının direnç mekanizmaları ve tedavi seçenekleri. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences*. 2020; 7(11): 28-43.
- [78]. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(1): 42-51.
- [79]. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011; 19(8), 419-426.
- [80]. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5): 634–640.
- [81]. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015; 6: 660.
- [82]. Lambert P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*. 2002; 95(ek 41): 22.
- [83]. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1794(5): 808-816.
- [84]. Yüce A. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik*. 2001; 14(2): 41-46.
- [85]. Hashem H, Hanora A, Abdalla S, Shawky A, Saad A. Carbapenem Susceptibility and Multidrug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Egypt. *Jundishapur J Microbiol*. 2016; 9 (11): 1-6.
- [86]. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front. Microbiol*. 2014; 8(4): 422-425.
- [87]. Hashemian S, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: özelliklerinin, işlevinin ve yoğun bakımda kullanımının gözden geçirilmesi. *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 1759-1767.
- [88]. Usluer G. Oksazolidinonlar. *Ankem Derg*. 2006; 20(ek 2): 108-111.

- [89].Freeman, DJ, Falkiner, FR, Keane CT. New Method For Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococc, I. J. Clin. Pathol. 1989; 42: 872–874.
- [90].Tré-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Int J Antimicrob Agents. 2008; 31(4): 329–336.
- [91].CLSI Publishes M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition [Internet]. 2021 [Erişim Tarihi 5 Ocak 2022]. Erişim adresi: <https://clsi.org/>
- [92].Deka N. Comparison of tissue culture plate method, tube method and congo red agar method for the detection of biofilm formation by coagulase negative Staphylococcus isolated from non-clinical isolates. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(10): 810-815.
- [93].Wagner VE, Li L-L, Isabella VM, Iglewski BH, Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem. 2007; 387(2):469-479.
- [94].Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context.2018; 7:1–18.
- [95].Er H, Şen M, Altındış M. İdrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas Aeruginosa*’larda antibiyotik direnci. Turkish Journal of Clinics and Laboratory. 2015; 6(3):80-84.
- [96].Zhang X, Niu S, Zhang L. Antimicrobial susceptibilities and clinical characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. Urol. İnt. 2014; 93(4): 464–469.
- [97].Estaji M, Tabasi M, Sadeghpour Heravi F, Kheirvari Khezerloo J, Radmanesh A, Raheb J ve ark. Genotypic identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019; 65: 23–28.
- [98].Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019; 37(1):177-192.
- [99].Dundar D, Otkun M. In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Yonsei Med J. 2010; 51(1):111-116.

- [100].Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013; 67(3):159-173.
- [101].Wang GQ, Li TT, Li ZR, Zhang LC, Zhang LH., Han L ve ark. Effect of negative pressure on proliferation, virulence factor secretion, biofilm formation, and virulence-regulated gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *BioMed Res Int*. 2016; 7.
- [102].Santos DA, Nascimento MM, Vitali LH, Martinez R. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):299-303.
- [103].Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes* . 2020; 13(1):1-27.
- [104].Armengol E, Asunción T, Viñas M, Sierra JM. When Combined with Colistin, an Otherwise Ineffective Rifampicin-Linezolid Combination Becomes Active in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2020;8(1): 86.
- [105].Gültepe B, Iraz M, Ceylan A, Doymaz MZ. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Direnci. *Ankem Dergisi*. 2014; 28(1): 32-36.
- [106].Bhuiya M, Sarkar M, Sohag MH, Ali H, Roy CK, Akther L ve ark. Enumerating Antibiotic Susceptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Sources in Dhaka City. *Open Microbiol J*. 2018; 12: 172–180.
- [107].Javiya VA, Ghatak SB, Patel KR, Patel JA. Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian J Pharmacol*. 2008; 40(5): 230–234.
- [108].Raja NS, Singh NN. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J Microbiol Immunol Infect*. 2007; 40(1): 45–49.
- [109].Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns*. 2006; (32)3:343-347.
- [110].Fujimura T, Anan N, Sugimori G, Watanabe T, Jinushi Y, Yoshida I ve ark. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan to doripenem and other antipseudomonal agents. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; (34)6: 523- 528.

- [111].Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Gen. Mol. Res.* 2003; 2(1):48-62.
- [112].Thi M, Wibowo D, Rehm B. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(22):8671.
- [113].World Health Organization. Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2017.
- [114].Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* 2014; 68(1):1–12.
- [115].Rollet C, Gal L, Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 290(2):135–142.
- [116].Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JK. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev Med Microbiol.* 2006;17(2):45-54.
- [117].Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(15):5238–5246.
- [118].Stempel N, Neidig A, Nusser M, Geffers R, Vieillard J, Lesouhaitier O ve ark. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One.* 2013; 8(12):1-12.
- [119].Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR, Wozniak DJ. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol.* 2004; 186(14):4466–4475.
- [120].Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10(6):644–648.
- [121].Billings N, Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, Stocker R ve ark. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens.* 2013; 9(8):1-12.

- [122].Szczuka E, Kaznowski A. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiol (Praha)*. 2014; 59: 283-288.
- [123].Filik F, Kubilay A. Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumunun Farklı İn Vitro Metodlarla Tespiti. *Acta Aquat. Turc.* 2019; 15 (3): 378-390.
- [124].Tursun MF. Non-Fermentatif Gram Negatif Bakterilerde Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Elazığ: Fırat Üniversitesi; 2018.
- [125].Kunwar A, Shrestha P, Shrestha S, Thapa S, Shrestha S, Amatya NM, Detection of biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns Open*. 2021; 5(3):125-129.
- [126].Delissalde F, Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24(4): 405-408.
- [127].Masadeh MM, Mhaidat NM, Alzoubi KH, Hussein EI, Al-Trad EAI. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. *Infect Drug Res*. 2013; 6: 27.
- [128].Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; (27)3: 196-200.
- [129].Ahmed MN, Porse A, Sommer M, Høiby N, Ciofu O. Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(8): 1-12.
- [130].Swapna M, Sumathi G, Anitha M. Correlation of biofilm production with antibiotic susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical specimens. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2022 13(1), 88–92.
- [131].Kaplan JB. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 737–751.

EKLER

EK 1. Kaynak Orjinallik Raporu Turnitin

P. aeruginosa SUŞLARININ LİNEZOLİD ORTAMINDA BİYOFİLM YAPISININ İNCELENMESİ.

ORJİNALLİK RAPORU

% 28	% 28	% 4	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 18
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	ikee.lib.auth.gr İnternet Kaynağı	% 1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	dosyayukleme.ahievran.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.esp.org İnternet Kaynağı	<% 1
9	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1

Ek- 2. Etik Kurul

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“P. Aeruginosa Suşlarının Linezolid Ortamında Biyofilm Yapısının İncelenmesi”
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Bağbaşı Yerleşkesi Merkez/KIRŞEHİR
	TELEFON	0386 280 3924
	FAKS	0386 280 5007
	E-POSTA	tipetikkurul@ahievran.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Samsun				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
FAZ 4		<input type="checkbox"/>				
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>				
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>				
	İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Kemal ÖZAYURT
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Sayfa 1/3

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"P. Aeruginosa Suşlarının Linezolid Ortamında Biyofilm Yapısının İncelenmesi"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.12.2021	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	01.12.2021	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2021-20/199	Tarih: 07/12/2021					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantı yeter sayısı sağlandığı için katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Kemal ÖZYURT
07/12/2021 tarihinde aşağıdaki kişiler online olarak toplantıya katılmışlardır.	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
			E	K	E	H	E	H
Prof. Dr. Kemal ÖZYURT	Deri ve Zührevi Hastalıklar	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Recai DAĞLI	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Dilek KUZAY	Fizyoloji	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Ayla ÜNSAL	Hemşirelik	Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Kemal ÖZYURT
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"P. Aeruginosa Suşlarının Linezolid Ortamında Biyofilm Yapısının İncelenmesi"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Dr. Öğr. Üyesi Gülhan ÜNLÜ	Tıbbi Farmakoloji	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ÇELİK	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Fatmanur Aybala KOÇAK	Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Naime Meriç KONAR	Biyostatistik ve Tıp Bilişimi	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Arif Hüdai KÖKEN	Tıp Tarihi ve Etik	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Uzm. Dr. Uğur GÖNÜL	Halk Sağlığı	Petlas A.Ş.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Eczacı Ayşegül GÜVENÇ	Eczacı	Kırşehir Eğitim ve Araş. Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Uzm. Dr. Murat DOĞAN	Aile Hekimliği	Kırşehir Eğitim ve Araş. Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Öğr. Gör. Murat TURPÇU	Hukuk	Ahi Evran Ün. Sosyal Bilimler MYO	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
V.H.K.İ Yasin KILIÇ	Memur	Ahi Evran Ün. TÖMER Merkezi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Dr. Öğr. Üyesi Mümtaz DADALI	Üroloji	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Kemal **ÖZMURAT**
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Sayfa 3/3

Ek-3 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ahmet KÖREMEZLİ

Eğitim Bilgileri			
Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Hemşirelik Yüksek Okulu/ Hemşirelik	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi	2014-2018
Y. Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Tıp	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi	Devam Ediyor

Makale ve Bildiriler
Uluslararası Hakemli Dergilerde Makaleler
Köremezli A, Kariptaş E, Erdem B. Bakteriyel Mikroorganizmalarda Bir Savunma Sistemi: “Biyofilm” . Black Sea Journal of Health Science. 2022; 5 (1): 153-161.