

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOFLİM ENFEKSİYONLARININ  
PATOGENEZİNİN KİNETİK DEĞERLENDİRMESİ**

ALİ ALVANDIAN

**MİKROBİYOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2016**

**TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970073**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOFİLM ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİNİN  
KİNETİK DEĞERLENDİRMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali ALVANDİAN**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Meral KARAMAN

**TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2013970073**

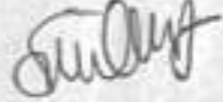
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi

**Ali ALVANDIAN, -BİYOFİLM ENFEKSİYONLARININ  
PATOGENEZİNİN KİNETİK DEĞERLENDİRMESİ"**

konulu Yüksek Lisans tezini 28.12.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

  
**Doç. Dr. Meral KARAMAN**  
**BAŞKAN**  
DEÜ. Tıp Fakültesi

  
**Prof. Dr. Osman YILMAZ**  
Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıp Fakültesi  
**ÜYE**

  
**Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM**  
Ege Üniversitesi. Tıp Fakültesi  
**ÜYE**

**Prof.Dr. Şöhret AYDEMİR**  
Ege Üniversitesi. Tıp Fakültesi  
**YEDEK ÜYE**

**Prof.Dr. Alper BAĞRIYANK**  
Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıp Fakültesi  
**YEDEK ÜYE**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER .....                                              | iv  |
| TABLO LİSTESİ.....                                             | vi  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                             | vii |
| KISALTMALAR .....                                              | ix  |
| TEŞEKKÜR.....                                                  | x   |
| ÖZET .....                                                     | xi  |
| ABSTRACT .....                                                 | xiv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                         | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                        | 3   |
| 2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesi.....                     | 3   |
| 2.2. <i>Klebsiella</i> türleri.....                            | 6   |
| 2.2.1. Tarihçe ve sınıflandırma.....                           | 6   |
| 2.3. <i>Klebsiella</i> türlerinin tanımlanması .....           | 7   |
| 2.4. Epidemiyoloji.....                                        | 9   |
| 2.5. Virülans Faktörleri .....                                 | 11  |
| 2.5.1. Kapsüler Polisakkarit.....                              | 11  |
| 2.5.2. Lipopolisakkarit.....                                   | 11  |
| 2.5.3. Fimbriya .....                                          | 11  |
| 2.5.4. Siderofor .....                                         | 12  |
| 2.5.5. Biyofilm .....                                          | 13  |
| 2.6. Biyofilm oluşumunun basamakları.....                      | 15  |
| 2.7. Hayvan modelleri ve laboratuvar hayvanı olarak fare ..... | 20  |
| 2.7.1. Farede akciğer enfeksiyonu modeli .....                 | 23  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                       | 29  |
| 3.1. Araştırmanın tipi .....                                   | 29  |
| 3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı .....                         | 29  |
| 3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....                     | 29  |
| 3.4. Çalışma materyali .....                                   | 30  |
| 3.5. Araştırmanın değişkenleri.....                            | 30  |
| 3.6. Veri toplama araçları .....                               | 31  |
| 3.6.1. Deney hayvanları .....                                  | 33  |
| 3.6.2. Bakteriyel köken: .....                                 | 33  |
| 3.6.3. Biyofilm hücrelerinin elde edilmesi .....               | 33  |
| 3.6.4. Enfeksiyon modeli.....                                  | 34  |
| 3.6.5. Bronkoalveoler lavaj uygulaması .....                   | 37  |
| 3.6.6. Akciğer dokusunda bakteriyel yükün belirlenmesi .....   | 38  |
| 3.6.7. Sitokin yanıtlarının belirlenmesi .....                 | 39  |
| 3.6.8. Histopatolojik analizler .....                          | 42  |



|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.8.1. Rutin doku takip protokolü .....                                         | 42        |
| 3.6.8.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü .....                                  | 43        |
| 3.6.9. Taramalı Elektron Mikroskobu ile ETT biyofilm yapıların gösterilmesi ..... | 45        |
| 3.6.10. İstatistiksel analiz .....                                                | 46        |
| <b>3.7. Araştırma planı ve takvimi .....</b>                                      | <b>46</b> |
| <b>3.8. Verilerin değerlendirilmesi .....</b>                                     | <b>47</b> |
| <b>3.10. Etik kurul onayı .....</b>                                               | <b>49</b> |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                          | <b>49</b> |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                          | <b>71</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                                 | <b>77</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                                         | <b>79</b> |
| <b>8. EKLER .....</b>                                                             | <b>87</b> |



## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 1.</b> <i>Enterobacteriaceae</i> ailesi sınıflaması.....                                                    | <b>4</b>  |
| <b>Tablo 2.</b> Hayvanlarda pnömoni oluşturmak amacıyla kullanılan farklı yöntemlerin avantaj ve dezavantajları..... | <b>24</b> |
| <b>Tablo 3.</b> Deney grupları.....                                                                                  | <b>28</b> |
| <b>Tablo 4.</b> Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.....                                                         | <b>30</b> |
| <b>Tablo 5.</b> Rutin doku takibi protokolü.....                                                                     | <b>41</b> |
| <b>Tablo 6.</b> Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....                                                             | <b>43</b> |
| <b>Tablo 7.</b> Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları.....                                   | <b>48</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. <i>Enterobacteriaceae</i> hücre yapısı .....                                                                                               | 6  |
| Şekil 2. <i>K. pneumoniae</i> Gram boyalı preparat ve kapsül görünümü .....                                                                         | 7  |
| Şekil 3. <i>K. pneumoniae</i> IMViC test sonuçları ve TSI agarda görünümü .....                                                                     | 8  |
| Şekil 4. <i>K. pneumoniae</i> 'nın EMB ve MacConkey agarda görünümü .....                                                                           | 8  |
| Şekil 5. Antoni van Leeuwenhoek tarafından çizilen dental plak üzerindeki bakteriler .....                                                          | 13 |
| Şekil 6. Biyofilm gelişiminin beş evresi.....                                                                                                       | 14 |
| Şekil 7. Rodent sınıflandırma .....                                                                                                                 | 21 |
| Şekil 8. Fare barındırma kafesi, pelet yem, arıtılmış su, altlık materyali ve BALB/c fare .....                                                     | 22 |
| Şekil 9. Fare göğüs boşluğu organları .....                                                                                                         | 23 |
| Şekil 10. Endotrakeal tüp ve biyofilm hücreleri elde etme işlemi.....                                                                               | 34 |
| Şekil 11. IVC kafes etiketleme sistemi ve kafes içinde BALB/c fareler.....                                                                          | 35 |
| Şekil 12. Ege Üniversitesi, ARGEFAR IVC kafes sistemi .....                                                                                         | 36 |
| Şekil 13. Planktonik ve biyofilm grupları çalışma prosedürü .....                                                                                   | 37 |
| Şekil 14. Fareden BAL alma uygulaması .....                                                                                                         | 38 |
| Şekil 15. Fareden kan alma uygulaması .....                                                                                                         | 38 |
| Şekil 16. <i>K. pneumoniae</i> B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde zamana bağlı olarak hayatta kalma .....                 | 50 |
| Şekil 17. MHA agarda <i>K. pneumoniae</i> üremesi .....                                                                                             | 51 |
| Şekil 18. <i>K. pneumoniae</i> B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde zamana bağlı olarak bakteriyal yükte değişiklikler..... | 51 |
| Şekil 19. <i>K. pneumoniae</i> B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde IL-10 sitokin yanıtları .....                           | 52 |
| Şekil 20. <i>K. pneumoniae</i> B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde TNF-alfa sitokin yanıtları .....                        | 53 |
| Şekil 21. Kontrol ve biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü .....                                                                                       | 54 |
| Şekil 22. Kontrol ETT ve biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü.....                                                                                    | 55 |
| Şekil 23. Kontrol ETT SEM görüntüsü (110X).....                                                                                                     | 56 |
| Şekil 24. Kontrol ETT SEM görüntüsü (141X).....                                                                                                     | 56 |
| Şekil 25. Kontrol ETT SEM görüntüsü (324 X).....                                                                                                    | 57 |
| Şekil 26. kontrol ETT SEM görüntüsü (1.28 KX).....                                                                                                  | 57 |
| Şekil 27. Kontrol ETT SEM görüntüsü (1.93 KX).....                                                                                                  | 58 |
| Şekil 28. Kontrol ETT SEM görüntüsü (3.61 KX).....                                                                                                  | 59 |
| Şekil 29. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (110X) .....                                                                                           | 59 |
| Şekil 30. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (141X) .....                                                                                           | 59 |
| Şekil 31. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (324X) .....                                                                                           | 60 |
| Şekil 32. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (1.28 KX) .....                                                                                        | 60 |
| Şekil 33. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (1.93 KX) .....                                                                                        | 61 |
| Şekil 34. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (3.61KX) .....                                                                                         | 62 |
| Şekil 35. PBS verilen gruba ait akciğer doku kesitlerinin HE boyama .....                                                                           | 62 |
| Şekil 36. Zamana bağlı akciğer doku kesitleri HE boyama.....                                                                                        | 63 |
| Şekil 37. PBS verilen gruba ait akciğer doku kesitleri HE boyama (X20).....                                                                         | 64 |
| Şekil 38. Biyofilm grubu 6. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20).....                                                                        | 64 |
| Şekil 39. Biyofilm grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40).....                                                                       | 65 |
| Şekil 40. Biyofilm grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20).....                                                                       | 65 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 41.</b> Biyofilm grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40).....   | 66 |
| <b>Şekil 42.</b> Biyofilm grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20).....   | 67 |
| <b>Şekil 43.</b> Biyofilm grubu 72. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40).....   | 67 |
| <b>Şekil 44.</b> Biyofilm grubu 96. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40).....   | 67 |
| <b>Şekil 45.</b> Planktonik grubu 6. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40).....  | 68 |
| <b>Şekil 46.</b> Planktonik grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)..... | 69 |
| <b>Şekil 47.</b> Planktonik grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)..... | 69 |
| <b>Şekil 48.</b> Planktonik grubu 72. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)..... | 70 |
| <b>Şekil 49.</b> Planktonik grubu 96. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)..... | 70 |



## KISALTMALAR

**BAL:** Bronkoalveoler lavaj (Bronchoalveolar lavage)  
**CAE:** Cerrahi alan enfeksiyonu  
**CPS:** Kapsüler polisakkarit  
**CV:** Konvansiyonel (Conventional)  
**DF:** Defined flora (Tanımlanmış flora)  
**EMB:** Eosin Methylene Blue  
**EPS:** Ekzopolisakkarit  
**ETT:** Endotrakeal tüp (Endotracheal tube)  
**GF:** Germ-free  
**Gİ:** Gastrointestinal  
**GN:** Gnotobiyotik (Gnotobiotic)  
**GSBL:** Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz  
**HE:** Hematoksilen Eozin  
**IVC:** Bireysel havalandırılmalı kafes (Individually Ventilated Cage)  
**İYE:** İdrar yolu enfeksiyonları  
**KDE :**Kan dolaşımı enfeksiyonu  
**LPS:** Lipopolisakkarit  
**MHA:** Mueller Hinton Agar  
**MHB:** Mueller Hinton Broth  
**Pet CT:** Pozitron emisyon tomografisi (Positron emission tomography–computed tomography)  
**SEM:** Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)  
**SOR:** Serbest oksijen radikalleri  
**SPF:** Özel patojenlerden arındırılmış (Specific-pathogen-free)  
**SYE:** Solunum yolu enfeksiyonu  
**TLR:** Toll benzeri reseptör (Toll-like receptor)  
**VİP:** Ventilator ile ilişkili pnömoni

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bütün tecrübe, bilgi ve birikimlerini aktaran, bilimsel ve akademik anlamda her türlü desteği sağlayan, sabrı ve ilgisiyle hem kişisel hem de bilimsel gelişimime büyük katkıları olan, yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, örnek aldığım danışman hocam Doç. Dr. Meral Karaman'a, çalışmalarım sırasında desteklerini sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma her konuda bana sonsuz destek olan ve sabırla yanımda duran çok sevgili aileme, Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ali ALVANDAİN  
İzmir -2016

# BİYOFLİM ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİNİN KİNETİK DEĞERLENDİRMESİ

Ali Alvandian

Dokuz Eylül Üniversitesi Mikrobiyoloji

## ÖZET

### Amaç:

*Klebsiella pneumoniae* özellikle hastane kökenli akciğer enfeksiyonlarında sıklıkla karşılaştığımız Gram negatif fırsatçı bir patojendir. Enfeksiyonun gelişmesinde konakçı savunma sistemlerinin yanısıra bakteriye özgü çeşitli virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda özellikle intravasküler katater, üriner katater ve kalıcı tıbbi cihazlar gibi invazif girişim uygulanan hastalarda enfeksiyonun gelişmesinden biyofilm yapı sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm formasyonu çeşitli kronik ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar ile ilişkili olup insan vücudundaki tüm mikrobiyal enfeksiyonların %80'inden sorumlu tutulmaktadır. Planktonik (serbest formda) hücrelerle karşılaştırıldığında biyofilmin temel özelliği antimikrobiyallere, immunolojik ve kimyasal savunma mekanizmalarına karşı artmış dirençtir. Mikroorganizmanın biyofilm oluşum süreci içinde konakçıdaki davranışlarının açıklanması, immünolojik ve doku düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi klinik açıdan hastaya yaklaşım ve sağaltım alternatifleri konusunda katkıda bulunabileceği gibi, dirençli suşlarla kolonizasyonu ve bu suşların toplumda yayılmasını azaltabilir,

### Yöntem :

*K. pneumoniae* B5055 (serotip O1:K2) kökeni planktonik (serbest formda) ve biyofilm

hücreleri farelere intranazal yol ile verilerek akut pnömoni modeli oluşturuldu. Biyofilm formdaki hücrelerin eldesi için endotrakeal tüp (ETT) yöntemi kullanıldı. Bakteri MHA besiyerine pasajlanarak 37°C da 18 saat inkübe edildi. Ertesi gün üreyen koloniler tüp içindeki MHB besiyerine alındı. Steril ETT 20 mm' lik parçalara ayrılarak bu besiyerine aktarıldı. ETT parçası, 18 saat sonra steril PBS ile yıkandı, taze MHB besiyeri içeren tüpe alındı. Bu işlem üç gün süresince tekrarlandı. ETT parçaları Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscope; SEM) yardımıyla incelendi. Daha sonra ETT steril PBS ile yıkandı ve hücreler  $10^4$  CFU/ mL olacak şekilde dilüe edildi.

Konvensiyonel olarak yetiştirilen BALB/c soyu fareler; Grup 1; planktonik (n=30), grup 2; biyofilm (n=30) hücreleri ve grup 3; fosfat tampon (PBS) verilen grup olmak üzere (n=6) bireysel havalandırılmalı kafeslere ayrıldı. Grup 1 ve 2 de yer alan farelerden 6 tanesi 6-24-48-72 ve 96. saatlerde sakrifiye edildi. Daha sonra kan örneği, bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı ve akciğer dokusu alındı. BAL örneğinde IL-10 ve TNF alfa düzeyleri ölçülürken, akciğer dokusundan bakteriyel yük ve histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

### **Bulgular:**

Grupların hayatta kalma oranlarına bakıldığında 96. saat sonunda her üç grupta da ölüm gözlenmedi. Akciğer doku homojenatlarından yapılan kantitatif kültür ekimleri sonucunda PBS verilen grupta 96 saat sonunda herhangi bir bakteri üremesi saptanmazken, planktonik ve biyofilm gruplarında *K. pneumoniae* üremesi saptandı. Her iki grupta da 24. saate kadar logaritmik üreme gözlemlendi. Bu saatten itibaren yapılan 48, 72 ve 96. saat değerlendirmelerinde biyofilm grubunda bakteriyel yük aynı düzeyde devam ederken planktonik hücreler ile enfekte grupta düşüş belirlendi. ( $p<0.000$ ) Etken inokule edildikten 24 saat sonra her iki grupta TNF alfa ve IL-10 düzeylerinin en yüksek noktaya ulaştığı görüldü. Biyofilm grubunda TNF alfa düzeylerinde artış, planktonik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ( $p<0.003$ ) Her iki grupta da akciğer doku kesitlerinde 6.saatte PMNL infiltrasyonu gözlemlendi. Akciğer hasarının ve PMNL infiltrasyonunun 24.saatten itibaren arttığı saptanmakla birlikte gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



## **Sonuç:**

Bu çalışmada, farede, *K. pneumoniae* ile oluşturulan akut akciğer enfeksiyonu modelinde bakteriyel yük, proenflamatuvar sitokin yanıtları ve akciğerde doku düzeyinde değişiklikler zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde; biyofilm formunun enfeksiyonun başlangıç döneminde bakteriye bir üstünlük sağlamadığı saptanmıştır. Ancak biyofilm ile enfekte grupta bakterinin solunum yollarından temizlenemediği ve enfeksiyonun kronikleşmeye eğilimli olduğu gözlenmiştir. Olasılıkla biyofilm yapı, etrafındaki ekzopolisakkarit matriks yapı aracılığı ile patojen bakterilerin bağışıklık sistemi hücrelerinden gizlenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle mortalite ve morbidite artışlara ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan biyofilm enfeksiyonları ile mücadelede, biyofilm matriksin hedef alınması ve antimikrobiyal sağaltımla kombinasyonu daha uygun bir yaklaşım olabilir.

**Anahtar Sözcükler:** *Klebsiella pneumoniae*, biyofilm, fare, akut pnömoni modeli

# KINETIC EVALUATION OF PATHOGENESIS OF BIOFILM INFECTIONS

Ali Alvandian

**Dokuz Eylül University Department of Microbiology**

## ABSTRACT

### **Objective:**

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram negative opportunistic pathogen, which we frequently encounter in hospital-acquired pulmonary infections. In addition to host defense systems, various bacterial virulence factors play an important role in the development of infection.

In recent years, biofilm structure has been implicated in the development of infection especially in patients who are invasive intervention such as intravascular catheter, urinary catheter and permanent medical devices. Biofilm formation is associated with a variety of chronic and recurrent infections and accounts for 80% of all microbial infections in the human body. When compared to planktonic (free-form) cells, the basic feature of biofilm is increased resistance to antimicrobials, immunological and chemical defense mechanisms. Identification of the behavior of microorganisms in the host during the biofilm formation process, determination of changes in immunological and tissue levels may contribute to clinic approach to the patient and

treatment alternatives, as well as colonization with resistant strains and reduction of spread of these strains in the community,

### **Material and Method:**

Acute pneumonia model was established by intranasal administration of *K. pneumoniae* B5055 (serotype O1: K2) root planktonic (in free form) and biofilm cells to mice. The endotracheal tube (ETT) method was used for the removal of cells in biofilm form.

Bacteria were passaged in MHA medium and incubated for 18 hours at 37 ° C. The following day, breeding colonies were taken into MHB medium in the tube. Sterile ETT was transferred to this medium by dividing 20 mm pieces. The ETT piece was washed with sterile PBS after 18 hours, and fresh tuft containing MHB medium was removed. This process was repeated for three days. Conventionally grown BALB/c strain mice; Group 1; Planktonic (n = 30), group 2; Biofilm (n = 30) cells and group 3; Were divided into individual ventilated cages (n = 6) in phosphate buffered saline (PBS). Six of the mice in Groups 1 and 2 were 6-24-48-72 and 96. The hours were sacrificed. Then blood sample, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung tissue were taken. IL-10 and TNF alpha levels were measured in BAL samples, and bacterial load and histopathologic changes were evaluated in lung tissue.

### **Results:**

When the survival rates of the groups were examined, deaths were not observed in all three groups at the end of the 96th hour. As a result of quantitative culturing from lung tissue homogenates, *K. pneumoniae* remission was detected in planktonic and biofilm groups while no bacterial spillage was detected after 96 hours in the PBS group. Logarithmic growth was observed up to 24 hours in both groups. At 48, 72 and 96 hours after this time, the bacterial load in the biofilm group remained at the same level, while the decrease in the planktonic cells and the infected group was determined. (p <0.000) TNF alpha and IL-10 levels reached the highest point in both groups 24 hours after the agent was inoculated. The increase in TNF alpha

levels in the biofilm group was statistically significant compared to the planktonic group. ( $p < 0.003$ ) PMNL infiltration was observed in lung tissue sections at 6 hours in both groups. Although lung injury and PMNL infusion increased after 24 hours, there was no significant difference between the groups.

## **Conclusion**

In this study, when the changes in bacterial load, proinflammatory cytokine responses, and tissue levels in the lung were evaluated in the rat in the model of acute lung infection induced by *K. pneumoniae*, It has been found that the biofilm form does not provide a bacterial superiority during the initial period of infection. However, in the biofilm-infected group, it was observed that the bacterium could not be cleared from the respiratory tract and that the infection was prone to becoming chronic. The biofilm structure, possibly through the exopolysaccharide matrix structure around it, helps the pathogenic bacteria to hide from the cells of the immune system. Therefore, combining biofilm matrix targeting with antimicrobial treatment and combating biofilm infections leading to increased mortality and morbidity and severe economic loss may be a more appropriate approach.

**Key words :** *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, mouse, acute pneumonia model



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

### 1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Solunum yolu hastalıkları toplumda en fazla görülen enfeksiyon hastalıklarıdır. Dünyada; tüm ölüm nedenleri arasında altıncı, enfeksiyona bağlı ölüm nedenleri arasında 1. sırada yer almaktadır. *Klebsiella pneumoniae* özellikle hastane kökenli akciğer enfeksiyonlarında sıklıkla karşılaştığımız Gram negatif fırsatçı bir patojendir. Enfeksiyonun gelişmesinde konakçı savunma sistemlerinin yanısıra bakteriye özgü çeşitli virülans faktörleride önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda özellikle intravasküler katater, üriner katater ve kalıcı tıbbi cihazlar gibi invazif girişim uygulanan hastalarda enfeksiyonun gelişmesinden biyofilm yapı sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm, bakteri tarafından üretilen ve bakterinin canlı ya da cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarit yapısında bir “glikokaliks” tabakası şeklinde tanımlanabilir. Planktonik (serbest formda) hücrelerle karşılaştırıldığında biyofilmin temel özelliği antimikrobiyallere, immunolojik ve kimyasal savunma mekanizmalarına karşı artmış dirençtir. Mikroorganizmanın biyofilm oluşum süreci içinde konakçıdaki davranışlarının açıklanması, immünolojik ve doku düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi klinik açıdan hastaya yaklaşım ve sağaltım alternatifleri konusunda katkıda bulunabileceği gibi, dirençli suşlarla kolonizasyonu ve bu suşların toplumda yayılmasını azaltabilir, bu yaklaşımlar ekonomik çıktılarına yansiyabilir.

### 1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada; *Klebsiella pneumoniae* ve birçok mikroorganizma için önemli bir virülans faktörü olan biyofilm yapının gelişim süreci içinde konakçıda neden olduğu değişikliklerin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *K. pneumoniae* B5055 suşu planktonik ve biyofilm hücreleri farelerde intranazal yolla akut akciğer enfeksiyonu modeli oluşturulmuştur.

### 1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri

Farede, *K. pneumoniae* planktonik ve biyofilm hücreleri ile oluşturulan akut akciğer enfeksiyonu modelinde bakteriyel y k, proenflamatuvar sitokin yanıtları ve akciğerde doku düzeyinde değişiklikler açısından zamana bağlı olarak fark vardır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Enterobacteriaceae* ailesi

*Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler Gram negatif, sporsuz, fakültatif anaerob basillerdir. “Enterik bakteriler” olarak da adlandırılmaktadır. Toprakta, suda, bitkilerde bulunabilmekte olup, insan ve hayvanların gastrointestinal (Gİ) sistemlerinde yerleşebilirler. Küçük, 0.5-3 µm en ve 1-6 µm boyundadırlar. Peritrik kirpikler ile hareketli türler bulunmakla birlikte bazı türler hareketsizdir. DNA’da Guanin+Sitozin (G+C) oranı %39-59 arasındadır. Enterik bakterilerde, kapsül veya slime tabakası ince bir kılıf şeklinde hücreyi sarabilir. Fakültatif anaerob üreme özelliğine sahip bu bakteriler pepton veya et özlü basit besiyerlerinde kolayca üreyebilmektedir. Birçoğu glukozu Embden–Meyerhof Parnas yolu ile piruvik asit gibi ara ürünler oluşturarak yıkarlar. Son ürün olarak karmaşık asitler oluşur.

Bu özellik tanı algoritmasında kullanılmaktadır. Metil kırmızısı testi ile karışık asitlerin varlığı gösterilebilmektedir. *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinsleri glukoz fermantasyonunda diğer enterik bakterilerden farklı olarak. butanediol fermantasyonu yolunu kullanırlar. Butanediol fermantasyonunda yan ürün olarak aseton oluşmaktadır. Bu nedenle bu grup için metil kırmızısı testi negatif iken Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif olur. Bunun yanı sıra çoğunlukla gaz yaparlar. Nitratı nitrite çevirebilme özelliğine sahiptirler. (1)

Enterik bakteriler, çok sayıda, ortak yapısal özelliğe sahiptir. Hücre duvarı çok tabakalı bir yapı gösterir. Peptidoglikan, lipoprotein, fosfolipit, protein ve lipopolisakkarit (LPS) tabakalardan oluşmaktadır. Peptidoglikan - lipoprotein tabakası hücre duvarının yaklaşık %20’sini oluşturur. Peptidoglikan organizmaya sertliğini, şeklini veren çapraz bağlanmış polimerlerdir. Kalan %80’lik bölümde de LPS, transportta görevli olan multimerik porin proteinleri ve iki katlı fosfolipit tabakadan oluşmaktadır. LPS özel polisakkarit yan zincirlerle, çeşitli cinslerin antijenitesini belirtir. Ayrıca hücrenin endotoksik aktivitesinden sorumludur. (2)

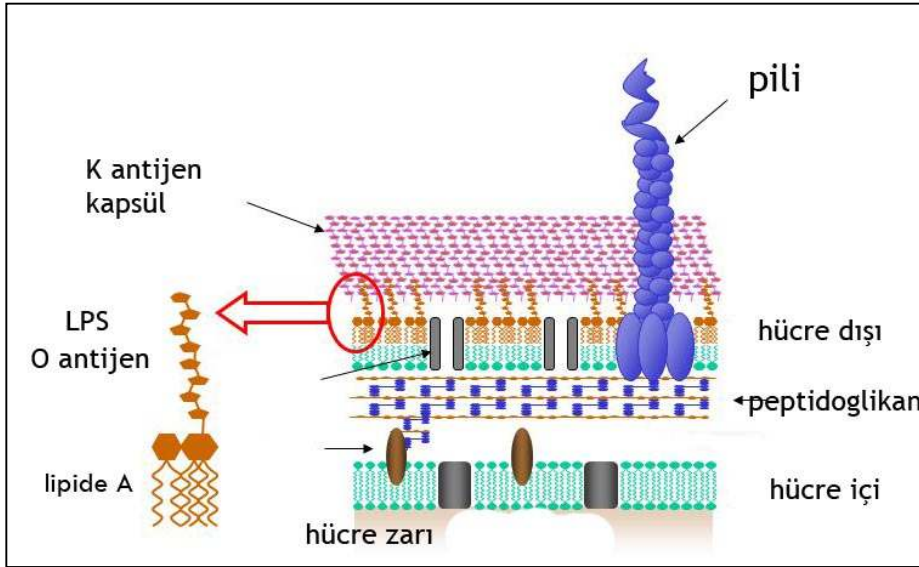


*Enterobacteriaceae* ailesi yaklaşık 100 tür içermektedir. (Tablo 1)  
*Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerde dış duvarda “O” antijenleri (Somatik), K (Kapsül) veya yüzey antijenleri, kirpikli suşlarda “H” (Kirpik=Flagella) antijenleri bulunur. (Şekil 1) O antijenleri; dış duvardaki LPS’den oluşur. Isıya, alkole ve asite dayanıklı, formaldehite dirençlidir. Polisakkarit yapıdadır. Antiserumda genellikle IgM antikorları ile aglütine olur. Çapraz reaksiyon verebilir.

Virulan suşlarda düz yapıdadır. H antijeni; hareketli suşlarda bulunur. Isı, asit ve alkole duyarlı, formaldehite dirençlidir. IgG yapıda antikorlarla aglütinasyon verir. *Escherichia* ve *Salmonella* serotiplendirmesini sağlar. Normalde O antijenine baskındır, denatüre edilebilir. K antijeni; kalın polisakkarit yapıda, *Escherichia*’da protein yapıdadır. Isıya kısmen duyarlıdır. Bazen “Slime” şeklindedir. O antijeni ile aglütinasyonunu önledikleri için denatüre edilmelidir. (2)

**Tablo 1.** *Enterobacteriaceae* ailesi sınıflaması

| <b>Cins</b>                                    | <b>Tür</b>                                                     |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>Citrobacter</i>                             | <i>freundii</i><br><i>koseri</i><br><i>amalonaticus</i>        |
| <i>Edwardsiella</i>                            | <i>tarda</i>                                                   |
| <i>Enterobacter</i>                            | <i>aerogenes</i><br><i>cloacae</i><br><i>sakasakii</i>         |
| <i>Escherichia</i>                             | <i>coli</i><br><i>albertii</i>                                 |
| <i>Hafnia</i>                                  | <i>alvei</i>                                                   |
| <i>Klebsiella</i>                              | <i>pneumoniae</i> ,<br><i>oxytoca</i> ,<br><i>granulomatis</i> |
| <i>Morganella</i>                              | <i>morganii</i>                                                |
| <i>Pantoea</i> ( eskiden <i>Enterobacter</i> ) | <i>agglomerans</i>                                             |
| <i>Pantoea</i>                                 | <i>shigelloides</i>                                            |
| <i>Proteus</i>                                 | <i>mirabilis</i><br><i>vulgaris</i>                            |
| <i>Providencia</i>                             | <i>stuartii</i><br><i>rettgeri</i>                             |



Şekil 1. *Enterobacteriaceae* hücre yapısı

Enterik bakteriler, gastrointestinal sistem (Gİ) dışındaki yerleşim bölgelerinde önemli enfeksiyonlar yapabilirler. Sıklıkla üriner sistem, solunum sistemi, merkezi sinir sistemi, kan ve yara yeri enfeksiyonlarına neden olurlar. Günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli ve sık karşılaşılan sorunları arasında yer almaktadırlar. (3,4)

## 2.2. *Klebsiella* türleri

### 2.2.1. Tarihçe ve sınıflandırma

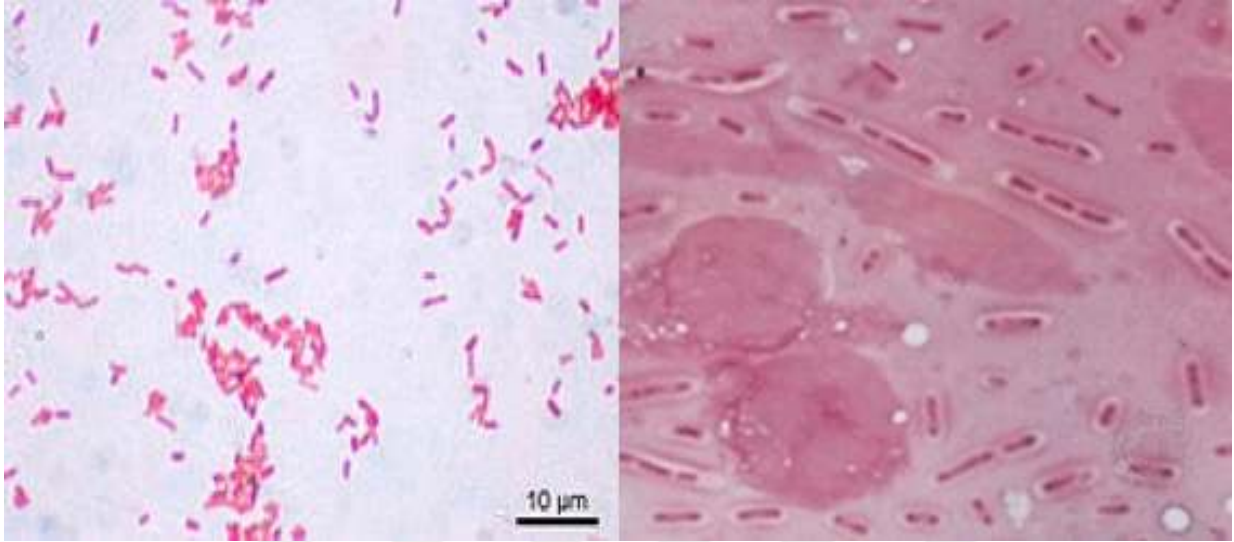
Danimarkalı bilim adamı *Hans Christian Gram* (1853-1938) bakteri türleri arasında ayırım yapabilmek için bir teknik geliştirmiştir. Bu tekniği, özellikle *Streptococcus pneumoniae* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi benzer klinik belirtilere neden olabilen enfeksiyon etkenlerini ayırt edebilmek için kullanmayı amaçlamıştır. Gram boyama olarak bilinen bu teknik günümüzde halen Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri ayırt etmek için kullanılan en temel yöntemdir. (5)

*K. pneumoniae* adı, 19. yüzyılda difteri hastalığının etyolojisinin belirlenmesine katkılarından dolayı Alman mikrobiyolog *Edwin Klebs*'i (1834-1913), onurlandırmak amacıyla verilmiştir. Daha sonraları *K. pneumoniae*'nin yaptığı öldürücü pnömoni tablosunu araştırmacı Carl Friedlander ayrıntılı bir biçimde tanımlamıştır. Bu nedenle bakteri uzun yıllar "Friedlander basili" olarak adlandırılmıştır. (2)

### 2.3. *Klebsiella* türlerinin tanımlanması

*Enterobacteriaceae* ailesi içinde yer alan Gram negatif basil şeklinde bir bakteridir.

(Şekil 2). *Klebsiella* türlerinin ortak özellikleri; hareketsiz, oksidaz negatif ve kapsüllü olmalarıdır. *Klebsiella* cinsi bakterilerin önemli bir özelliği, Gram boyama ile geniş kapsüllü görüntüsüdür (Şekil 2) (6).



Şekil 2. *K. pneumoniae* Gram boyalı preparat ve kapsül görünümü

Polisakkarit yapıdaki kapsül bakteriye patojenite özelliği kazandırmasının yanı sıra, fagositozdan korunmasına yardımcı olan bir virülans faktörüdür. Bu özelliği nedeniyle katı besiyerinde büyük, mukoid koloniler dikkati çeker. Karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalar. Ayrıca nişastayı en geç dört gün içinde parçalayıp gaz oluşturmasıyla diğer enterik bakterilerden ayrılmaktadırlar. Metil kırmızısı negatif, Voges Proskauer ve sitrat pozitif olup, bazı türleri triptofandan indol oluşturmaktadır. (Indole –Methyl red- Voges Proskauer-Citrat; IMViC --++). TSI besiyerinde hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) oluşturmazlar.(Şekil 3) (7) . EMB agarda morumsu, mukoid koloniler, MacConkey agarda pembe koloniler oluşturlar. (Şekil 4) (8) .



Şekil 3. *K. pneumoniae* IMViC test sonuçları ve TSI agarda görünümü



Şekil 4. *K. pneumoniae*'nin EMB ve MacConkey agarda görünümü

Klebsiella cinsi bakteriler, ısıya dayanıksız olup nemli ortamda 55°C'de 30 dakikada ölürler, oda sıcaklığında tutulan kültürlerde haftalarca, + 4°C soğukta aylarca canlı kalırlar. Kuruluğa oldukça dirençlidirler. Özellikle organik maddelerde kurutulurlarsa aylarca canlı kalabilmektedirler. Üremeleri için kan, serum, asit sıvısı, glikoz gibi özel besin maddelerine gereksinim duymazlar. Klebsiella cinsi içinde bilinen yedi tür yer almaktadır; *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhheinoscleromatis*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytic*, *K. planticola* ve *K. terrigena*.

(1)

#### 2.4. Epidemiyoloji

*Klebsiella* cinsi bakteriler, doğada özellikle toprak ve sularda bol miktarda bulunmaktadır. Bağışıklık sistemi zayıflamış olan kişilerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Özellikle diyabet ve akciğer hastalığı olanlarda, alkoliklerde sıklıkla görülür. (2)

*Klebsiella*, insanların nazofarenks ve intestinal yollarında saprofit olarak bulunur. Gaitadan yakalanma oranı %5-38 oranında değişirken bu oran nazofarenkste %1-6'dır. Vücudun bu bölgelerinde floranın geçici üyeleri olarak kabul edilirler.

İnsanlarda, genellikle pnömoni ve bakteriyemi tablosuna neden olurlar. Ayrıca idrar yolu enfeksiyonları (İYE), otitis media, sinuzit, menenjit, prostatit, kolesistit, peritonit, daha az oranda karaciğer absesi gibi birçok hastalığa yol açmaktadır. *K.pneumoniae* tarihte toplum kökenli pnömonilerin önemli bir nedeni olarak bilinmesine rağmen, bu olguların sıklığı Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) belirgin olarak azalmıştır. Ancak dünyada, hastane kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonları hala önemli bir morbidite ve mortalite sorunudur (9) .

Hastanede yatan hastaların Gİ sistem ve nazofarinksinde kolonizasyon oranları oldukça fazladır. Hastanede yatan hastalarda geniş spektrumlu sefalosporinler sıklıkla kullanılmaktadır. Gİ sistemde bulunan *Klebsiella* türleri bu seçici antibiyotik baskısı nedeniyle *in vivo* koşullarda mutasyona uğrayarak genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten suşlar haline gelir ve ortama hakim olurlar. Hastanede kalma süresinin uzamasına bağlı olarak kolonizasyon oranının arttığı bildirilmektedir. (10)

Yapılan çalışmalarda hastanede yatan hastalardaki taşıyıcılık oranları; gaitada %77, farenkste %19, hastaların ellerinde ise %42 oranında bulunmuştur. 14 gün hastanede yatan hastalarda taşıyıcılık oranının 2-4 kat arttığı bildirilmiştir. Bu artış özellikle çoklu veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda gözlenmiştir. (10,11)

*K. pneumoniae*'nin klinik açıdan önemli bir özelliği, hastanede cansız yüzeyler üzerinde ve yatan hastalarda çoklu antibiyotik direncine sahip olan ve GSBL üreten kökenlerin uzun süre canlı olarak kalabilmesidir. Bu cansız yüzeyler, kontamine tıbbi aletler ve hastane personelinin elleri enfeksiyonun yayılmasında önemli kaynaklar arasındadır. (12)

*Klebsiella*, enfeksiyonların büyük çoğunluğu hastane kaynaklı olup tüm *Klebsiella* enfeksiyonlarının %56 sını oluşturmaktadır (13). Gaynes ve arkadaşları (14) tarafından yapılan bir çalışmada 1975 ve 2003 yılları arasında ABD'deki yoğun bakım ünitelerinde bakteriyel kökenli pnömoni, İYE, solunum yolu enfeksiyonu (SYE), cerrahi alan enfeksiyonu (CAE) ve kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) etkeni olarak *K. pneumoniae* görülme sıklığı değerlendirilmiştir. CAE, SYE, KDE etkeni olarak görülme oranları 28 yıl süresince sabit kalmış, pnömoni görülme oranı %1 azalmış, İYE görülme oranı ise iki kattan fazla artış göstermiştir. Hastane kaynaklı pnömoni riski altında olan hastaların özelliklerine bakıldığında, genellikle yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yatan, bağışıklık sistemi baskılanmış veya kardiyopulmoner sorunları olan ya da 65 yaş üzerinde olan hastalar olduğu gözlenmektedir. (15,16)

*K. pneumoniae*' nin neden olduğu akciğer enfeksiyonları sıklıkla multilobüler tutulum gösteren komplike enfeksiyonlardır. Hızlı ilerleyen klinik tablo akciğer abseleri ve sepsis tablosuna ilerleyebilmektedir. Bu hastalarda sıklıkla akciğer nekrozu gelişmektedir. Enflamasyona bağlı kanama olup, kanla karışık balgam “kiremit kırmızısı” renk diye tanımlanmaktadır. (13,17)

## 2.5. Virölans Faktörleri

*K. pneumoniae* virölans faktörleri arasında kapsül, LPS, tip 1 ve tip 3 fimbriyalar, siderofor ve biyofilm yapı sayılabilir (10,18,19) .

### 2.5.1. Kapsüler Polisakkarit

Çoğu klinik *K. pneumoniae* izolatının kapsülü kalın asidik polisakkarit yapıda olup, 4-6 şeker ve sıklıkla üronik asitin tekrarlayan alt ünitelerden oluşmuştur. *Klebsiella* iki hücre yüzey antijeni eksprese eder; LPS ve kapsüler polisakkarit (CPS). CPS, K-antijeni olarak adlandırılır. Çok sayıda kapsül serotipi bulunmakla birlikte genel olarak klinik izolatların çoğunluğu K1 veya K2 serotip taşımaktadır (10).

Kapsüler form, bakterinin yüzeyini kalın bir tabaka halinde kaplayan fibröz yapıdan oluşmuştur. Bu yapı bakteriyi bir taraftan fagositozdan korurken diğer taraftan bakterisidal serum faktörleri aracılığı ile öldürülmesini engellemektedir. Farelerde doza bağımlı olarak, spesifik kapsüler antijene karşı antikor üretiminde azalma olduğu gösterilmiş, yüksek dozlarda kapsüler polisakkaritin immünolojik paralizi oluşturabileceği bildirilmiştir (13).

### 2.5.2. Lipopolisakkarit

LPS tabakanın Gram-negatif bakterilere bağlı enfeksiyon hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. LPS, üç alt birimden oluşmaktadır: hidrofobik lipid A alanı (endotoksin), tekrarlanmayan oligosakkarid çekirdek ve bir dış membran olan polisakkarit (O-antijen) (10). *K. pneumoniae* türlerinde 12 farklı O-antijen serotipi bulunmaktadır. O antijeni eksik wbbO mutant suşun kullanıldığı pnömoni modelinde virölansın azaldığı gösterilmiştir. (20)

### 2.5.3. Fimbriya

Fimbriya genellikle Gram negatif bakterilerde bulunmakla birlikte bazı Gram pozitif bakterilerde de bulunabilir. Fimbriyalar bakterilerin konak hücrelere yapışmasında önemli rol oynamaktadırlar. Çevre şartları; oksijen, sıcaklık, pH ve bakterinin içinde bulunduğu ortam



fimbriyaların oluşumunu etkiler. Bakteri sitoplazmik membranından kaynaklanıp dışa doğru uzanan fimbriyalar protein yapısındadır.

Bu yapılar 10 µm boyunda 1-11 nm çapında olup 15-26 kDa moleküler ağırlığında, birbirleri ile sarmal şekilde birleşmiş polimerik globuler protein alt ünitelerinden (pilin) oluşmaktadır. (21). Pililer bakterinin ürogenital sisteme ve solunum sistemine kolonizasyonunda önemli rol oynarlar. Bakterinin solunum sistemine adezyonuna, üst solunum yolunda kolonizasyon direncinin bozulmasına yol açarlar. Özellikle uzun süreli mekanik ventilasyondaki hastalarda pnömoni gelişimini kolaylaştırdıkları bilinmektedir. (10)

*Klebsiella* türlerinde genellikle iki tip fimbriya bulunmaktadır. Tip 1 fimbriyalar en yaygın görülen tip olup mannoz içeren yapıları aracılığı ile adezyonda etkilidirler. Hayvan modellerinde tip 1 fimbriyaların İYE gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. (22,18)

Tip 3 fimbriyalar ise daha az yaygındır ve tipik olarak klinik hasta izolatlarında değil, bitki soylarında bulunmaktadır. Tip 3 pili, endotelial hücrelere, solunum sistemi epiteline ve üroepitelial hücrelere yapışmada önemli rol oynamaktadır. Tip 3 fimbriyaların, hayvan İYE modelinde patojenite üzerinde herhangi bir etkiye sahip olduğu gösterilmemiştir. Bununla birlikte in vitro çalışmalarda biyofilm üretimine aracılık ettiği gösterilmiştir . (18,23)

#### **2.5.4. Siderofor**

Demir, bakterinin üremesi için proteinlerde oksijen ve elektron transport aşamasında yer alan, redoks katalizörü olarak görev yapan önemli bir virülans faktörüdür. Siderofor bakteri dışında kompleks olarak bulunan demir elementlerinin çözünmesini sağlar ve bu çözünmüş kompleksler aktif taşıma ile hücre içine alınır. (24)

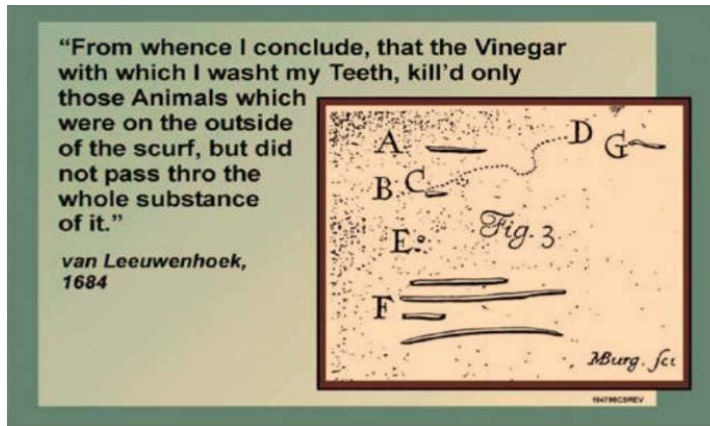
Demir intrasellüler olarak hemoglobülin, ferritin, hemosiderin, miyogloblin gibi proteinlere yüksek oranda bağlanma eğiliminde olduğundan, bakteri demir ihtiyacını bu yolla karşılamaktadır. Sideroforlar, konak proteinlerine bağlı demiri alabilen yüksek duyarlılık, düşük molekül ağırlıklı şelatlar oluşturur. Bakteriler demir ihtiyaçlarını karşılamak için bu şelat ajanları kullanırlar. Enfeksiyon patogeneğinde konak hücresinden sağlanan demirin belirgin

etkisi *Klebsiella* türlerinde gösterilmiştir. Parenteral yolla bir kobaya demir verilmesinden sonra *Klebsiella* enfeksiyonlarına olan duyarlılıkta artış görülmüştür. (10)

### 2.5.5. Biyofilm

Bakteriler, yeryüzünde en fazla bulunan canlılardır. Milyonlarca yıl evrimleşmişler ve değişen ortama, yaşam koşullarına uyum sağlamışlardır. Doğada, bakterilerin serbest formdan (planktonik ) daha çok biyofilm formunda varlığını sürdürdüğü kabul edilmektedir. Biyofilm doğada toprak, su ve kayalarda yaygın olarak bulunur. Sıvılar ile temas içinde olan insan yapımı boru hatları, klima kanalları, su depoları, tıbbi malzemeler gibi yapıların yüzeylerinde bulunabilirler. Deri, ağız ve bağırsak dahil olmak üzere insan vücudunun çeşitli yerlerinde varlığı izlenebilmektedir.

Biyofilm varlığı 17. yüzyılda Antoni von Leeuwenhoek tarafından tanımlanmıştır. Leeuwenhoek, dişinin üzerindeki plaktan aldığı sürüntüyü inceleyerek mikroskop altında mikrobiyal kümelerin varlığını gözlemlemiştir. (Şekil 5). Bununla birlikte biyofilm tanımlaması yapılmamıştır. (25)



Şekil 5. Antoni van Leeuwenhoek tarafından çizilen dental plak üzerindeki bakteriler

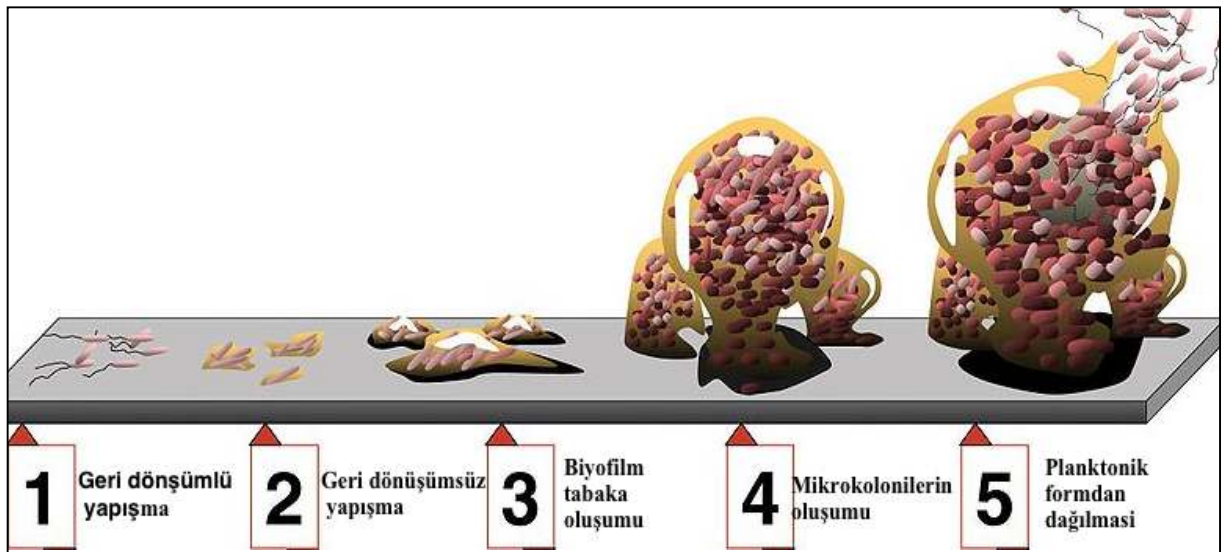
1970’li yılların başında Costerton dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin % 99.99’unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışmaların da ışığında, 1978 yılında bu toplulukları tanımlamak amacıyla Costerton ilk defa “biyofilm” terimini kullanmıştır .(26,27)

Biyofilm, bakteri tarafından üretilen ve bakterinin canlı ya da cansız yüzeylere

yapışmasını sağlayan polisakkarit yapısında bir “glikokaliks” tabakası şeklinde tanımlanmıştır. Mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik olduğu yönünde tanımlamalar da vardır. Günümüzde ise en yaygın kabul gören tanım; “mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir canlı ya da cansız yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan, mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks” şeklindedir. (28)

Biyofilm oluşumu için tip 1 veya tip 3 fimbriyalar, kapsül ve LPS virülans faktörleri en önemli unsurlardır. Tip 3 fimbriyalar canlı ve cansız yüzeylerde biyofilm oluşumuna aracılık eder. Ayrıca bakterinin endotelial ve mesane epitelyal hücrelerine tutunmasında da etkilidirler. (29)

Biyofilm oluşumunu kontrol eden mekanizmalar, türler ve hatta suşlar arasında bile farklılık göstermektedir. (30) Biyofilm; bakteriyi zararlı çevresel faktörlerden koruyan bir mikrobiyal büyüme modu olarak da düşünülebilir (31-33). Genel olarak biyofilm yapının oluşumu birbirini izleyen 5 basamaktan oluşmaktadır. (Şekil 6)



Şekil 6. Biyofilm gelişiminin beş evresi

## **2.6. Biyofilm oluşumunun basamakları**

### **1. Geri dönüşümlü yapışma**

Geri dönüşümlü ve güçsüz bir bağlanma şekli olup, bakteri ve yüzey arasında oluşmaktadır. Bu yapışma şeklinin gerçekteşmesi için öncelikle bakteri ve yüzey arasında yeterli yakınlığın ( $<1\text{nm}$ ) oluşması gerekmektedir. Her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak yapışma gerçekteşir. Bu güç; elektrostatik ve hidrofobik ilişki, van der Waals bağlarının gücü, ısı ve hidrodinamik güç şeklinde olmaktadır. Bakterilerin büyük çoğunluğu ve cansız yüzeyler negatif elektrik yüküne sahip olup birbirleri için itme gücü oluştururlar. Bakteri ve yüzeyler arası primer aderansta en önemli etkinin hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir.

### **2. Geri dönüşümsüz yapışma**

Biyofilm oluşumunda ikinci basamak bakterilerin yüzeye kuvvetli bir şekilde tutunma, yapışma işlemidir. Yapışmanın, bakteri yüzeyindeki piluslar, fimbriyalar veya fibriller gibi ligandların; ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan spesifik, geri dönüşümsüz aşamasıdır.

### **3. Biyofilm tabaka oluşumu**

Üçüncü evrede ise bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Biyofilm esas olarak mikroorganizma ve ekzopolisakkarit (EPS) yapıdan oluşur. EPS yapısı içerisindeki hidrojen bağları sayesinde bünyesinde fazla miktarda suyu barındırabilir. Biyofilm içerisindeki karbon kaynağının %50-90'ını oluşturur. Farklı bakteri türlerine göre kimyasal ve fiziksel özellikleri farklılık gösterebilir, Gram negatiflerde polisakkarit yapı nötral veya polianyoniktir.

#### 4. Mikrokolonilerin oluşumu

Dördüncü evrede mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Bakteriler oksijen kullanımı ve antibakteriyel direnç açısından tabakalı bir yerleşim gösterir. Bu tabakaların altında kalan hücreler daha yüzeyde kalan diğer hücrelere göre daha stabildir. Yüzeyde daha çok difüzyona izin veren kanallar, metabolik olarak daha aktif bakteriler, konak hücre parçaları, fibrin artıkları vb. maddeler bulunmaktadır.

#### 5. Planktonik formdan kopmalar

Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bakteriler bu yapı içerisinde uygun ortamın gelişmesi halinde özel bir iletişim sistemi (Quorum Sensing) ile haberleşerek durgun evreden çıkarak planktonik forma geçebilmekte ve oluşmuş biyofilmden koparak vücudun başka bölgelerine ulaşabilmektedir. Bu şekilde biyofilm oluşum basamakları tekrarlanmaktadır.

Görüldüğü gibi biyofilm gelişimi bakterinin yüzeye başlangıç adezyonundan üç boyutlu forma geçinceye kadar dinamik bir süreçtir. Gerçek zamanlı olarak yapılan bir çalışmada bakteriyel yükün ilk üç saatte logaritmik olarak arttığı, 6. saate kadar artmaya devam ettiği, 6-10. saatler arasında durağan bir dönem geçirdikten sonra 16. saate kadar artmanın sürdüğü bildirilmiştir. Eş zamanlı olarak biyofilm yapı izlendiğinde, mikrokoloni formasyonunun 7. saatte, üç boyutlu biyofilm yapının ise 9. saatten itibaren gözlemlendiği belirtilmiştir (35). Biyofilm gelişim evrelerinin zamana bağlı değişiklikleri konusunda çalışmalar genel olarak geniş zaman aralıklarını (12, 24, 48. saat v.b.) kapsamaktadır. Bununla birlikte az sayıda da olsa *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda daha kısa zaman aralıklı çalışmalar (2, 6, 12 saat v.b.) bulunmaktadır. (35-37)

Moleküler düzeyde analizler LPS tabakanın cansız yüzeylere adhezyonda etkili olduğunu, kapsül yapısının biyofilmin alt tabakalarını oluşturduğu ve olgun biyofilm mimarisi yapımı için gerekli olduğunu göstermiştir. (38)

Planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında biyofilmin temel özelliği antimikrobiyallere, dezenfektanlara, immunolojik ve kimyasal savunma mekanizmalarına karşı artmış dirençtir. Biyofilmde büyüyen bakteriler aynı izolatin serbest formda büyüyenlerine göre antibiyotik ve dezenfektanlara daha dirençlidir (100-1000 kat) (39, 40) .

Konağın bağışıklık sisteminden korunan biyofilm içindeki bakterilerin; biyofilmin tabanında azalan oksijen miktarına bağlı olarak metabolizmalarını yavaşlattığı, yavaş büyüyerek antimikrobiyallerin ve dezenfektanların etkisinden korunduğu gösterilmiştir. (41-42)

Biyofilm oluşumunun erken dönemlerinde (ilk 24 saat), biyofilm topluluğu antimikrobiyallere daha duyarlı iken, biyofilm maturasyonu tamamlanmaya başladıkça (48 saat) direncin arttığı bildirilmektedir. (40,43)

Literatürde *P.aeruginosa*'nın temel virülans faktörlerinden olan biyofilm yapının, antibiyotik geçişinde bariyer görevi görerek dirence yardımcı olmasının yanı sıra antibiyotik uygulamalarının da biyofilm oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Aminoglikozidlerin subinhibitör yoğunluklarının *P. aeruginosa* ve *E.coli*'de biyofilm yapıyı indüklediği, beta-laktam antibiyotik imipenemin *P. aeruginosa* ekzopolisakkarit alginat üretimini artırdığı ve biyofilm volümünde artışa neden olduğu gösterilmiştir (44-46) Benzer şekilde bu veriler *in vivo* çalışmalarında da gösterilmiştir. (47)

Bu özelliklerinden dolayı biyofilm formasyonu çeşitli kronik ve tekrarlayıcı enfeksiyonlar ile ilişkili olup insan vücudundaki tüm mikrobiyal enfeksiyonların % 80'inden sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar sıklıkla yavaş gelişmektedir. Bu enfeksiyonlar insan vücudunun bir ya daha fazla bölgesinde tıbbi tedaviye yanıt vermeyen, kronik tekrarlayıcı tablo ile karakterizedir (48).

Son yıllarda biyofilm enfeksiyonları mortalite ve morbiditede artışlara, ciddi ekonomik kayıplara neden olabilen önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle ilgi çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır. Mikroorganizmanın biyofilm

oluşum süreci içinde konakçıdaki davranışlarının açıklanması, immünolojik ve doku düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi klinik açıdan hastaya yaklaşım ve sağaltım alternatifleri konusunda katkıda bulunabileceği gibi, dirençli suşlarla kolonizasyonu ve bu suşların toplumda yayılmasını azaltabilecektir. Tüm bu yaklaşımlar aynı zamanda ekonomik çıktılarına da dönüşebilecektir.

*K. pneumoniae* hastane kökenli ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonlarda fırsatçı bir patojen olarak sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. İntravasküler katater ile ilişkili bakteriyemiler, kalıcı tıbbi cihazlar ve özellikle üriner katater ile ilişkili enfeksiyonlarda *S. aureus*'tan sonra en sık karşılaşılan etken olarak bildirilmektedir. Biyofilm yeteneği, dirençli enfeksiyonların görülme oranlarındaki artıştan sorumlu tutulmaktadır (49, 50).

*K. pneumoniae* türlerinde biyofilm yapı olarak *in vitro* büyüme özelliği 1980'lerin sonundan bildirilmiştir ancak *in vivo* biyofilm yapı 1992 yılında Reid ve ark. (51) tarafından gösterilmiştir. Asemptomatik İYE olan omurilik zedelenmeli bir hastanın mesane epitel hücreleri elektron mikroskobu ile incelenmiş ve biyofilm yapının varlığı gösterilmiştir.

Bilindiği gibi sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlar önemli bir sorundur. Bu enfeksiyonlar hastanede yatan hastalarda mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenleri arasındadır. (52) Hastane kökenli enfeksiyonların çoğu fırsatçı patojenlerden kaynaklanmakta olup sağlıklı bireyler için bir risk oluşturmamaktadır.

Yatan hastalarda bu enfeksiyonlara yakalanma oranı yüksektir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda bağışıklık sisteminin baskılanması, vücut bütünlüğünü bozan çeşitli invazif girişimlerin yapılması ve kalıcı tıbbi aletler nedeniyle enfeksiyon görülme oranları çok daha fazladır. (53,54)

*K. pneumoniae* ABD hastanelerinde yedinci, Avrupa hastanelerinde dördüncü sıklıkla izole edilen klinik izolatu olarak bildirilmiştir. Yaygın olarak solunum yolu ve İYE oluşturmaktadır. 1970'li yıllardan bu yana, *K. pneumoniae* kökenli hastane enfeksiyonları oranlarında artış gözlenmektedir. Endotrakeal tüp (ETT) ve kateter gibi kontamine tıbbi cihazların kullanımı nedeniyle gözlenen bu artışta biyofilm rol oynamaktadır. Tıbbi cihaz kullanım süresine bağlı olarak bakteriyel adezyonun arttığı bildirilmiştir. (55) Katetere bağlı

İYE olan hastaların idrar örneklerinden soyutlanan *K. pneumoniae* türlerinde *in vitro* biyofilm üretiminin %63 olduğu saptanmıştır. (56)

İYE hastane kökenli enfeksiyonlar arasında %25-40 sıklıkla ilk sırada yer almaktadır. Cerrahi işlemler ile silikon veya lateks içerikli kateter ve üretral cihazların genitoüriner yollara yerleştirilmesi, bir süre sonra bu medikal aletler üzerinde bakterilerin üremesi ve invazyonu sonucunda idrar yolu enfeksiyonu gelişmesine yol açmaktadır. Sıklıkla rastlanan etkenler arasında *K. pneumoniae* yer almaktadır. (57,58) Ayrıca plazmid tabanlı GSBL üretimi ve aminoglikozid türü antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç sorunu çok daha ciddi boyutlara taşımaktadır. (59) Günümüzde sefalosporinlere direnç artmaktadır. Karbapenem grubu antibiyotikler solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan Gram negatif bakterilere en etkili antibiyotiklerdir. (60)

Son zamanlarda, *K. pneumoniae* ventilatör ile ilişkili pnömoni (VİP) olgularından sıklıkla izole edilmektedir. VİP, mekanik ventilasyondan 48 saat sonra hastada meydana gelen nozokomiyal pnömoni olarak tanımlanır. VİP gelişme sıklığı %9-27, mortalite oranları %20-50 olarak bildirilmektedir. (61) VİP'e neden olan patojenler arasında *K. pneumoniae* en sık karşılaşılan etkenlerden biri olarak bildirilmektedir. (62) Bu durumdan ETT'lere kolonize *K. pneumoniae* kökenlerinin biyofilm üretimi sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm yapı özellikle dirençli kökenlerin uzun süreli kolonizasyonuna uygun ortam hazırlamaktadır. (63)



## 2.7. Hayvan modelleri ve laboratuvar hayvanı olarak fare

Deneylerde hayvanların kullanılması tarihçe olarak çok eskilere dayanmakla birlikte, hastalıkların bulaş yollarının ve patogenezelelerinin anlaşılması için 19. yüzyıl ortalarından itibaren kullanılmaktadır. 1960'dan beri 1000'den fazla hayvan modeli deneysel enfeksiyon çalışmaları için tanımlanmıştır. Günümüzde deney hayvanları, mikroorganizmaların virölans faktörlerinin konak hücrede etkilerinin araştırılması, enfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve antimikrobiyal maddelerinin etkinliklerinin değerlendirilmesi gibi birçok farklı amaçla kullanılmaktadır. İdeal *in vivo* enfeksiyon modeli insandaki enfeksiyon hastalığı sürecini taklit etmelidir.

Mikrobiyoloji çalışmalarında hayvan modeli seçiminde; hayvanın enfeksiyon ajanına duyarlılığı, mikroorganizmanın insanlardaki enfeksiyonlara benzer hastalık belirtilerine neden olup olmayacağı, hayvanın anatomik ve fizyolojik özellikleri, mikrobiyolojik olarak standardizasyonu, hayvanın elde edilebilirliği ve bakımı gibi bir çok faktör göz önünde bulundurulmalıdır.

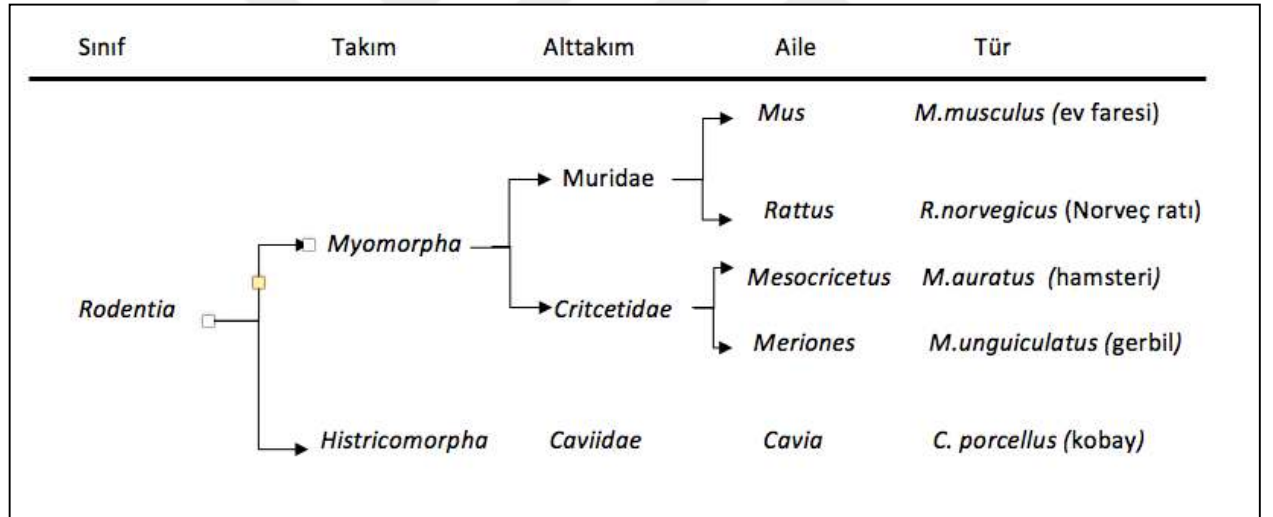
Laboratuvar hayvanlarının mikrobiyolojik özellikleri, üretim ve barındırma koşullarına göre farklılık göstermektedir. Hayvan yetiştiriciliğinde, literatürde mikrobiyal flora tanımlama üzerine çeşitli terminolojiler yer almaktadır. Genel bir tanımlama kullanılacak olursa; özel patojenlerden arındırılmış (Specific-pathogen-free; SPF) hayvanlar, gnotobiyotik (Gnotobiotic; GN) ya da tanımlanmış hayvanlar ( Defined flora; DF), konvansiyonel (Conventional; CV) hayvanlar şeklinde gruplandırılabilir:

- a) SPF hayvanlar: Bilinen viral, parazitik ve bakteriyel patojenlerden arındırılmış hayvanlardır.
- b) GN ya da DF hayvanlar: Bünyesinde barındırdığı mikrobiyal florası tanımlanmış hayvanlardır. Barındırdıkları mikroorganizma sayısına göre iki alt sınıfa ayrılırlar:

- Aksenik (Germ-free, GF) hayvanlar: Teşhis edilebilir bütün mikrobiyal organizmalardan arındırılmış hayvanlardır.
- Mono-, Di-, Poliksenik hayvanlar: Bir, iki ya da birkaç tanımlanmış mikroorganizma türünü barındıran hayvanlardır.

c) CV hayvanlar: Sağlıklı (normal) hayvanlar olarak bilinir ancak mikrobiyası tanımlanmamış hayvanlardır (64-67) .

BALB/c suşu fareler taksonomik olarak *Mus* cinsinden olup (*Mus musculus*), Murinae alt familyasına ve Muridae familyasına ait rodent sınıftan canlılardır (Şekil 7) (68).

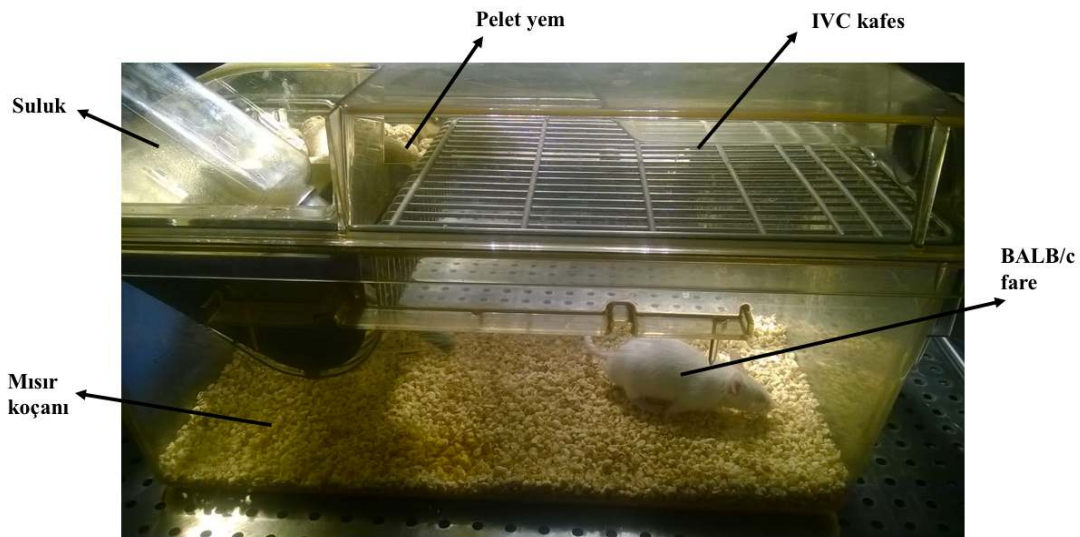


Şekil 7. Rodent sınıflandırma

Biyomedikal çalışmalarda en fazla kullanılan omurgalı türü olan farelerin edenleri kısa ve sert kıllarla kaplı, kuyrukları uzun, ince ve çıplaktır. Boyları kuyruk dahil 12-15 cm, yetişkin ağırlıkları erkeklerde 20-40 g, dişilerde 25-40 g arasındadır. Ortalama yaşam süreleri 1-2 yıl arasında değişmektedir. Görme duyusu zayıf, işitme ve koku alma duyuları çok güçlüdür. Diğer fare soylarında olduğu gibi gece aktif (noktürnal) hayvanlardır. (69)

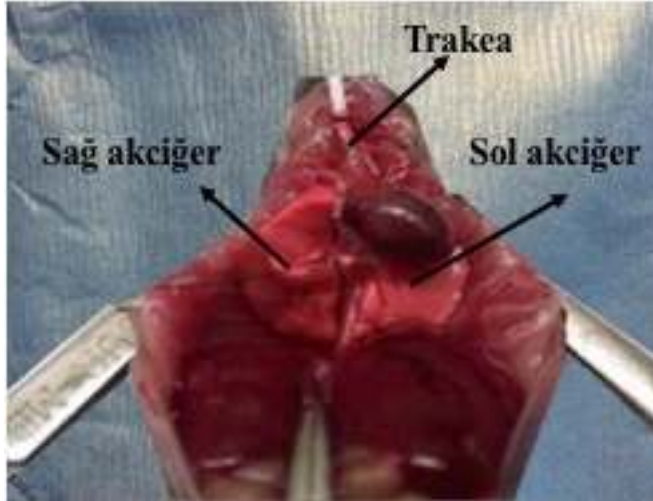
Doğal yaşamlarında, fareler sosyal statü içerisinde gruplar halinde yaşarlar. Laboratuvar fareleri kafes yaşamına uyum sağlamakla birlikte, yine de doğal ortamda yaşayan farelerle benzerlik gösterirler. Bu nedenle hayvan refahı açısından Avrupa Konseyi tarafından (1986) kafes standartları tanımlanmıştır. Buna göre; kapakları sıkıca kapatılabilen, saydam, sert plastik kafeslerde barındırılırlar. Olması gereken en düşük kafes boyutları, tek başına 180 cm<sup>2</sup> yavru ile birlikte 200 cm<sup>2</sup>, grup yetişkin 80 cm<sup>2</sup> en düşük Kafes yüksekliği 15 cm<sup>2</sup> olmalıdır .

Barındırma çevre koşulları sıcaklık 20-24 °C, nispi nem 50-60 arasında, gündüz/gece 14/10 veya 12/12 saat olarak tasarlanmalıdır. Kafeslerde altlık materyali olarak genellikle talaş, mısır koçanı kullanılır. Bu malzemelerin mikrobiyal ve kimyasal maddeler içermemesi gerekir. Kağıt parçaları veya pamuk da kullanılabilir. Kafes içine yerleştirilecek çeşitli materyaller (oyun oynamaları amacıyla) refahlarına olumlu katkılarda bulunur. Yem genellikle pelet şeklinde ve yem ve suya adlibitum (serbestçe yiyebildiği, içebildiği kadar) olarak ulaşabilmelidir(Şekil 8) (70) .



**Şekil 8.** Fare barındırma kafesi, pelet yem, arıtılmış su, altlık materyali ve BALB/c fare

Solunum sistemi açısından bakıldığında; solunum kanalı burun delikleri ile başlar, Burun boşluğu, nazofarenks, larinks, trakea ve bronşlar, kıkırdaksı destek dokuları ve akciğerlerden oluşur. Sol akciğer tek loblu, sağ akciğer ise 4 lobludur (Şekil 9) (69) .



**Şekil 9.** Fare göğüs boşluğu organları

### **2.7.1. Farede akciğer enfeksiyonu modeli**

Deneyssel modellemelerde ideal olanı genetik ve mikrobiyolojik standardizasyonu yapılmış laboratuvar hayvanları kullanmaktır. Bununla birlikte çalışmalara bakıldığında sıklıkla CV hayvanlar kullanılmaktadır. Açık kafes ya da bireysel havalandırılmalı kafesler (Individually Ventilated Cages; IVC) içinde barındırılan bu hayvanların florası tam olarak tanımlanmamakla birlikte hastalık yapıcı herhangi bir etken taşımadıkları bilinmektedir. Ucuz ve kolay temin edilebilir olmaları, bakım ve barındırma koşullarının maliyet etkin oluşu tercih nedenleri arasındadır. (70)

Solunum yolu hastalıkları toplumda en fazla görülen enfeksiyon hastalıklarıdır. Dünyada; tüm ölüm nedenleri arasında altıncı, enfeksiyona bağlı ölüm nedenleri arasında 1. sıradadır. Dünya üzerinde mortalite oranları %20-30 arasındadır. Hastaneye yatışın en sık nedeni ve enfeksiyon hastalıkları içinde en fazla antimikrobiyal sağaltım uygulanan hastalıktır. (71,72)

Akciğer enfeksiyonlarından sıklıkla sorumlu etkenler *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* olarak karşımıza çıkmakla birlikte polimikrobiyal enfeksiyonlarda (virüs-bakteri, bakteri-bakteri) önemli bir yer tutmaktadır. Solunum yolu enfeksiyonlarının büyük bir kısmı süperenfeksiyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Hayvan modelleri enfeksiyon hastalığının patogenezinin anlaşılmasında sadece konakçı-patojen ilişkisinin değil, patojen-patojen etkileşimlerinin ortaya konmasında da son derece yararlıdır. (73,74)

Akciğer enfeksiyonu modellerinde, büyük memeli türleri (örn; tavşan, köpek, domuz, babun...) daha çok invazif girişimlerin, kardiyovasküler sistemi izlemi ve hemodinamik destek çalışmalarında tercih edilmektedir. İnsan dışı primatların etik sorunlar nedeniyle kullanımı kısıtlıdır.

Günümüzde sıklıkla rodentler (özellikle fare ve sıçanlar) insandaki enfeksiyon modelini taklit etmek için uygun bir anatomik ve biyolojik model olması, enfeksiyon ajanlarına duyarlılık ve immün yanıt açısından benzerlik göstermesi nedeniyle tercih edilmektedir. Bu hayvanlarda genetik ve mikrobiyolojik standardizasyonu sağlanmış olanlara ulaşmak da kolaydır (75).

Laboratuvar hayvanlarında pnömoni modelini oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları tablo 2’de özetlenmiştir. (76)

**Tablo 2.** Hayvanlarda pnömoni oluşturmak amacıyla kullanılan yapılan farklı yöntemlerin avantaj ve dezavantajları \*

| Yöntem                                             | Avantajları                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Dezavantajları                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aerosol uygulama</b>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hava kaynaklı enfeksiyonların doğal geçişini taklit eder.</li> <li>Tüm hayvan grupları eşzamanlı ve eşit dozda etkene maruz kalır</li> <li>Tek bir düzenek (cam fanus) kurulması yeterlidir.</li> <li>Her iki akciğer lobunda simetrik ve eşit yoğunlukta mikroorganizma birikimi olur.</li> <li>Anestezi gerekli değildir.</li> <li>Hayvan refahına uygundur</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Maliyeti yüksek pahalı ve zor bulunan bir donamdır.</li> <li>Hayvanların solunum yolları dışında gözleri, postları da etkene maruz kalır.</li> <li>Bazı patojenler kuruluğa duyarlı. Aerosol şeklinde etkinliği azalır.</li> <li>Biyogüvenlik riski mevcuttur.</li> </ul> |
| <b>İntratrakeal<br/>Orotrakeal<br/>inokulasyon</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Orofaringeal aspirasyonu taklit eder. Verilen mikroorganizma yoğunluğu ve hacmi standarttır.</li> <li>Doğrudan akciğere ve alt solunum yollarına ulaşır.</li> <li>Hipoteze göre etken tek bir akciğer lobuna verilebilir.</li> </ul>                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Genel anestezi gereklidir.</li> <li>İntratrakeal için cerrahi işlem gereklidir.</li> <li>Akciğerin en alt zonlarına dağılım uniform olmayabilir.</li> <li>Asimetrik tutulum gözlenebilir.</li> </ul>                                                                      |
| <b>İntranazal<br/>inokulasyon</b>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Orofaringeal aspirasyonu taklit edilebilir</li> <li>Üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu modelleri birlikte yapılabilir.</li> <li>İşlem basittir.</li> <li>Anestezi ihtiyacı değişkendir.</li> </ul>                                                                                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Akciğerlerde değişen yoğunluklarda temas (burun mukozasına temas)</li> <li>Alt ve üst solunum yolu birlikte tutulur.</li> <li>Heterohen ve asimetrik tutulum.</li> <li>Oral flora ile kontaminasyon riski vardır.</li> </ul>                                              |
| <b>Sentinel<br/>hayvan**</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Doğal bulaş yolu (damlacık ya da temas yoluyla bir enfeksiyon kaynağından diğerine geçiş)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pahalı</li> <li>Bulmak zor.</li> <li>Enfektif etkenin kalıcılık süresi belirsiz.</li> </ul>                                                                                                                                                                               |
| <b>İntraperitoneal</b>                             | Bakterinin intraperitoneal yol ile verilir. Sepsisi takiben sekonder pnömoni gelişmektedir. Hipotez buna göre oluşturulmalıdır.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

\* (76) nolu kaynaktan uyarlanmıştır.

\*\*Genetik ve mikrobiyolojik olarak standart, bilinen bir etkenle enfeksiyon modeli oluşturulmuş hayvan çalışma grubu hayvanlarının kafesine bırakılır.

Enfeksiyon modeli oluşturulduktan sonra, deney süresince ve sakrifikasyon sonrasında ortaya atılan hipoteze uygun olarak enfeksiyon kanıtlarının oluşup oluşmadığına ilişkin kanıtların sunulması gerekmektedir. Akciğer enfeksiyonu modeli sonrası başlıca değerlendirme kriterleri şu şekilde sıralanabilir; (77)

1. Klinik değerlendirme

Ağırlık kaybı, davranış değişiklikleri, postür değişiklikleri, klinik sepsis skorlaması, sağ kalım oranları

2. Akciğerde mikrobiyal yükün belirlenmesi

3. Etkene özgü enflamatuvar yanıtın belirteçlerinin düzeyinin saptanması; sitokinler, serbest oksijen radikalleri (SOR) v.b.

4. Histopatolojik değerlendirme; Işık mikroskobu ya da elektron mikroskobu ile akciğer dokusunda hasar gösterilebilir.

5. *In vivo* görüntüleme tekniklerinin kullanılması; Pet CT (Positron emission tomography–computed tomography; Pozitron Emisyon Tomografisi/Bilgisayarlı Tomografi), biyolüminesans görüntüleme v.b.

Bilindiği gibi aslında hiçbir hayvan modeli tam olarak insandaki hastalık sürecini yansıtmamaktadır. Her ne kadar anatomik ve fizyolojik özellikleri açısından insanlar ile çok büyük oranda benzerlik gösterebilir pnömoni modeli açısından fare ve insanlar arasında arasındaki bazı temel farklılıklar dikkati çekmektedir. Bu farklılıklar başlıca şu başlıklar altında sıralanabilir; (77-79).

### 1- Anatomik farklılıklar;

- Farelerde nazal yüzey alanı daha geniştir.
- Hava yolu simetrisi daha azdır.
- Seröz ve müköz hücre sayısı daha azdır.
- Trakea altında submukozal bezlerde daha az seröz ve müköz hücreler bulunur.
- Akciğerin anatomik yapısı, bronş dallanmaları farklıdır. Trakeobronşial ağaç daha kısadır, broşları sayısı ve dallanma açıları farklıdır, terminal bronşlioller yoktur,
- Postür farklılığı

### 2- Fizyolojik farklılıklar;

- Fareler ağızdan solunum yapamazlar. Epiglot yumuşak damağa çok yakın olduğundan nazal solunum yaparlar.
- Öksürme refleksi zayıftır. Solunum epitelinde sinir uçları olmaması nedeniyle.

### 3- Antimikrobiyal sekresyon;

- Lizozim sekresyon farklılığı; İnsanda bronşial submukozal tabakadaki seröz hücreler lizozim salgımlarken farede tip II pnömositler salgılar.
- Solunum epitelinde mikrobisit etkili olan hipotiyosiyanat üretimi farede yok.
- Patern tanıyan reseptör düzeyinde farklılıklar; İnsanda TLR3 ekspresyonu myeloid dentritik hücreler tarafından yapılırken farelerde makrofajlar tarafından eksprese edilir. TLR3, 5 ve 9 farelerde alveolar makrofajlar tarafından eksprese edilir.



#### 4- Türler içinde farklılıklar;

- *S. pneumoniae* kökenli pnömonilere karşı BALB/c farelerde bakteriyemi ve letalite daha az görülürken, C57BL/6 ve DBA/2 farelerde daha fazladır.
- C57BL/6 fareler *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına 129/SV soylarından daha duyarlıdır.
- *Legionella* pnömonisi için özellikle a/j fareler kullanılmalıdır.
- Fare soyları yanı sıra bakteriye özgü serotiplerde önemlidir. Örneğin *S. pneumoniae* serotip 2 ve 3 daha düşük dozlarda bakteriyemi ve mortaliteye neden olurken serotip 19 için çok yüksek dozlarda inokulasyon gerekmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın tipi

Planlanan bu çalışma, BALB/c soyu laboratuvar fareleri ile gerçekleştirilen deneysel nitelikte bir çalışmadır.

#### 3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırma, literatür tarama ile Ekim 2014'te başlamış olup; etik kurul onayı 26.11.2014 tarihinde alındıktan sonra Farelerde akciğer enfeksiyonu modeli; Ege Üniversitesi (EÜ) İlaç Geliştirme Ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi, (ARGEFAR) hayvan biyogüvenlik düzey 2 (Animal Biosafety Level 2, ABSL-2) laboratuvarlarında gerçekleştirildi. (8-18 Haziran 2015) Tez kapsamındaki *in vitro* çalışmalar için; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Tıbbi Mikrobiyoloji AD. 4028 nolu laboratuvar, Histoloji-Embriyoloji AD. Laboratuvarları ve Araştırma Laboratuvarları-ARLAB kullanıldı. ETT biyofilm yapı görüntülemesi Dokuz Eylül Üniversitesi Biyotıp ve Genom Enstitüsü laboratuvarlarında yapıldı. 28 Aralık 2016'da tez savunmasıyla sonlandı.

#### 3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi

BALB/c fareler rasgele örnekleme yöntemi ile 3 gruba ayrıldı. (Tablo 3)

**Tablo 3.** Deney grupları

| Deney grupları                                                           | n  |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Grup 1: <i>K. pneumoniae</i> B5055 planktonik hücreleri ile enfekte grup | 30 |
| Grup 2; <i>K. pneumoniae</i> B5055 biyofilm hücreleri ile enfekte grup   | 30 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| Grup 3; PBS verilen           | 6  |
| Kullanılan toplam fare sayısı | 66 |

### 3.4. Çalışma materyali

*In vivo* enfeksiyon modeli için BALB/c fareler, *in vitro* testler için çeşitli laboratuvar sarf malzemeleri ve ekipmanları kullanılmıştır.

### 3.5. Araştırmanın değişkenleri

Bu araştırmada bağımlı değişken farede *K. pneumoniae* kaynaklı pnömoni modelinde biyofilm oluşumu, bağımsız değişken biyofilm oluşumuna zaman faktörünün etkisidir.

### 3.6. Veri toplama araçları

**Tablo 4.** Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

| Sıra no | Malzeme,Cihaz                          | Marka                 | Lot No, Model, Seri No, Katalog No |
|---------|----------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1       | Mueller Hinton Agar (500g)             | Merck                 | 1.07437.0500                       |
| 2       | Mueller Hinton broth (500g)            | Merck                 | 1.0843.04010                       |
| 3       | Brain Heart İnfusion Broth (500g)      | LAB                   | 104054/190                         |
| 4       | Etanol                                 |                       |                                    |
| 5       | Gliserol (500ml)                       |                       |                                    |
| 6       | Falkon tüpü (50ml'lik) (1paketi)       | ULTRACRUZ             | 101206-060                         |
| 7       | Falkon tüpü (15ml'lik) (1paketi)       | ULTRACRUZ             | 101206-060                         |
| 8       | Petri kutusu                           | IsoLab                |                                    |
| 9       | Steril plastik öze (1 paketi (10 adet) | IsoLab                | ILPSB0015                          |
| 10      | Steril pipet (10ml'lik) (200 adet)     | BRAND                 |                                    |
| 11      | Steril pipet (5ml'lik) (200 adet)      | GENEX Beta            |                                    |
| 12      | Eküvyon (100 adet)                     |                       |                                    |
| 13      | -80 ultra derin dondurucu              | Daihan                | 0408927101L005                     |
| 14      | Tissue lyser                           | Qiagen                | QS7834982374                       |
| 15      | +4 °C Buzdolabı                        | Vestel                |                                    |
| 16      | Etüv                                   | Electro-mag Incubator | 45670                              |
| 17      | Tartı                                  | Kern                  | WB10E0038                          |
| 18      | Otoklav                                | HICLAVE Hirayama      | HV-85 000685748                    |
| 19      | Santrifüj                              | Sigma                 | 134537                             |

|    |                          |                     |                     |
|----|--------------------------|---------------------|---------------------|
| 20 | MC farland               | Biomerieux          | 1DN012764           |
| 21 | 96 kuyucuklu ELISA plağı | Bioscience          | 120532036/121592017 |
| 22 | ELISA okuyucu cihazı     | Thermo multiscan FC | T09845345           |
| 23 | Vorteks                  | Stuart              | R80000000364        |
| 24 | Işık Mikroskobu          | Olympus BX51        | 9C05810             |

### **Eosin Methylene Blue (EMB) Agar**

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 36 gr tartıldı, 1 litre distile suda eritildi. Otoklavda 121°C de, 1.2 atmosfer basıncında 15 dakika steril edildi. Steril petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Oda ısısında birkaç saat bekletildikten sonra çalışma gününe kadar +4°C’da saklandı.

### **Mueller Hinton Broth (MHB)**

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 21 gr tartıldı, 1 litre distile suda eritildi. Otoklavda 121°C de 1.2 atmosfer basıncında 15 dakika süre ile steril edildi. Çalışma gününe kadar +4°C’da saklandı.

### **Mueller Hinton Agar (MHA)**

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 34 gr olarak tartılarak 1 litre distile suda eritildi. Otoklavda 121°C de, 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. Steril petri kaplarına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Oda ısısında birkaç saat bekletildikten sonra çalışma gününe kadar +4°C’da saklandı.

### 3.6.1. Deney hayvanları

Çalışmada 6-8 haftalık, 20-25 gr. ağırlığında, **60 adet çalışma grubu 6 adet PBS verilen grup olmak üzere toplam 66 adet**, erkek, BALB/c fare kullanılmıştır. Fareler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiştir. Laboratuvarında, 21-22°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda serbest su ve gıda sağlanarak; stres ve gürültüden izole bir şekilde barındırılmışlardır. Enfeksiyon modeli yapılmadan 1 hafta önce çalışma ortamının mikro ve makroçevresine alışmaları amacıyla gerekli evraklarla birlikte EÜ ARGEFAR laboratuvarlarına transfer edilmişlerdir. Burada IVC içinde çalışma gününe kadar barındırılmışlardır. Herbir kafes içine farelerin refahını artırmak amacıyla polikarbon malzemeden yapılmış kafes içi zenginleştirici materyal (Mouse Igloo) yerleştirilmiştir.

Araştırmayı planlarken ve tüm çalışma süresince Russell ve Burch'ın dünyaca kabul görmüş 3R (Replacement; Alternatif yöntemleri sorgulama, Reduction; Çalışmanın hipotezlerine uygun en az sayıda hayvan kullanma, Refinement; hayvan refahını ön planda tutma) kuralına büyük bir özenle uyulmuş, hayvanlara karşı sorumluluk duygusu ön planda tutulmuştur.(80)

### 3.6.2. Bakteriyel köken:

*K. pneumoniae* B5055 (serotip O1:K2) (Copenhagen Statens Serum Institut'den ) temin edilmiştir.

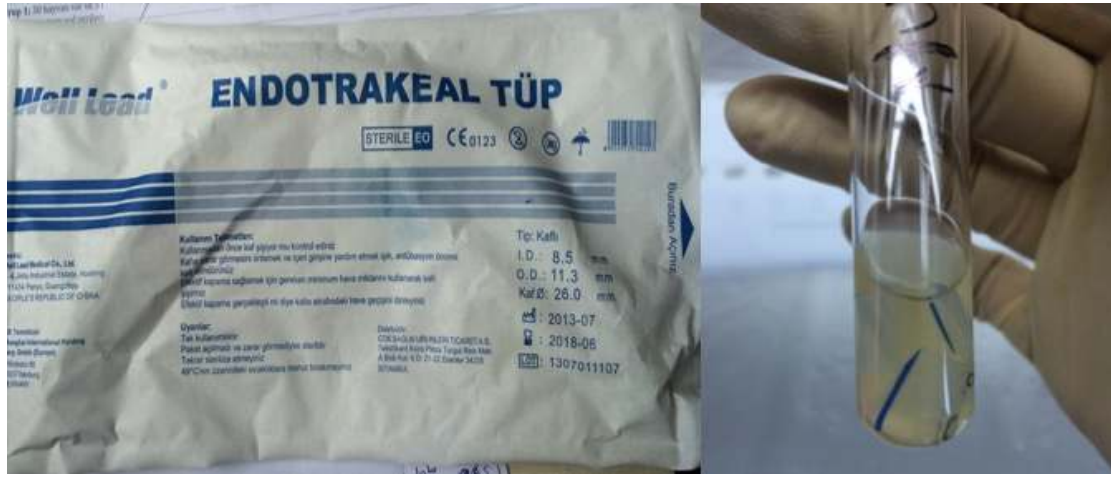
#### **Planktonik (serbest formda) hücrelerin elde edilmesi**

*K. pneumoniae* B5055 suşu MHA pasajlandı, 37°C da 18 saat inkübe edildi. Ertesi gün üreyen koloniler tüp içindeki MHB besiyerine alındı, 37°C da 18 saat tekrar inkübe edildi. Hücreler 2400 g de 15 dakika santrifüj edildi, pellet 3 kez steril PBS ile yıkanacaktır. En son steril fosfat tampon (PBS) ile  $10^4$  CFU/ mL olacak şekilde dilüe edildi. (80)

### 3.6.3. Biyofilm hücrelerinin elde edilmesi

*K. pneumoniae* B5055 suşu MHA besiyerine pasajlanarak 37°C da 18 saat inkübe edildi. Ertesi gün üreyen koloniler tüp içindeki MHB besiyerine alındı. Endotrakeal tüp (ETT) 20

mm' lik parçalara ayrılarak bu besiyerine alındı. ETT parçası, 18 saat sonra steril PBS ile yıkandı, taze MHB besiyeri içeren tüpe alındı. Bu işlem üç gün süresince tekrarlandı. ETT parçaları Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope; SEM) yardımıyla incelendi. Literatür önerileri doğrultusunda biyofilm yapının varlığı değerlendirildi ve görüntüldü. (Şekil 10) (81). Daha sonra ETT steril PBS ile yıkandı ve hücreler  $10^4$  CFU/mL olacak şekilde dilüe edildi (82). Kontrol ETT için, tüp parçaları aynı prosedürle sadece PBS kullanılarak hazırlandı.



Şekil 10. Endotrakeal tüp ve biyofilm hücreleri elde etme işlemi

#### 3.6.4. Enfeksiyon modeli

PBS verilen fareler (n=6) tek bir kafes içinde barındırıldı. Enfeksiyon modeli için grup 1 ve 2 de yer alan fareler her bir kafeste 6 fare olacak şekilde rasgele IVC kafeslere yerleştirildi (Şekil 11,12). Grupların karışmaması için farelerin kuyrukları kalemle işaretlendi. Kafesler etiketlendi.

**Grup 1; (n=30; 6 fare x 5 kafes)** Farelere  $10^4$  CFU/ ml *K. pneumoniae* planktonik hücreleri intranazal yolla (farelere anestezi verilmeden) 50 µl inokule edildi.

**Grup 2; (n=30; 6 fare x 5 kafes)** Farelere  $10^4$  CFU/ ml *K. pneumoniae* **biyofilm** hücreleri intranazal yolla (farelere anestezi verilmeden) 50 µl inokule edildi.

Grup 1 ve 2 de yer alan farelerden 6 tanesi 6-24-48-72 ve 96. saatlerde sakrifiye edildi.

**Grup 3; (n=6) PBS verilen grup;** intranazal yolla (farelere anestezi verilmeden) 50 µl PBS inokule edildi.



**Şekil 11.** IVC kafes etiketleme sistemi ve kafes içinde BALB/c fareler

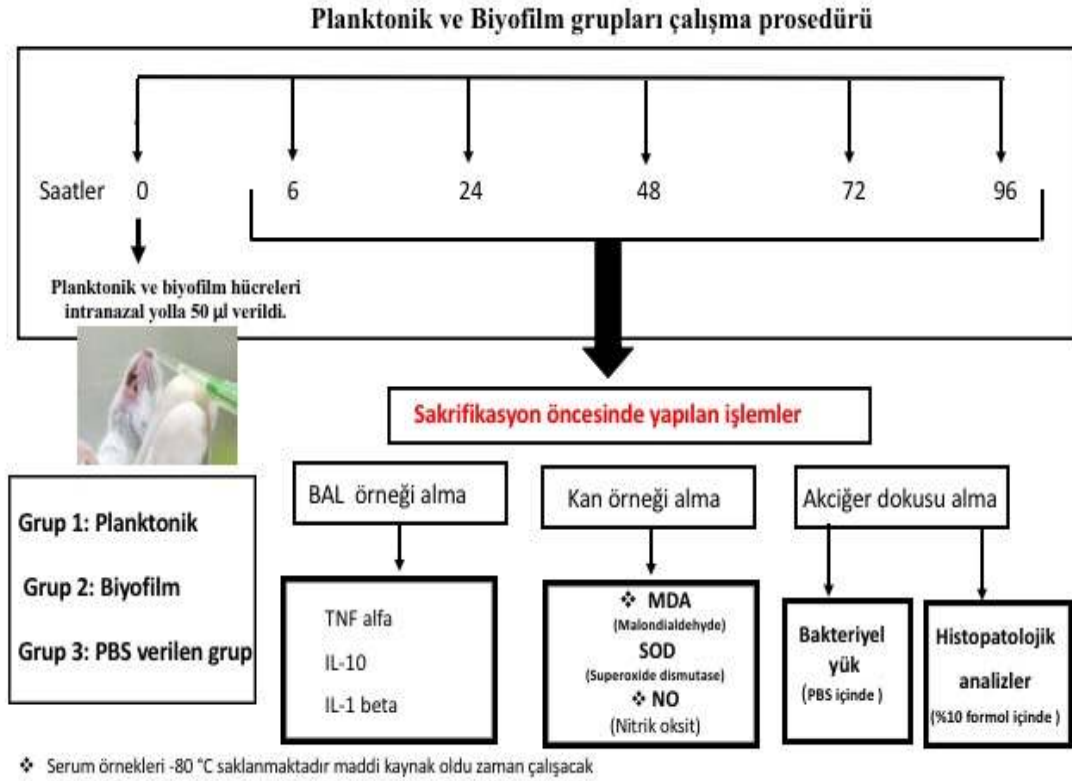




**Şekil 12.** Ege Üniversitesi, ARGEFAR IVC kafes sistemi

Sakrifikasyon işlemi öncesinde sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı; (Şekil 13)

- Farelere intraperitoneal yol ile ketamin (35-50 mg/kg) ve ksilazin (5-10 mg/kg) anestezisi uygulandı.
- Bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) alındı. (Şekil 14)
- Periton açıldı, karaciğer diyaframa doğru itilerek kaudal vena cava görünür hale getirildi. (Şekil 15) Çalışma için gerekli kan (1 ml) örneği alındı.
- Sağ akciğer üst lobu bakteriyel yükün saptanması amacıyla steril PBS içine alındı. Kalan akciğer dokusu histopatolojik değerlendirme için %10 formol içine alındıktan sonra fareler kardiyak kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi.
- Ölü fareler tıbbi atık yönetmeliğine uygun olarak uzaklaştırıldı.



**Şekil 13.** Planktonik ve biyofilm grupları çalışma prosedürü

### 3.6.5. Bronkoalveoler lavaj uygulaması

Anestezi sonrası aseptik cerrahi şartlar altında farelerin boyun ön yüzeyine bistüri ile kısa bir kesi atıldıktan sonra trakea künt diseke edildi. Farelerin trakealarına 26 G branül yerleştirildi. (Şekil 14) İnsülin enjektörüne çekilen steril 1 ml PBS trakeadan verildi daha sonra sıvı geri çekildi, 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Alınan BAL örneği 1500 devirde 3 dakika süre ile santrifüj edildi. Üst faz 1,5 ml’lik steril mikrosantrifüj tüpüne alındı, IL-10 ve TNF alfa düzeylerinin belirlenmesi amacı ile çalışma gününe kadar -80°C’da saklandı. Dip pelletten preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar havada kurutularak tespit edildikten sonra Gram boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda balteri, hücre ve biyofilm yapıları değerlendirildi.



**Şekil 14.** Fareden BAL alma uygulaması



**Şekil 15.** Fareden kan alma uygulaması

### **3.6.6. Akciğer dokusunda bakteriyel yükün belirlenmesi**

Steril PBS içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içinde bulunan fare akciğer dokuları homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi için 5 mm çapında steril paslanmaz çelik boncuk tüpe alındı. Mikrosantrifüj tüpleri Tissuelyser LT raklarına alınıp TissueLyser (Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Elde edilen homojenatdan MHA ve EMB agara kantitatif ekim yapıldı. Plaklar 37°C 18 saat inkübe edildi, koloni sayısı CFU/ml olarak hesaplandı.

### **Gram boyama yöntemi**

Çalışmada kullanılan izolatlar Gram boyama yöntemiyle boyandı. Koloniler öze ile lam üzerine alınarak, 1 damla serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Havada kurutulup alevde tesbit edilmiş preparat üzerine aşağıdaki işlemler uygulandı;

- Kristal viyoleto damlatıldı, 1 dakika beklendi. Preparat akar su altında yıkandı.
- Lugol damlatıldı, 1 dakika beklendi. Preparat akar su altında yıkandı.
- Alkol ile 30 saniye süresince renksizleştirme işlem yapıldı. Preparat akar su altında yıkandı.
- Zıt boyama için sulu füksin damlatıldı, 1 dakika beklendi. Preparat akarsu altında yıkandı.
- Preparat oda ısısında kurumaya bırakıldı.

### **3.6.7. Sitokin yanıtlarının belirlenmesi**

BAL örneklerinden IL-10 ve TNF alfa düzeyleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemi ile belirlendi. (eBioscience Mouse ELISA Kit, USA)

### **TNF alfa**

#### **Reaktiflerin hazırlanması**

**1- 1X Yıkama tamponu:** 20X wash buffer distile suyla karıştırarak hazırlandı

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 20X wash buffer | 50 ml  |
| Distile su      | 950 ml |

**2- Deney tamponu:**

|              |       |
|--------------|-------|
| Assay buffer | 5 ml  |
| Distile su   | 95 ml |

**3- Biotin-konjugat:**

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Biotin-konjugat | 0.03 ml |
| Assay buffer    | 5.97 ml |

**4- Streptavidin –HRP**

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Streptavidin –HRP | 0.12 ml  |
| Assay buffer      | 11.88 ml |

**5- Standart**

330 µl Sample diluent ekleyerek karıştırılır bu karışım birinci standart olarak işaretlenir. Daha sonra 130 µl Sample Diluent 6 tane tüpün içine pipetlenir ve S1 den S2'ye 130 µl eklenir, karıştırılır. S2'den den S3 130 µl eklenir, karıştırılır. Bu işlem S7 kadar devam ettirilir ve son hacim dışarı atılır.

**Protokol:**

- 1- 96 lı plak 400 µl yıkama tamponuyla 2 kere yıkandı.
- 2- Tüm kuyucuklara 50 µl sample diluent pipetlendi.
- 3- 50 µl örnekten örnek kuyularına pipetlendi.
- 4- 50 µl Biotin-konjugat tüm kuyulara pipetlendi.
- 5- Oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.
- 6- Plaklar 400 µl yıkama tamponuyla otomatik yıkama cihazında 6 defa yıkandı.
- 7- Plaklar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- 8- 100 µl streptavidin-HRP tüm kuyucuklara eklendi.
- 9- Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- 10- Plaklar 400 µl yıkama tamponuyla otomatik yıkama cihazında 6 defa yıkandı.
- 11- Plaklar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- 12- 100 µl TMB tüm kuyucuklara eklendi.
- 13- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletildi.

- 14- 100 µl stop solusyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- 15- ELISA plakları 450 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. (BioTek Synergy HT, USA)

## IL-10

### Reaktiflerin hazırlanması

- 1- **1X Yıkama tamponu:** 20X wash buffer distile suyla karıştırarak hazırlandı

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 20X wash buffer | 50 ml  |
| Distile su      | 950 ml |

- 2- **Deney tamponu:**

|              |       |
|--------------|-------|
| Assay buffer | 5 ml  |
| Distile su   | 95 ml |

- 3- **Biotin-konjugat:**

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Biotin-konjugat | 0.12 ml  |
| Assay buffer    | 11.88 ml |

- 4- **Streptavidin –HRP**

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Streptavidin –HRP | 0.06 ml  |
| Assay buffer      | 11.64 ml |

- 5- **Standart**

Ana standart tüpüne 500 µl distile su ekleyerek karıştırılır. Daha sonra 130 µl Sample Diluent 7 tane tüpün içine pipetlenir. Ana standarttan S1 tüpüne 225 µl eklenir, karıştırılır. S1 den S2’ye 225 µl eklenir, karıştırılır. Bu işlem S7 kadar devam ettirilir ve son hacim dışarı atılır.

### Protokol:

- 1- 96 lı plak 400 µl yıkama tamponuyla 2 kere yıkandı.
- 2- Tüm kuyucuklara 50 µl sample diluent pipetlendi.
- 3- 50 µl örnekten örnek kuyularına pipetlendi.
- 4- 50 µl Biotin-konjugat tüm kuyulara pipetlendi.
- 5- Oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.
- 6- Plaklar 400 µl yıkama tamponuyla otomatik yıkama cihazında 4 defa yıkandı.
- 7- Plaklar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı.

- 8- 100 µl Biotin-konjugat tüm kuyucuklara pipetlendi.
- 9- Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- 10- Plaklar 400 µl yıkama tamponuyla otomatik yıkama cihazında 4 defa yıkandı.
- 11- Plaklar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- 12- 100 µl streptavidin-HRP tüm kuyucuklara eklendi.
- 13- Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- 14- Plaklar 400 µl yıkama tamponuyla otomatik yıkama cihazında 4 defa yıkandı.
- 15- Plaklar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucuklarda kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- 16- 100 µl TMB tüm kuyucuklara eklendi .
- 17- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dk bekletildi.
- 18- 100 µl stop solusyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- 19- ELISA plakları 450 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. (BioTek Synergy HT, USA)

### 3.6.8. Histopatolojik analizler

#### 3.6.8.1. Rutin doku takip protokolü

Alınan akciğer dokular histokimyasal incelemeler için %10’luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96’lık etil alkol serilerinde 20’şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20’şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30’ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1’er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 5 ) (83-85).

**Tablo 5.** Rutin doku takibi protokolü

| İşlem | Madde | Süre |
|-------|-------|------|
|-------|-------|------|

|                                 |                              |               |
|---------------------------------|------------------------------|---------------|
| <b>Fiksasyon</b>                | %10'luk formol               | 24-48 saat    |
| <b>Fiksatiften Uzaklaştırma</b> | Akarsu                       | 1 gece        |
| <b>Dehidratasyon</b>            | %70-80-96'lık alkol serileri | 20'şer dakika |
| <b>Post Fiksasyon</b>           | Aseton-1                     |               |
|                                 | Aseton-2                     | 20'şer dakika |
|                                 | Aseton-3                     |               |
|                                 | Aseton-4                     |               |
| <b>Şeffaflandırma</b>           | Xylol-1                      | 30'ar dakika  |
|                                 | Xylol-2                      |               |
|                                 | Yumuşak parafin-1            | 1'er saat     |
|                                 | Yumuşak parafin-2            |               |
| <b>Bloklama</b>                 | Sert parafin                 |               |

### 3.6.8.2. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 5 dakika Hematoksilen-Eozin (HE) (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. (Tablo 6)

Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (83-85)



**Tablo 6.** Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

| İşlem                   | Madde                   | Süre      |
|-------------------------|-------------------------|-----------|
| <b>Deparafinizasyon</b> | 60°C etüvde             | 30 dakika |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen 1 (etüvde)       | 20 dakika |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen 2 (oda ısısında) | 10 dakika |
| <b>Deparafinizasyon</b> | Ksilen 3 (oda ısısında) | 10 dakika |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %100'lük alkol          | Çalkalama |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %100'lük alkol          | Çalkalama |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %96'lık alkol           | Çalkalama |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %80'lik alkol           | Çalkalama |
| <b>Rehidratasyon</b>    | %70'lik alkol           | Çalkalama |
| <b>Yıkama</b>           | Distile Su              | Çalkalama |
| <b>Boyama</b>           | Hematoksilen            | 10 dakika |

|                       |                             |           |
|-----------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>Yıkama</b>         | Akarsu                      | 10 dakika |
| <b>Boyama</b>         | Eozin                       | 2 dakika  |
| <b>Yıkama</b>         | %70-80-96-100-100'lük alkol | Çalkalama |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 1                    | 20 dakika |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 2                    | 20 dakika |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 3                    | 20 dakika |
| <b>Kapama</b>         | Entellan                    |           |
| <b>Boyama</b>         | Eozin                       | 2 dakika  |
| <b>Yıkama</b>         | %70-80-96-100-100'lük alkol | Çalkalama |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 1                    | 20 dakika |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 2                    | 20 dakika |
| <b>Şeffaflaştırma</b> | Ksilen 3                    | 20 dakika |
| <b>Kapama</b>         | Entellan                    |           |

### 3.6.9. Taramalı Elektron Mikroskobu ile ETT biyofilm yapıların gösterilmesi

Kontrol ETT ve biyofilm pozitif ETT' ler 30 saniye süreyle serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra örnekler tampon A 'ya [%5 Glutaraldehit (pH 7,2)] alınarak 30 dakika bekletildi. Başka bir solüsyonla yıkama yapmadan Tampon B 'ye [%7 Sukroz (7g/100 ml)] alınarak 15 dakika bekletildi. Yine yıkama yapmadan Tampon C 'ye (%2 Ozmiyum tetroksit) alınarak 30 dakika bekletildi. Distile suda 5 dakika yıkandı. Örnekler artan derecelerdeki alkol serileri (%70, %85, %95, %100) içerisinde her bir basamak 5 dakika olacak şekilde dehidrate edildi. Örnekler şeffaflandırma aşaması için hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 30 dakika kurutulduktan sonra cyritical point dryer (Quorum K850) ile örnekler tamamen kurutuldu. Daha sonra özel bir kaplama cihazında (Quorum Q150R S)

[illegible]

|    |                                                                                                                 |  |  |  |   |  |   |   |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|---|--|---|---|--|---|---|---|---|---|--|--|--|
|    | hücrelerinin elde edilmesi çalışmaları                                                                          |  |  |  |   |  |   |   |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 4  | Farede <i>K. pneumoniae</i> B5055 suşu planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfeksiyon modelinin oluşturulması. |  |  |  | X |  |   |   |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 5  | Sakrifikasyon, serum, BAL ve doku örneklerinin alınması, saklanması.                                            |  |  |  | X |  |   |   |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 6  | Dokularda bakteriyel yükün belirlenmesi suşların stoklanması                                                    |  |  |  | X |  |   |   |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 7  | Sitokin yanıtlarının belirlenmesi                                                                               |  |  |  |   |  | X | X |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 8  | ARGE FAR ara raporunun teslimi                                                                                  |  |  |  |   |  |   | X |  |   |   |   |   |   |  |  |  |
| 9  | Doku kesitlerinin değerlendirilmesi                                                                             |  |  |  |   |  |   |   |  | X | X | X |   |   |  |  |  |
| 10 | Tüm ham verilerin değerlendirilmesi, istatistiksel analizler ve yorumlama                                       |  |  |  |   |  |   |   |  |   | X | X | X |   |  |  |  |
| 11 | Tezin yazılması.                                                                                                |  |  |  |   |  |   |   |  |   | X | X | X | X |  |  |  |

### 3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler bulgular kısmında açıklanmıştır.

### 3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

- Çalışma için Mayıs 2014’ de DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna (HADYEK) “Fare ve *Galleria mellonella* larvasında, *Klebsiella pneumoniae* biyofilm enfeksiyon

modelinde virölansın karşılaştırmalı analizi” başlığı ile başvurulmuştur (HADYЕК No: 34/2014). Ancak DEÜ Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı yeni yapılan DEPARK binası nedeni ile 800 m<sup>2</sup> alandan 300 m<sup>2</sup> alana küçölmek zorunda kaldığı için ve ABSL 1 donanımına sahip olduğundan etik onay alamamış, çalışma EÜ’ne yönlendirilmiştir.

- Çalışmanın *G. mellonella* larvası bölümü çıkarılmış, fare modeli için EÜ HADYЕК’e başvurulmuştur. *In vivo* çalışmalar Ege Üniversitesi ARGEFAR ABSL-2 laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.
- Literatüre yenilik getirmek amacıyla enfeksiyon sonrası sakrifikasyon saatleri 1-6-12-24 ve 48 saat olarak belirlenmişti. Ancak aşağıdaki nedenlerden dolayı sakrifikasyon saatleri değiştirilmek zorunda kalınmıştır;
  1. ARGEFAR çalışma saatlerinin esnek olmaması, mesai saatlerinin uzatılamaması
  2. Çalışmanın *in vitro* basamakları için sakrifikasyon sonrası kan, doku ve BAL örnekleri DEÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji AD. 4028 nolu laboratuvara getirilmiş ve işlemlenmiştir. Çalışma zamana bağlı olduğundan, işleme ve yolda kaybedilecek zamanlar düşünölerek sakrifikasyon saatleri yeniden düzenlenmiştir.
- Çalışma TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programına gönderilmişti. (115S129) Değerlendirme sonucunda panel puan seviyesi “C” olarak bildirildi. Projenin revizyonu ya da maddi destek amacıyla başka bir programa gönderilmesi için yeterli süre olmadığından eldeki mevcut olanaklarla devam edilmiştir. Bu nedenle serum örneklerinden ELISA yöntemi ile çalışılması planlanan MDA, SOD, NO çalışılamamıştır. Serum örnekleri -80°C’da saklanmaktadır.

- BAL örneklerinden IL-1 beta, IL-10 ve TNF alfa düzeylerinin belirlenmesi ticari kitler satın alınmıştı. Bu çalışmalar için DEÜTF ARLAB’nda bulunan cihazların kullanılması planlanmıştı. IL-1 beta çalışmasının yıkama aşamasında otomatik yıkama cihazı arızalanmış ve plate zarar görmüştür. Bu nedenle elde edilen sonuçlar tez içinde değerlendirmeye alınmamıştır.

### **3.10. Etik kurul onayı**

EÜ HADYЕК tarafından değerlendirilmiş ve yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına karar verilmiştir. (2014-078)

## **4. BULGULAR**

### **Vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi**

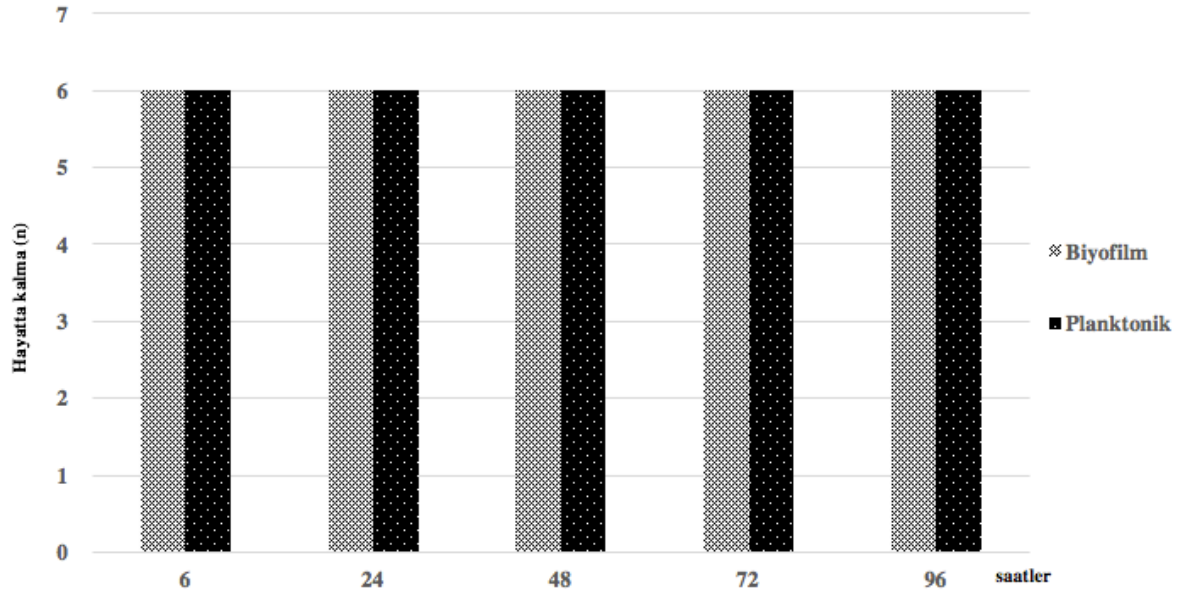
Çalışmanın başlangıcında ve sakrifikasyon öncesi farelerin ağırlıkları tek tek ölçüldü ve kaydedildi. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, planktonik ve biyofilm grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 7.** Deney hayvanlarının deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları

### Zamana bağlı hayatta kalma

Çalışma gruplarına göre, zamana bağlı olarak farelerin yaşam süreleri değerlendirildiğinde PBS verilen grup, *K.pneumoniae* B5055 planktonik hücreleri ile enfekte grup ve biyofilm hücreleri ile enfekte gruplarda ölüm gözlenmedi. (Şekil 16)

| Gruplar    | 0.saat   | 6.saat   | 0.saat   | 24.saat  | 0.saat   | 48.saat  | 0.saat   | 72.saat  | 0. saat  | 96.saat  |
|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Planktonik | 24.6±2.1 | 24.6±2.1 | 26.6±1.6 | 26.5±1.7 | 28.8±1.0 | 27.6±0.9 | 27.1±1.1 | 26.8±0.9 | 28.6±0.8 | 28.0±0.9 |
| Biyofilm   | 31.1±1.1 | 31.1±1.1 | 29.8±1.4 | 29.3±1.4 | 27.8±1.8 | 27.3±2.1 | 30.3±1.9 | 29.1±1.7 | 29.8±1.5 | 28.8±1.7 |

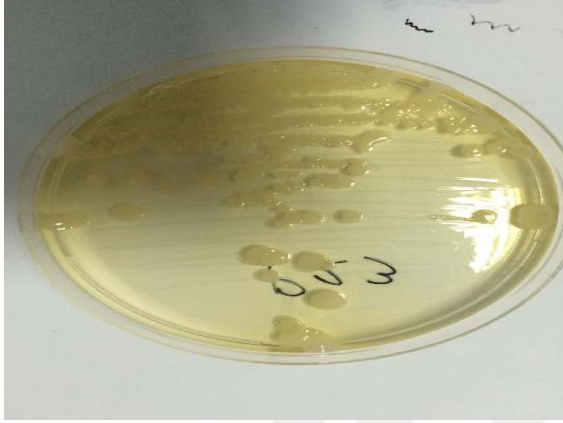


**Şekil 16.** *K. pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde zamana bağlı olarak hayatta kalma

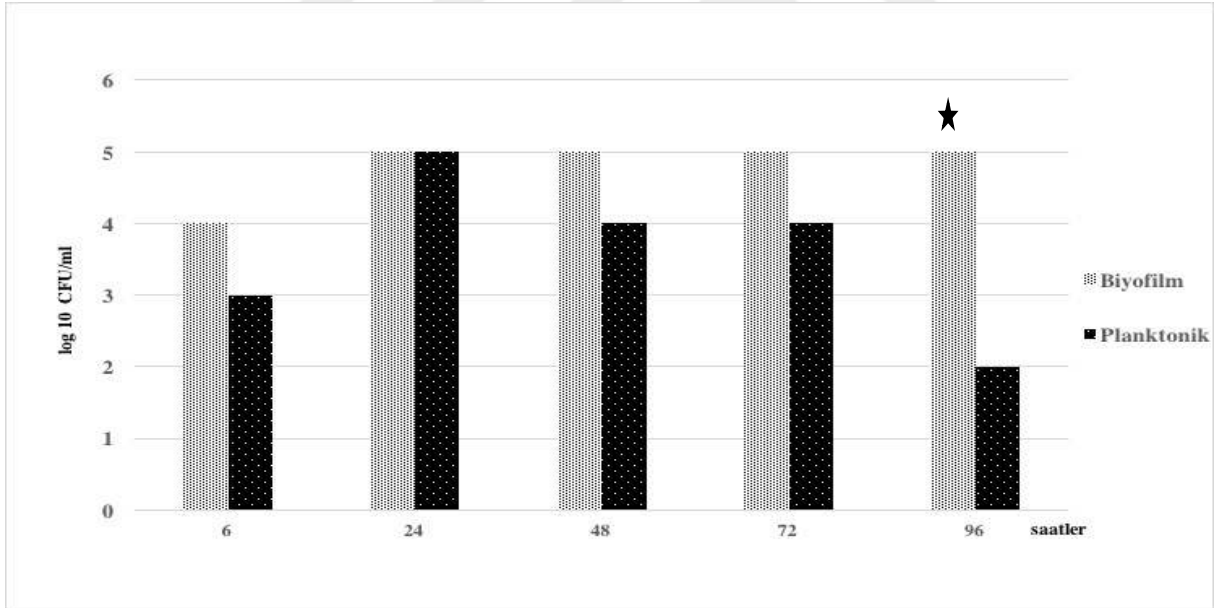
### Bakteriyal yük değerlendirilmesi

*K.pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri verilen farelerin akciğer doku homojenatlarından yapılan kantitatif kültür ekimleri ertesi gün gruplara göre değerlendirildi. PBS verilen grupta 96 saat sonunda herhangi bir bakteri üremesi saptanmadı. İlk olarak

değerlendirme yapılan 6. saatte planktonik ve biyofilm gruplarının her ikisinde de *K. pneumoniae* üremesi saptandı. (Şekil 17) Biyofilm grubunda üreme daha yoğun olarak görülmekle birlikte anlamlı bir farklılık yoktu. Her iki grupta da 24. saate kadar logaritmik üreme olduğu gözlemlendi. Bu saatten itibaren yapılan 48, 72 ve 96. saat değerlendirmelerinde biyofilm grubunda bakteriyel yük aynı düzeyde devam ederken planktonik hücreler ile enfekte grupta düşüş belirlendi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ( $p<0.000$ ) (Şekil 18)



Şekil 17. MHA agarda *K. pneumoniae* üremesi



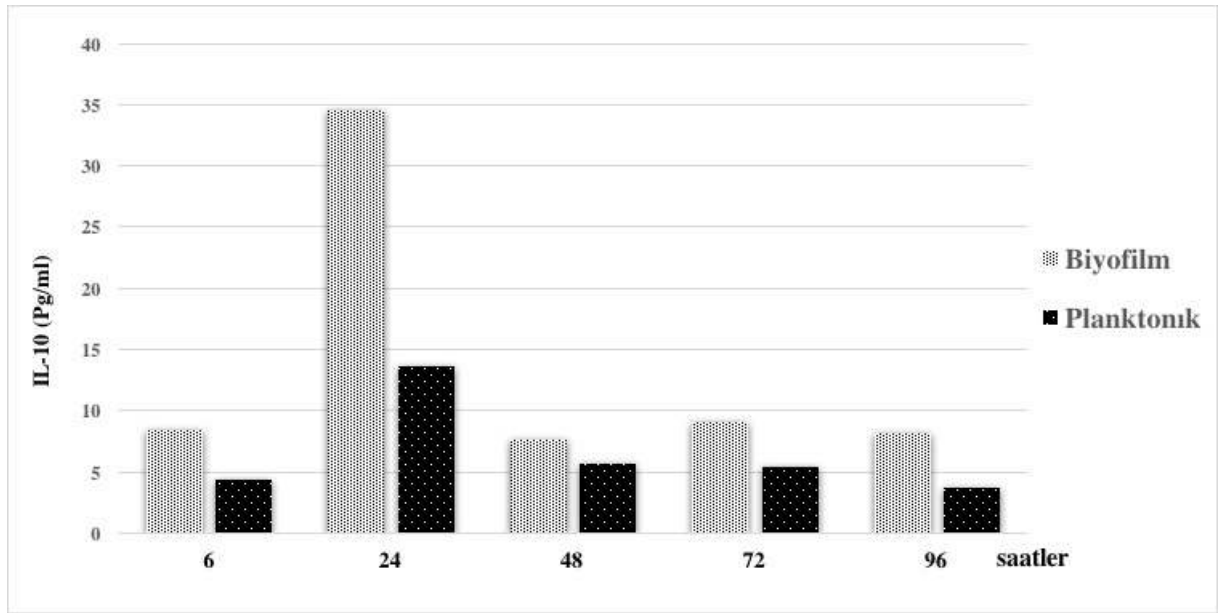
Şekil 18. *K. pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde zamana bağlı olarak bakteriyel yükte değişiklikler

### Sitokin yanıtlarının değerlendirilmesi

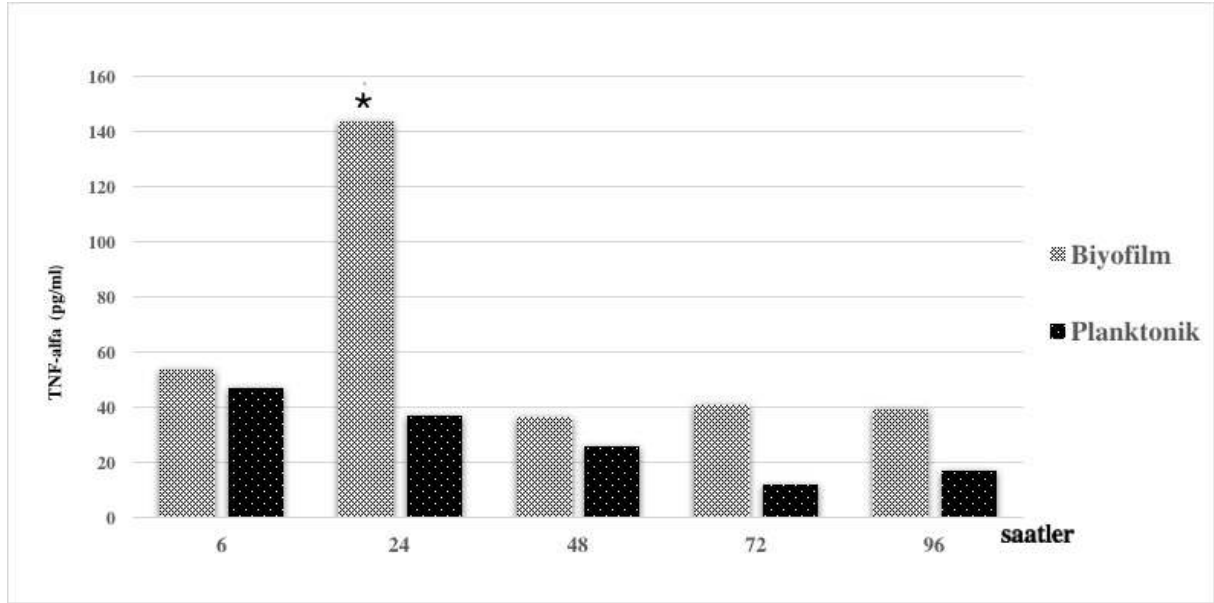
*K.pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri verilen farelerin BAL örneklerinden yapılan pro-enflamatuar sitokin TNF alfa ve IL-10 analizleri sonucunda elde edilen veriler zamana bağlı olarak değerlendirildi. Altıncı saatten itibaren yapılan



değerlendirmeler sonucunda; enfeksiyonun 24. saatinde her iki grupta TNF alfa ve IL-10 düzeylerinin en yüksek noktaya ulaştığı görülmüştür. Biyofilm grubunda gözlenen TNF alfa düzeylerinde artış, planktonik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ( $p<0.003$ ) Ancak IL-10 düzeylerinde artış olmakal birlikte fark bulunamamıştır. 24. saatten itibaren sitokin düzeylerinin düştüğü, her iki grupta da 6. saatteki seviyeye indiği saptanmıştır. (Şekil 19,20).



**Şekil 19.** *K. pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde IL-10 sitokin yanıtları

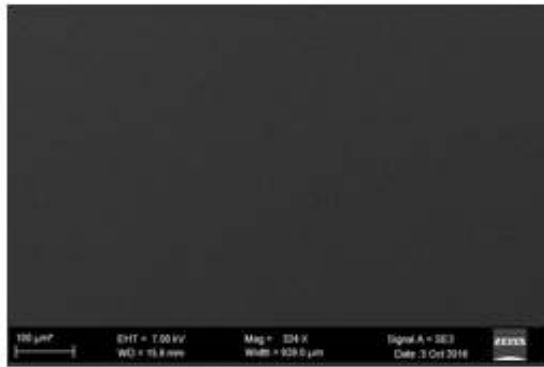
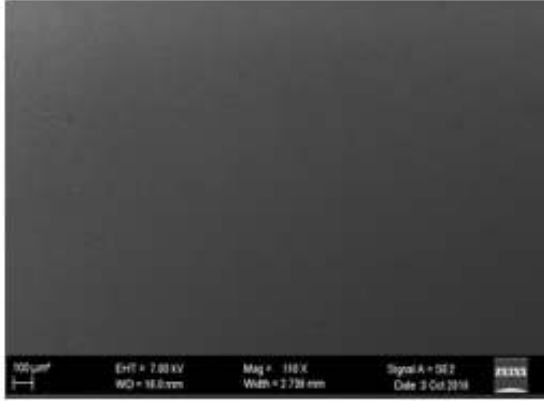


**Şekil 20.** *K. pneumoniae* B5055 planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde TNF-alfa sitokin yanıtları

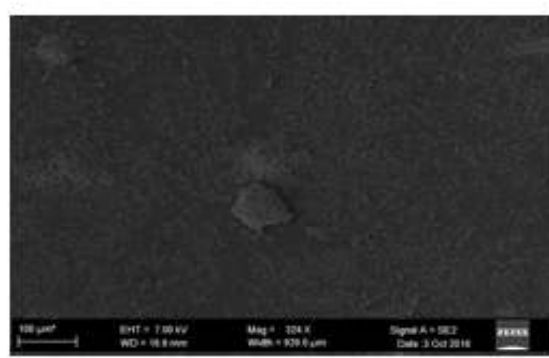
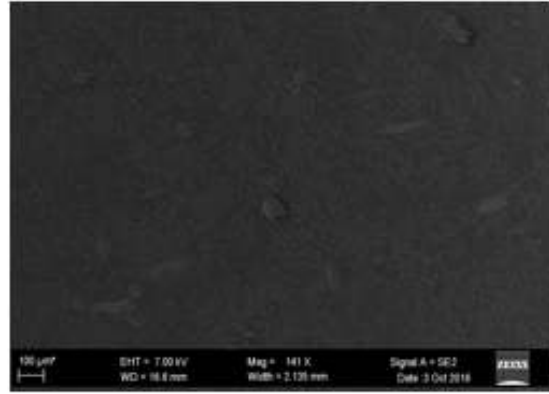
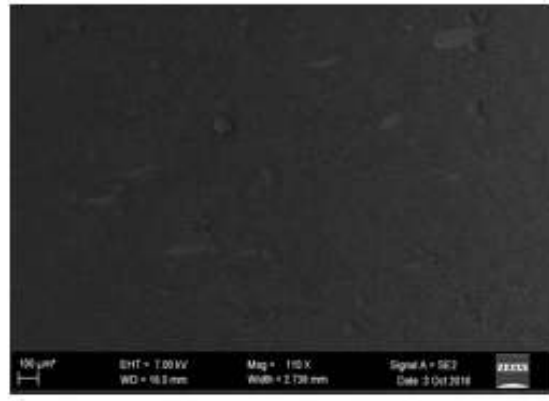
### Endotrakeal tüplerin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi

Kontrol ve biyofilm için hazırlanan ETT parçaları SEM ile görüntülendi. ETT yüzeyinde bakteri kümeleri ve EPS tabakanın varlığı biyofilm olarak tanımlandı. Görüntüler digital olarak kaydedildi. (Şekil 21, 22)

Kontrol ETT

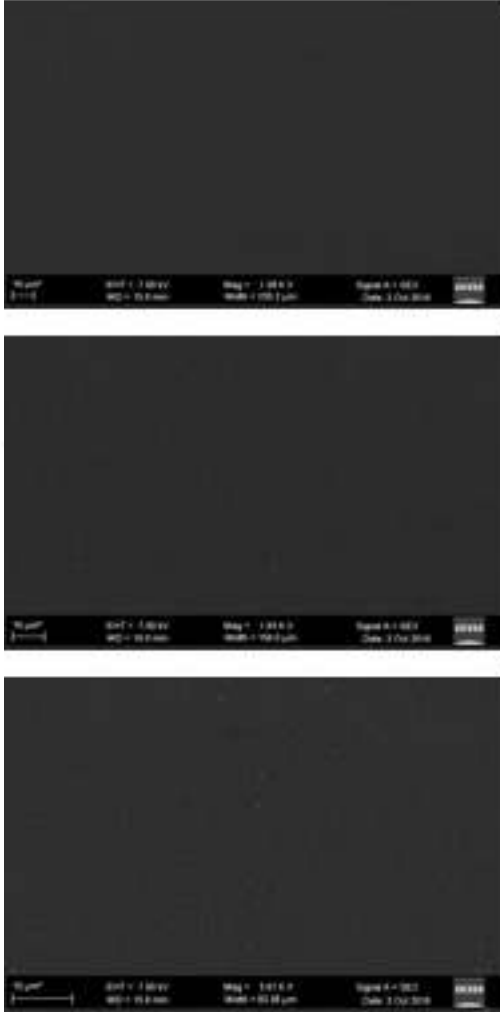


Biyofilm pozitif ETT

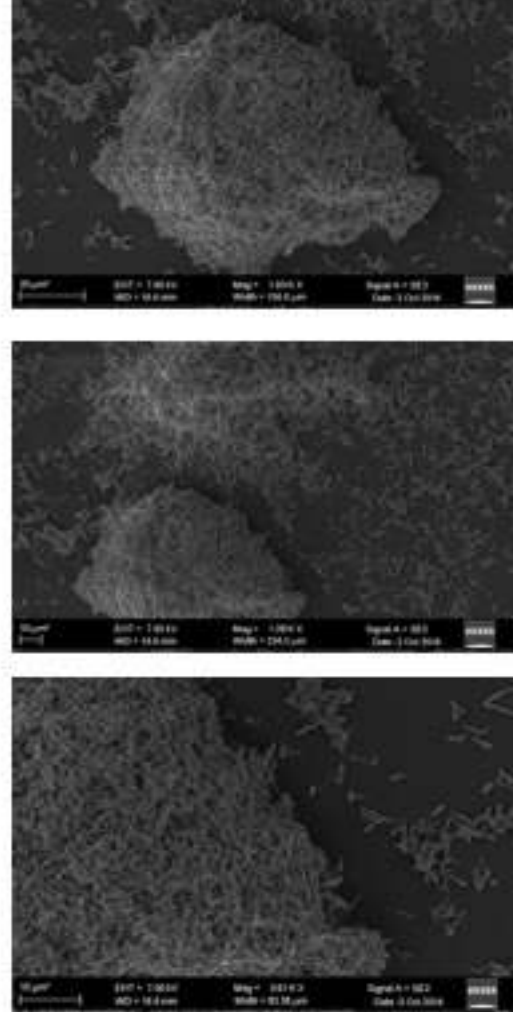


Şekil 21. Kontrol ve biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü

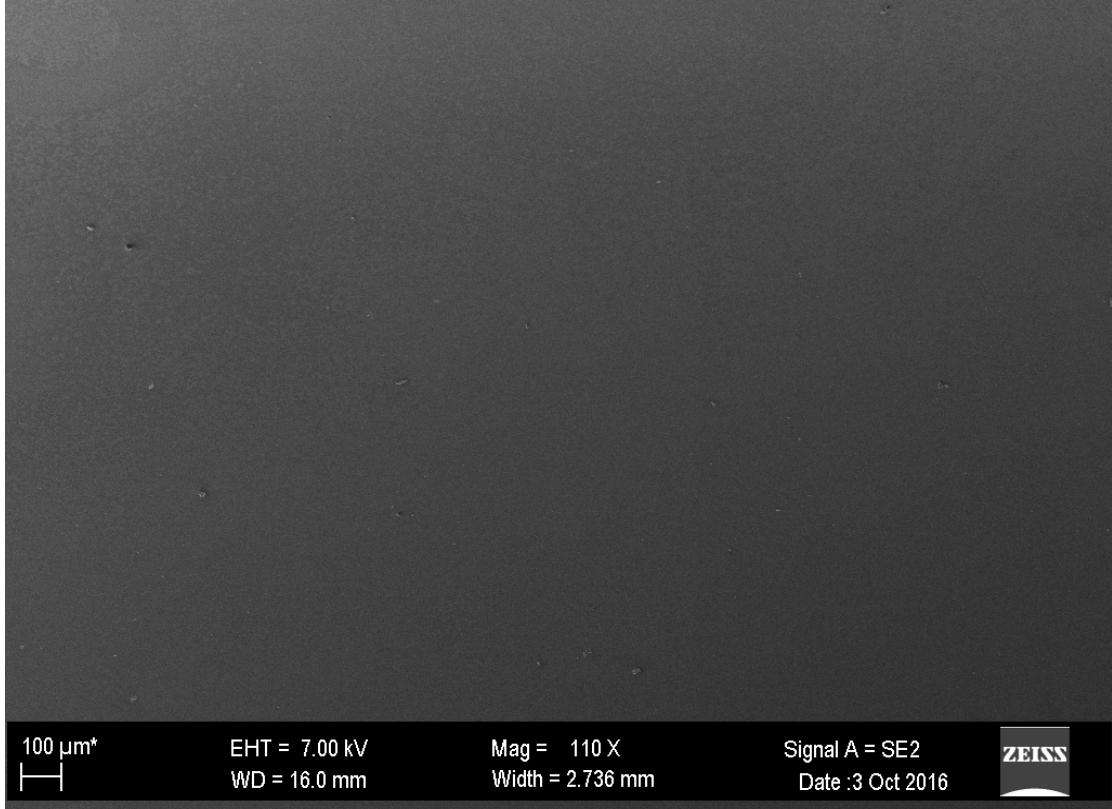
Kontrol



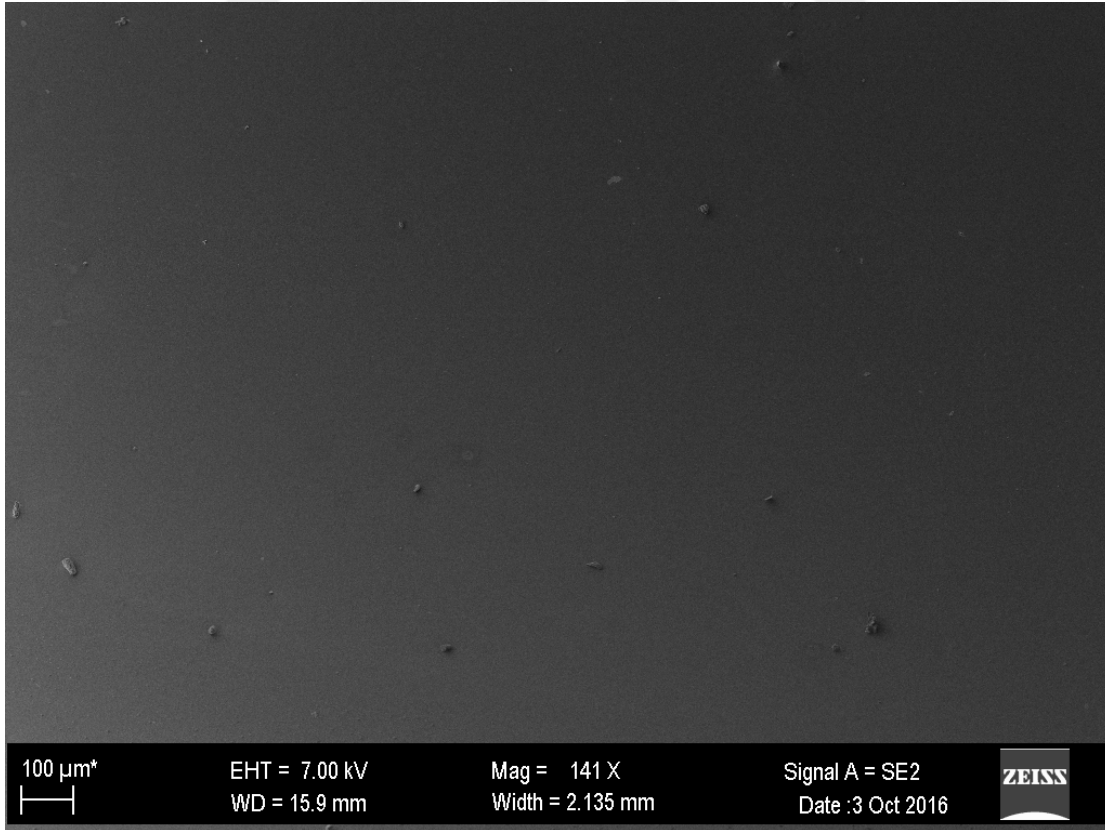
Biyofilm pozitif



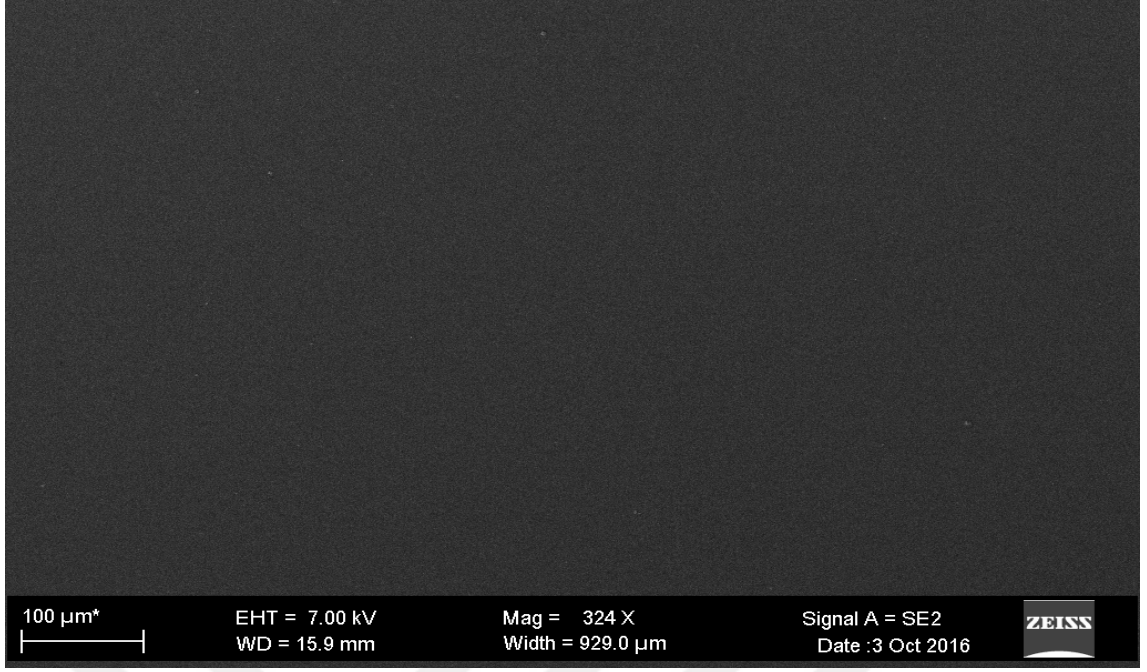
Şekil 22. Kontrol ETT ve biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü



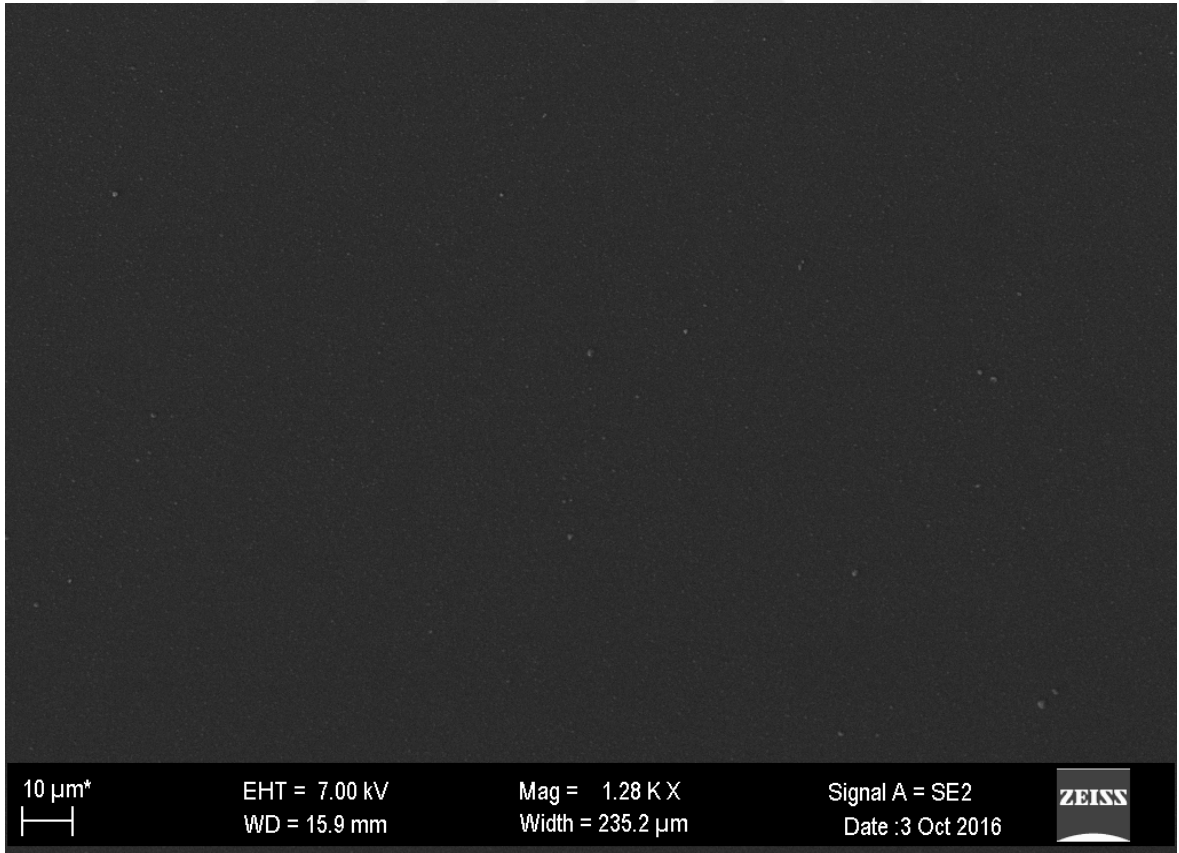
Şekil 23. Kontrol ETT SEM görüntüsü (110X)



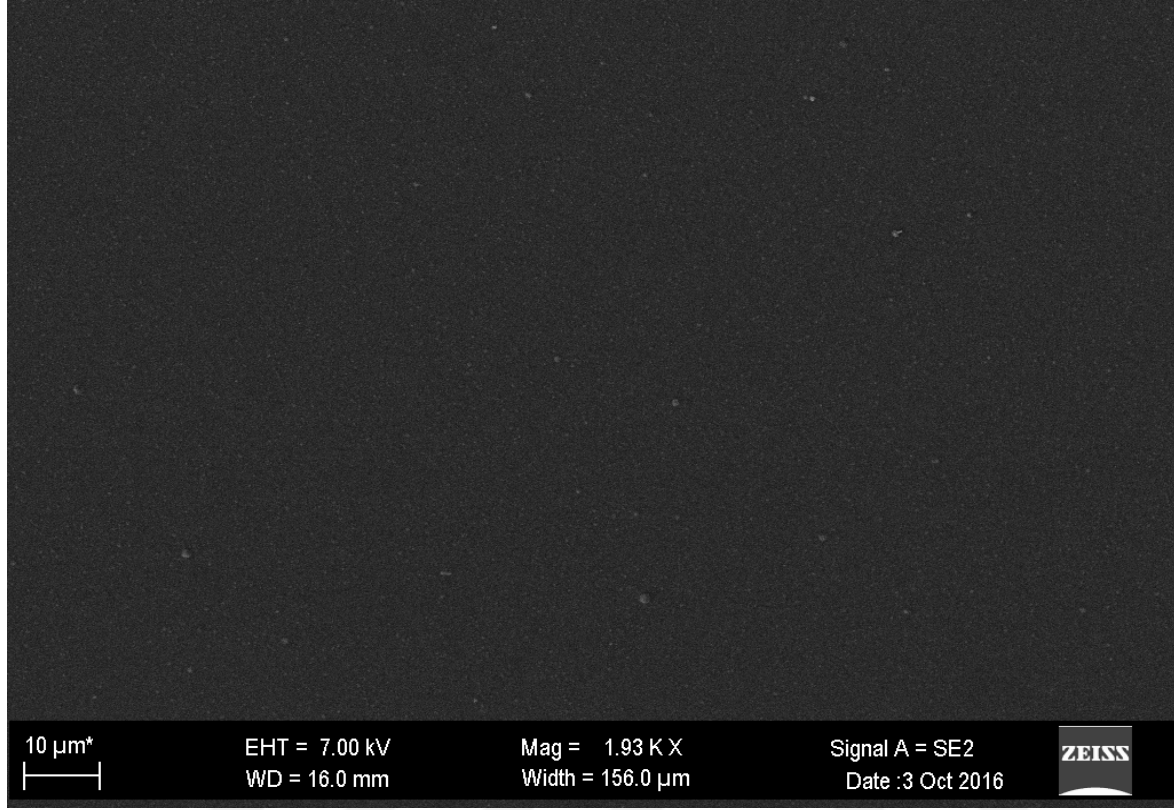
Şekil 24. Kontrol ETT SEM görüntüsü (141X)



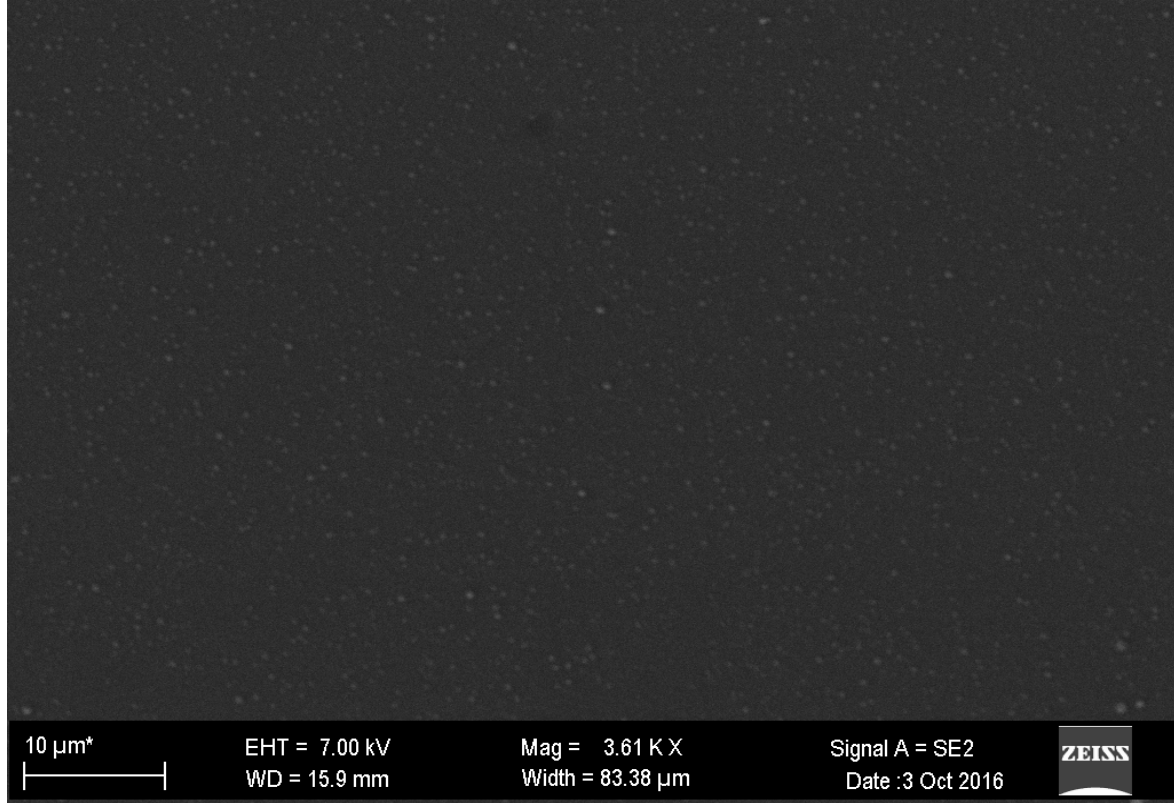
Şekil 25. Kontrol ETT SEM görüntüsü (324 X)



Şekil 26. Kontrol ETT SEM görüntüsü (1.28 KX)

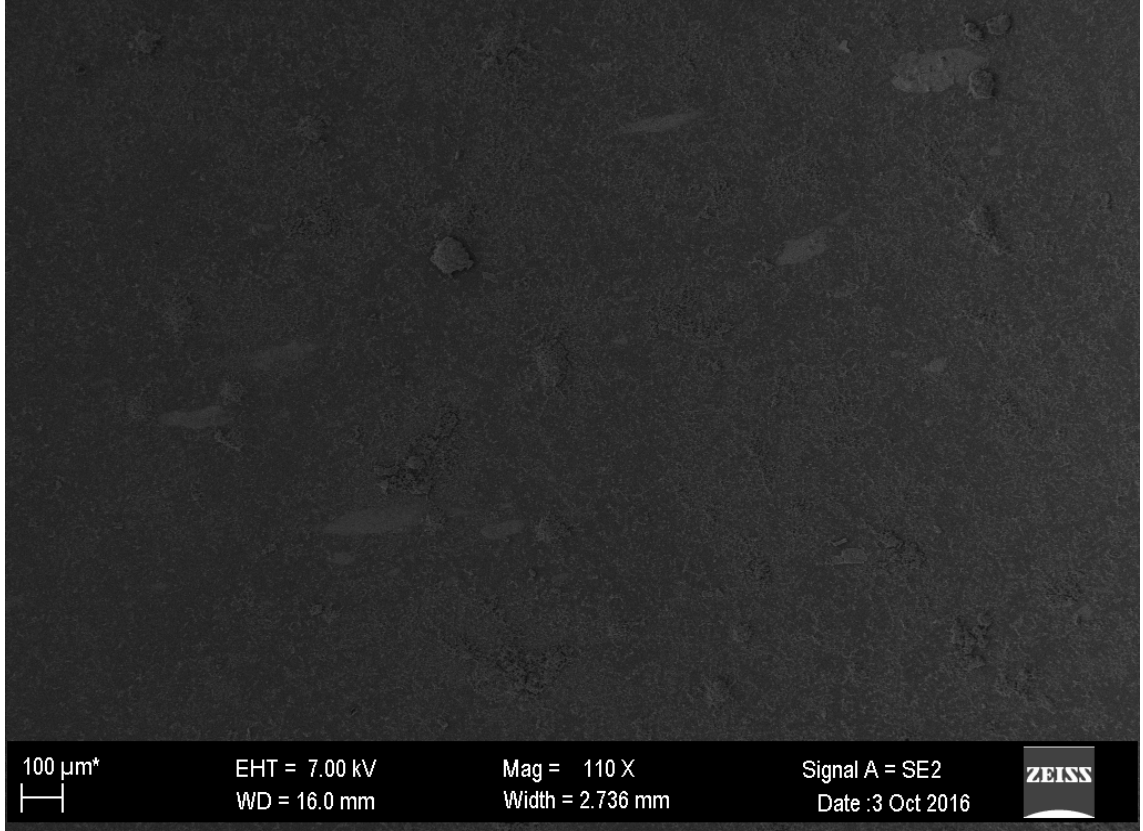


Şekil 27. Kontrol ETT SEM görüntüsü (1.93 KX)

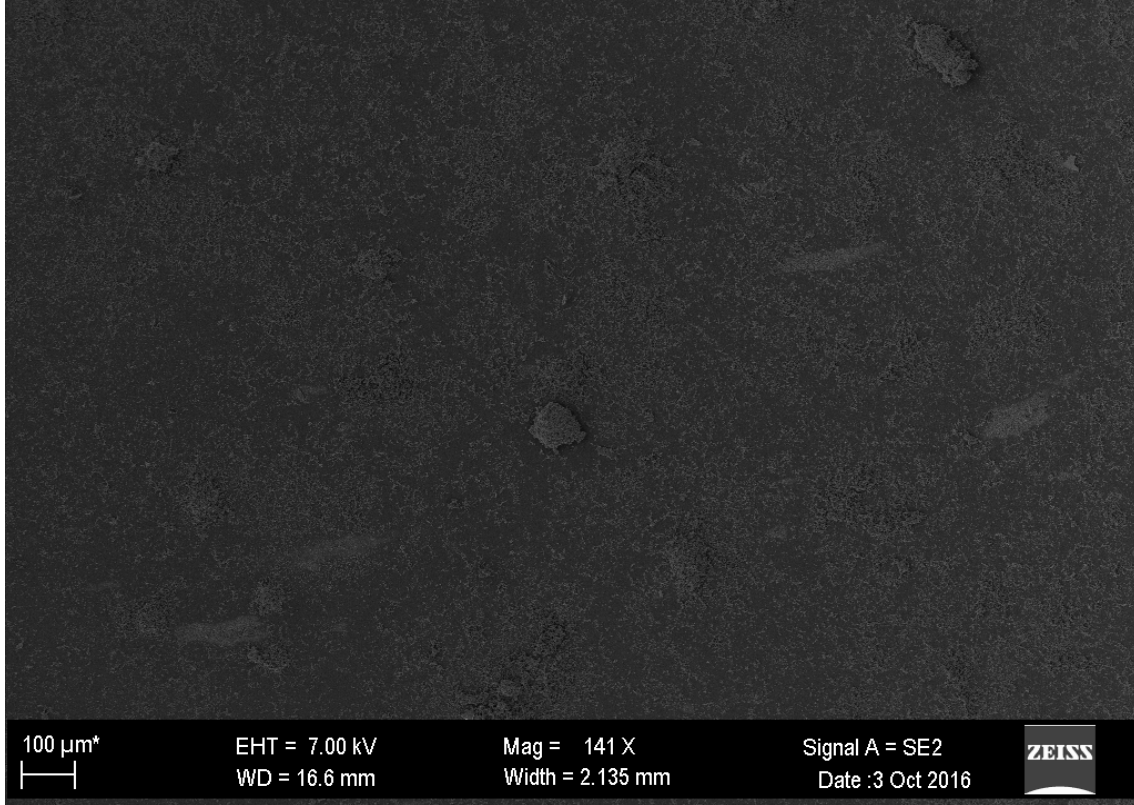




**Şekil 28.** Kontrol ETT SEM görüntüsü (3.61 KX)

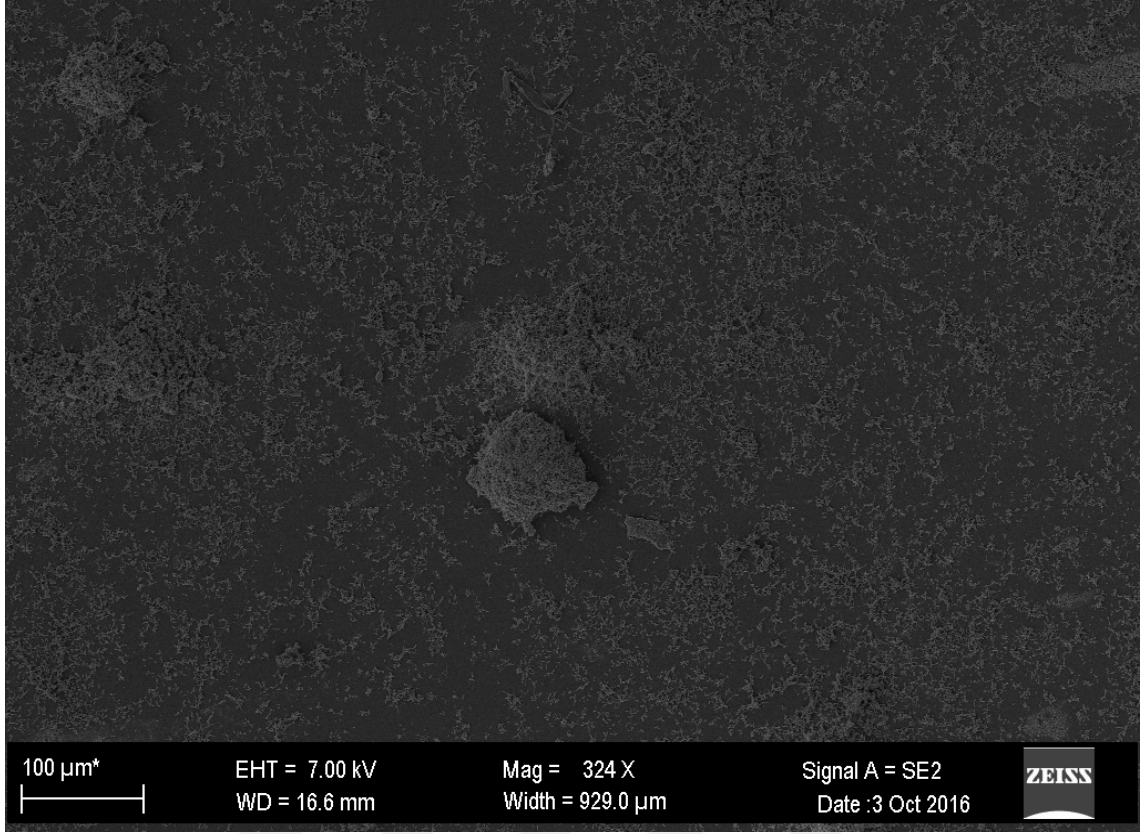


**Şekil 29.** Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (110X)

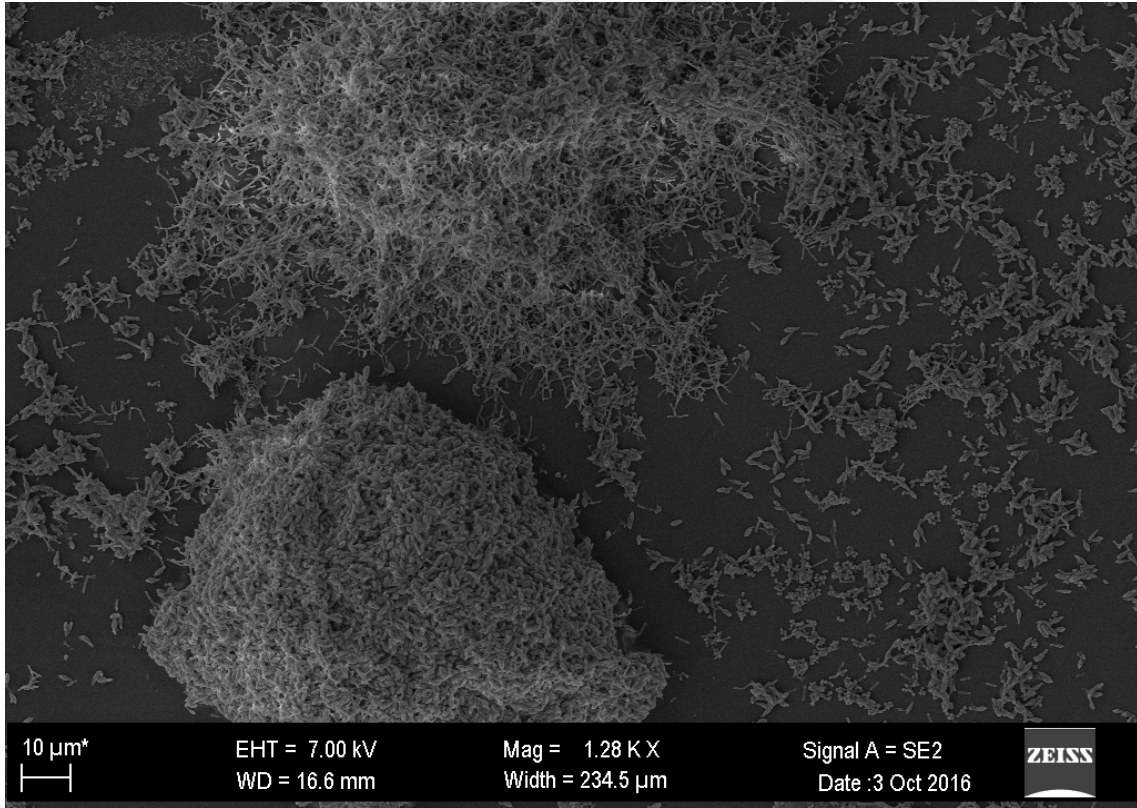


**Şekil 30.** Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (141X)

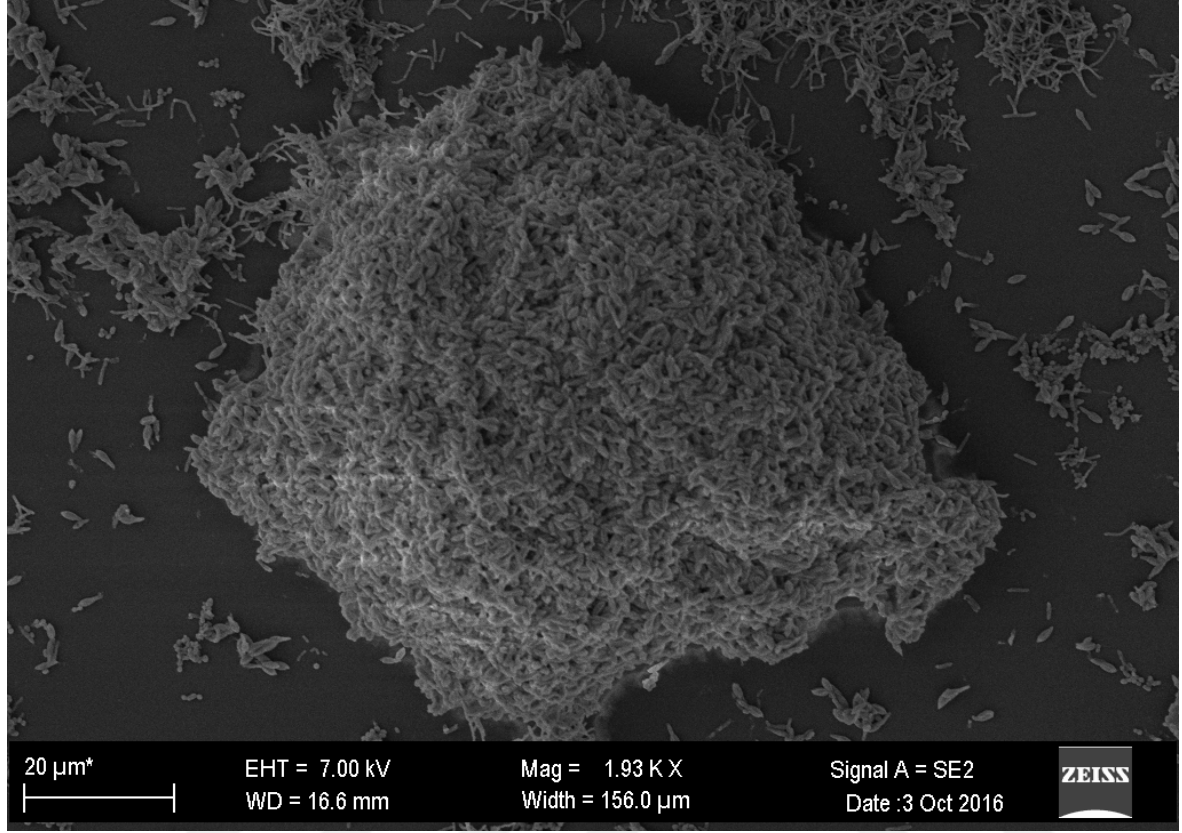




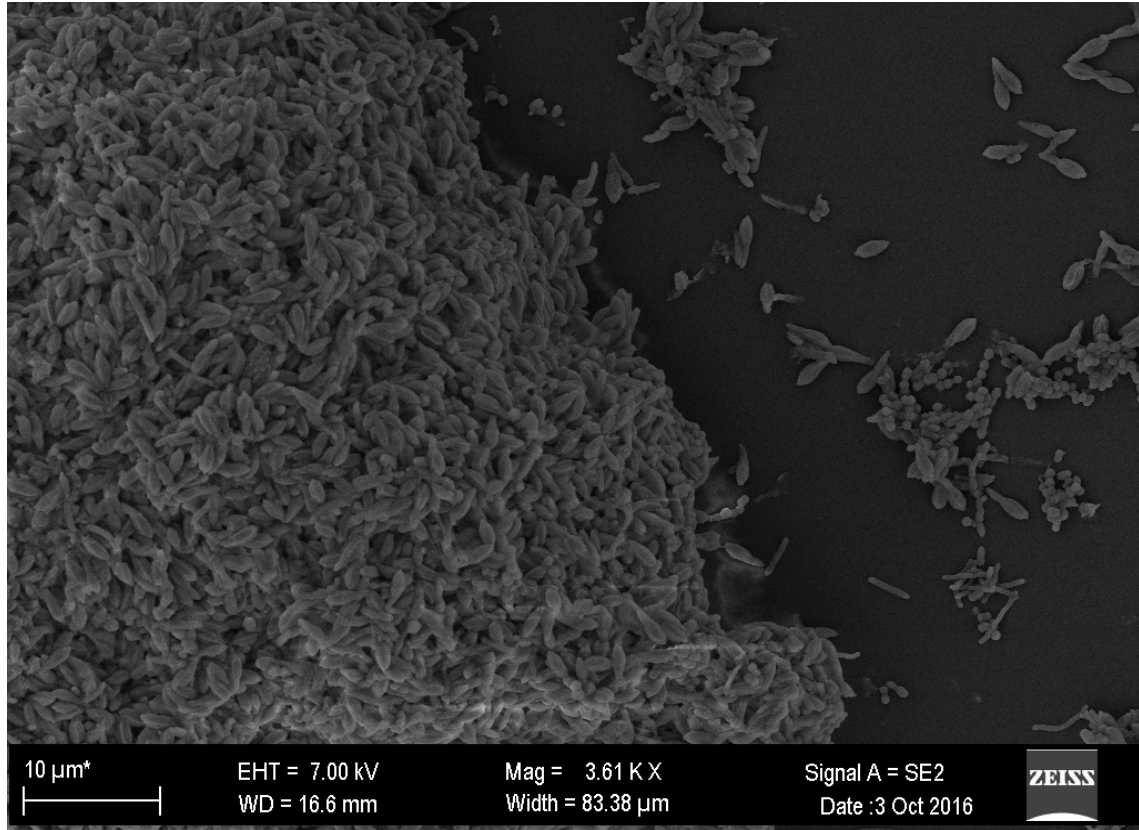
Şekil 31. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (324X)



Şekil 32. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (1.28 KX)



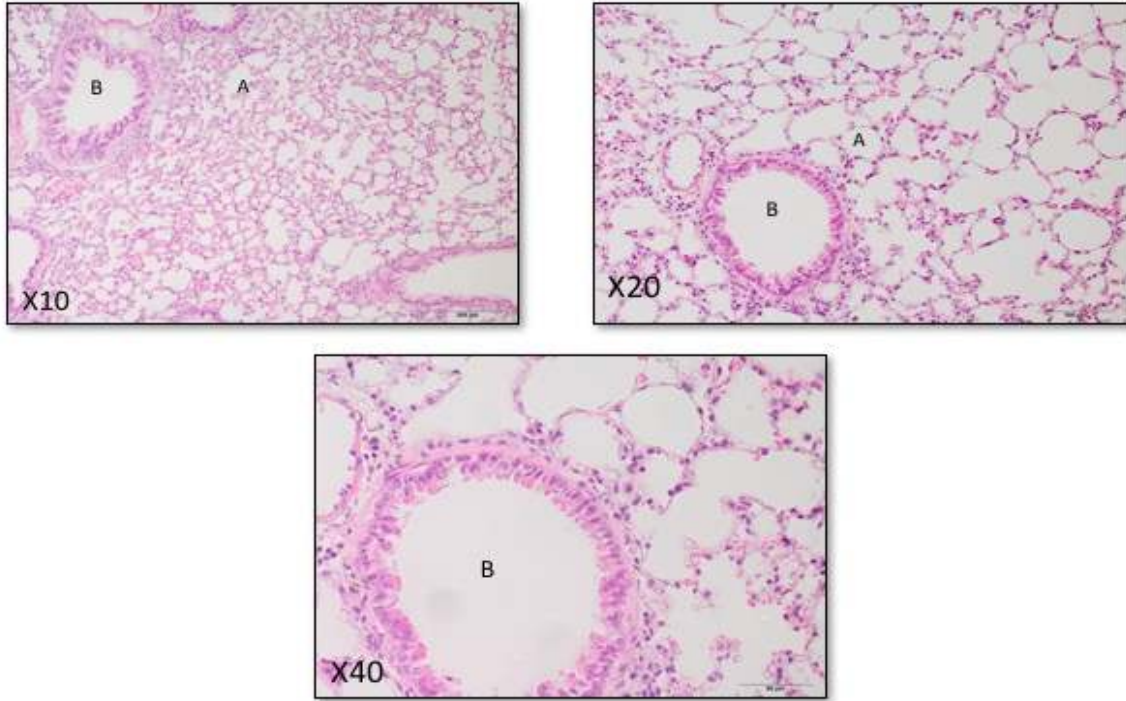
Şekil 33. Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (1.93 KX)



**Şekil 34.** Biyofilm pozitif ETT SEM görüntüsü (3.61KX)

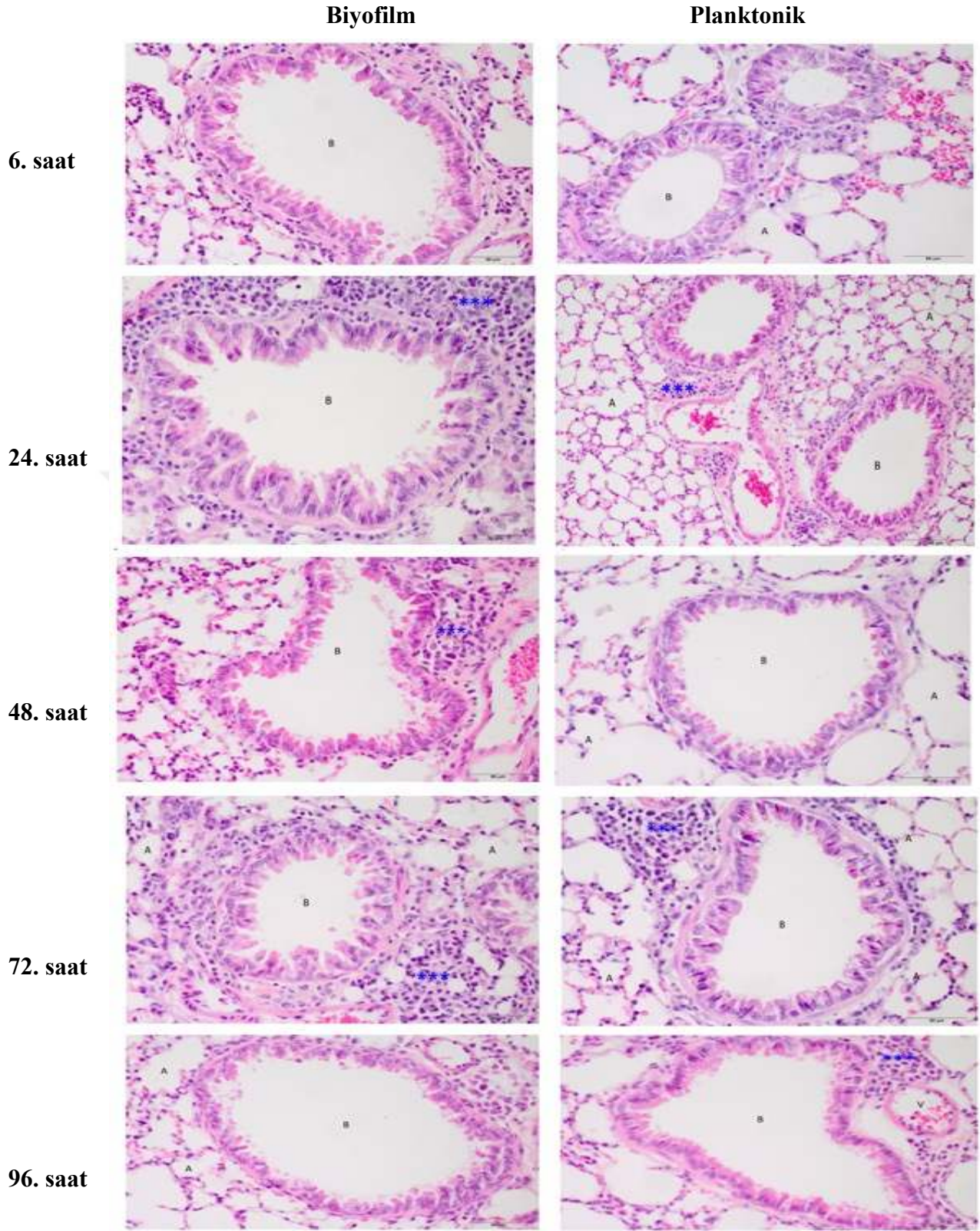
### **Akciğerde histopatolojik değerlendirme**

Farelerde oluşturduğumuz akut pnömoni modelinde enfeksiyonun bir başka göstergesi olarak akciğer dokusunda histopatolojik açıdan alveol ve bronşiollerde enflamatuar hasar değerlendirildi. Her iki grupta da akciğer doku kesitlerinde 6. saatte PMNL infiltrasyonu gözlemlendi. Akciğer hasarının ve PMNL infiltrasyonunun 24. saatten itibaren arttığı saptanmakla birlikte gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. (Şekil 35, 36)



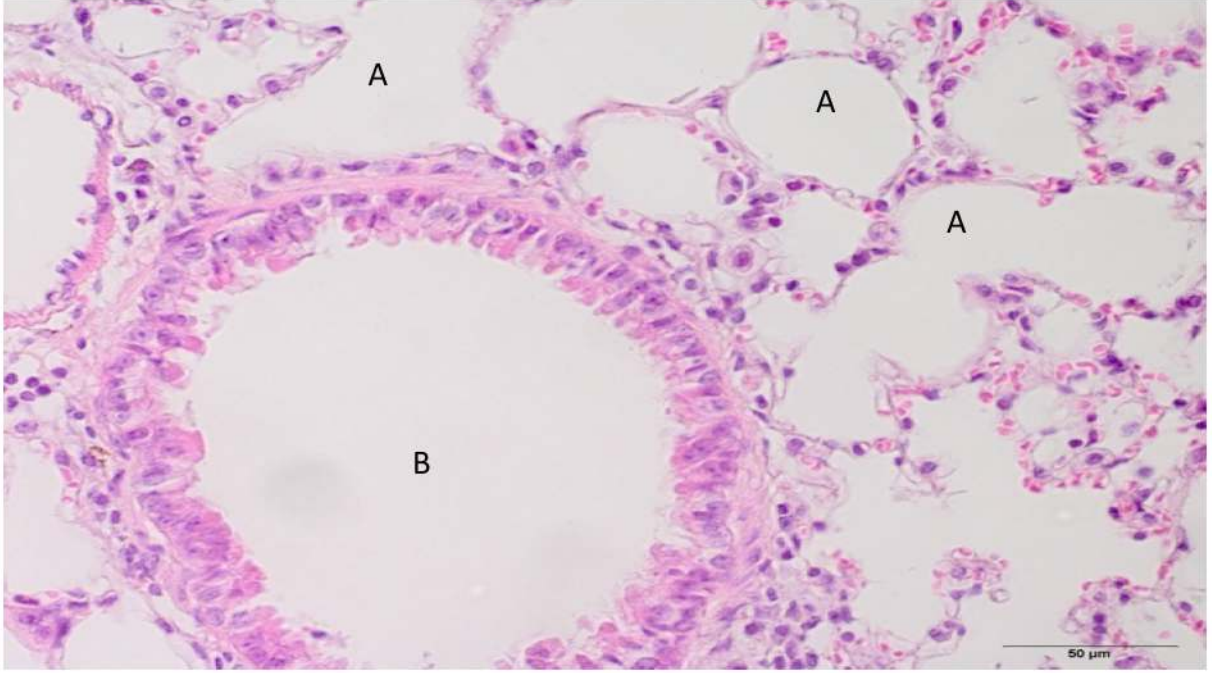
**Şekil 35.** PBS verilen gruba ait akciğer doku kesitlerinin HE boyama



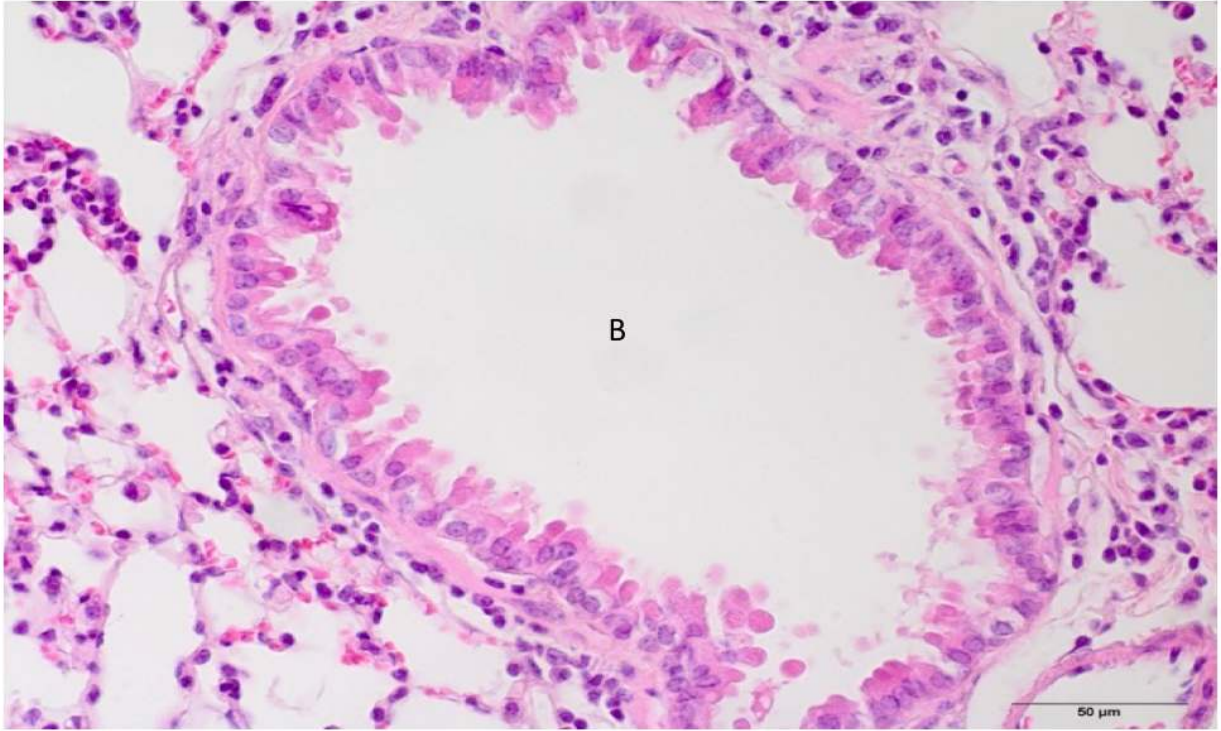


**Şekil 36.** Zamana bağlı akciğer doku kesitleri HE boyama

(A:Alveol B: Bronşiol V: Vasküler konjesyon \*\*\*: PMNL infiltrasyonu)

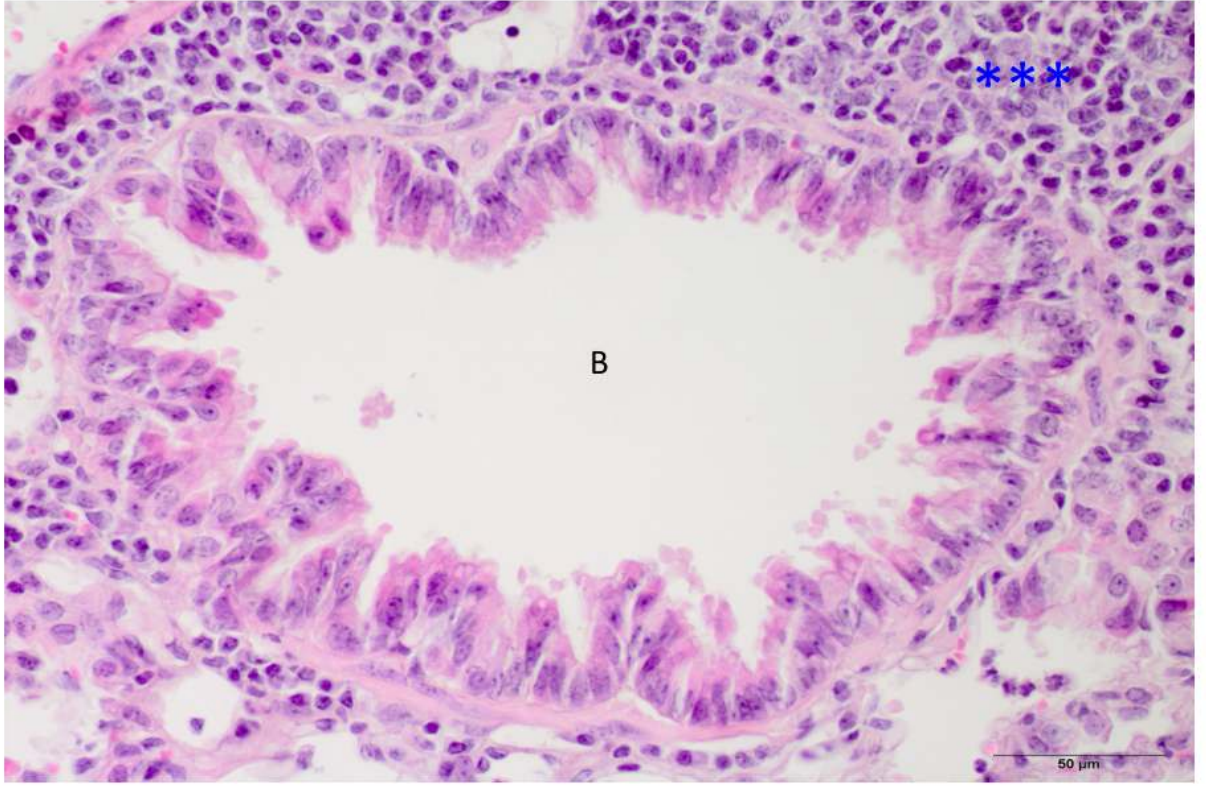


Şekil 37. PBS verilen gruba ait akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)

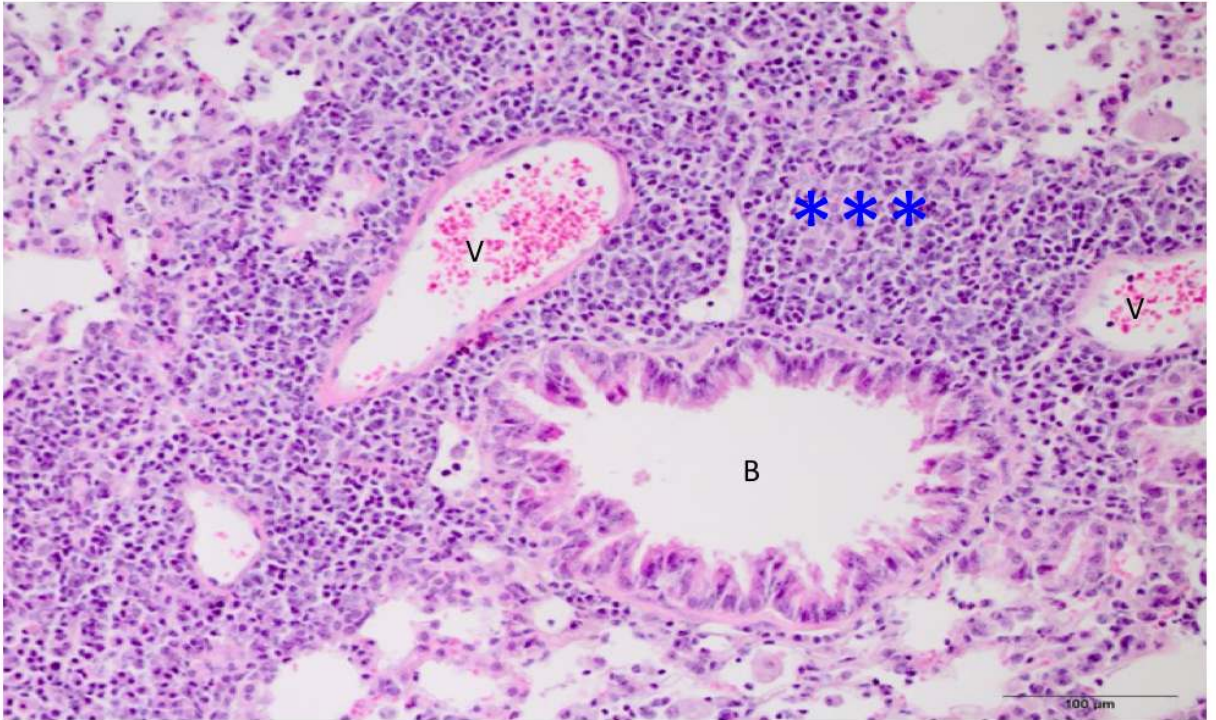


Şekil 38. Biyofilm grubu 6. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)



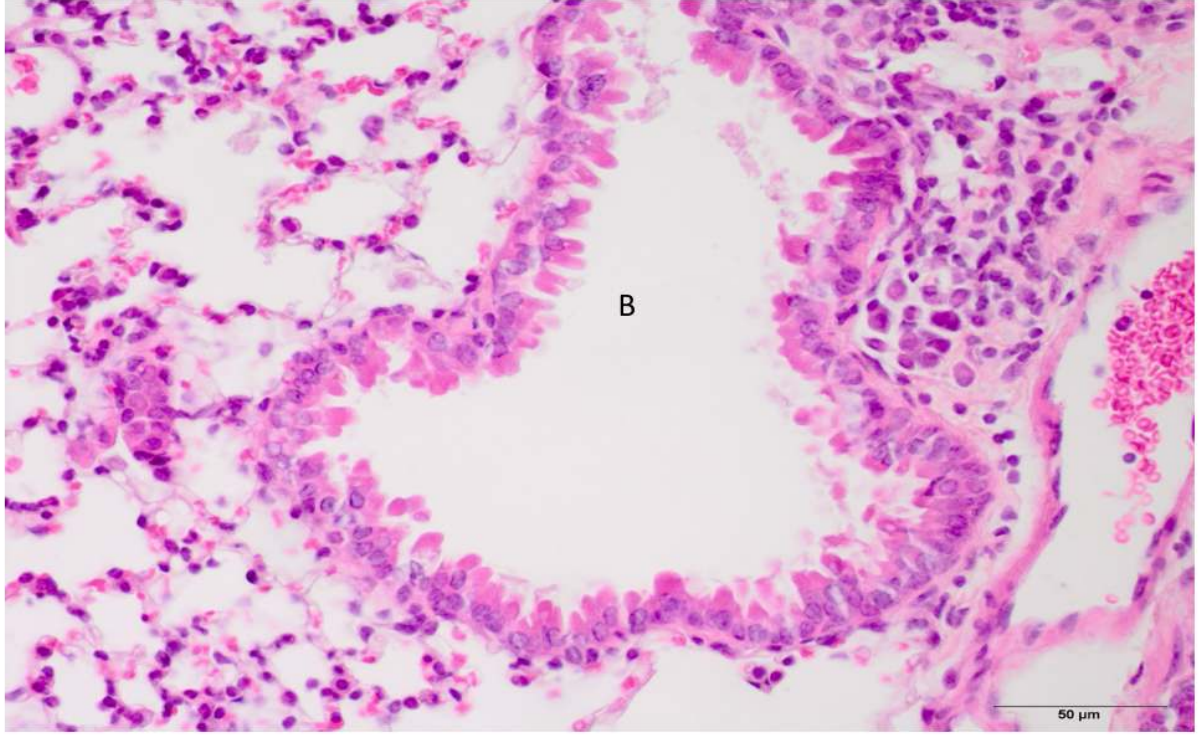


Şekil 39. Biyofilm grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)

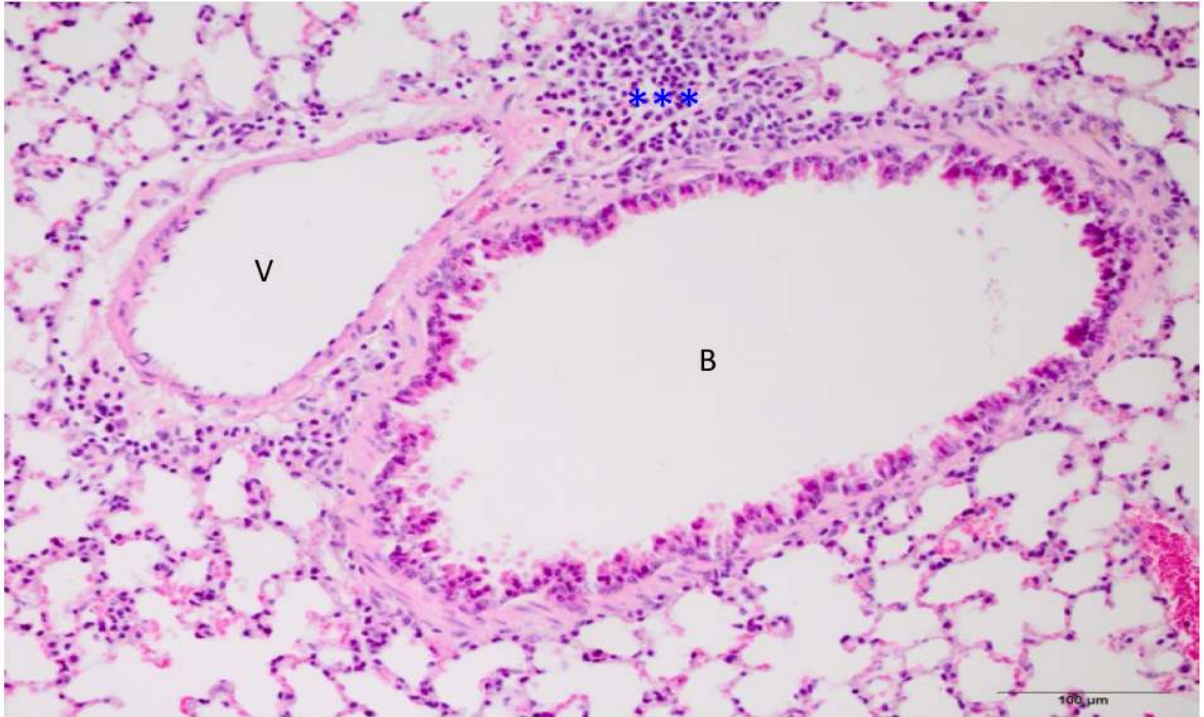


Şekil 40. Biyofilm grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)

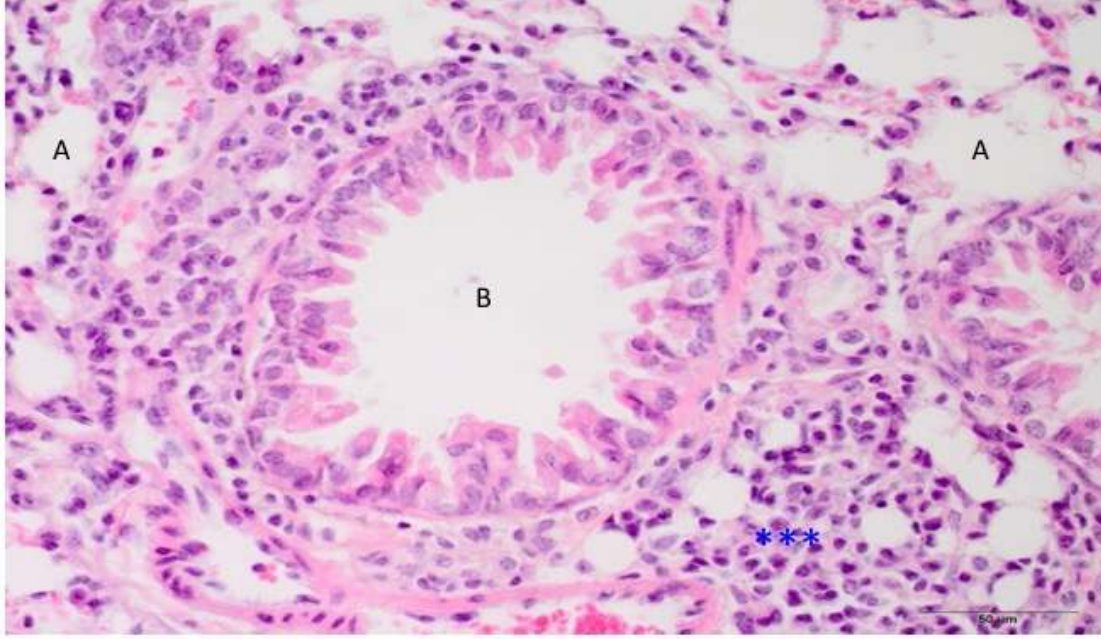




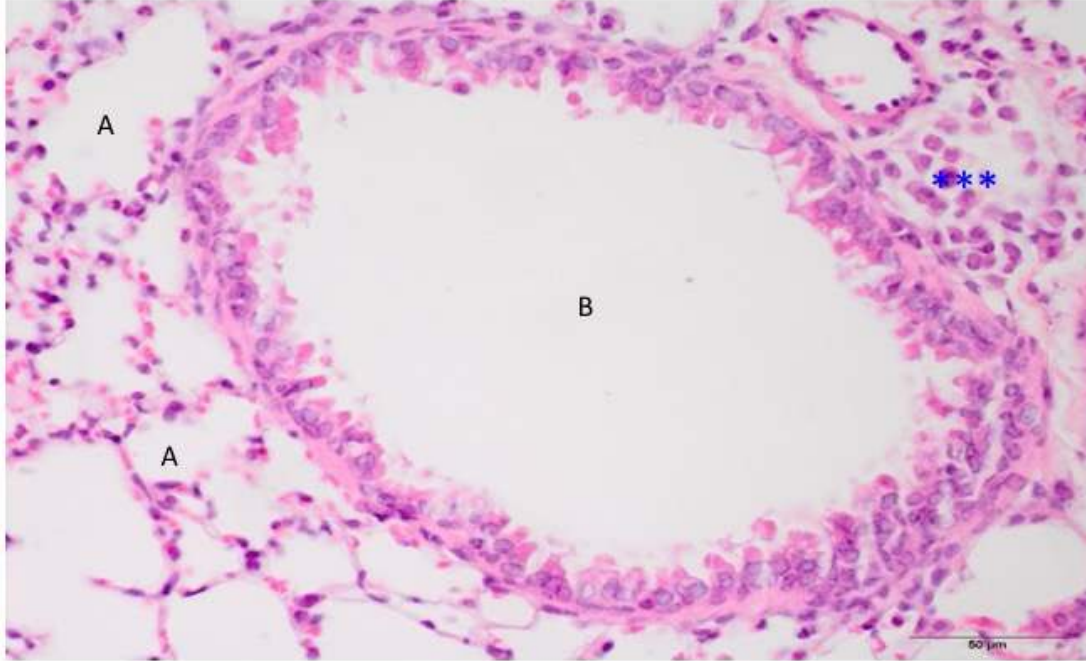
Şekil 41. Biyofilm grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)



**Şekil 42.** Biyofilm grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)

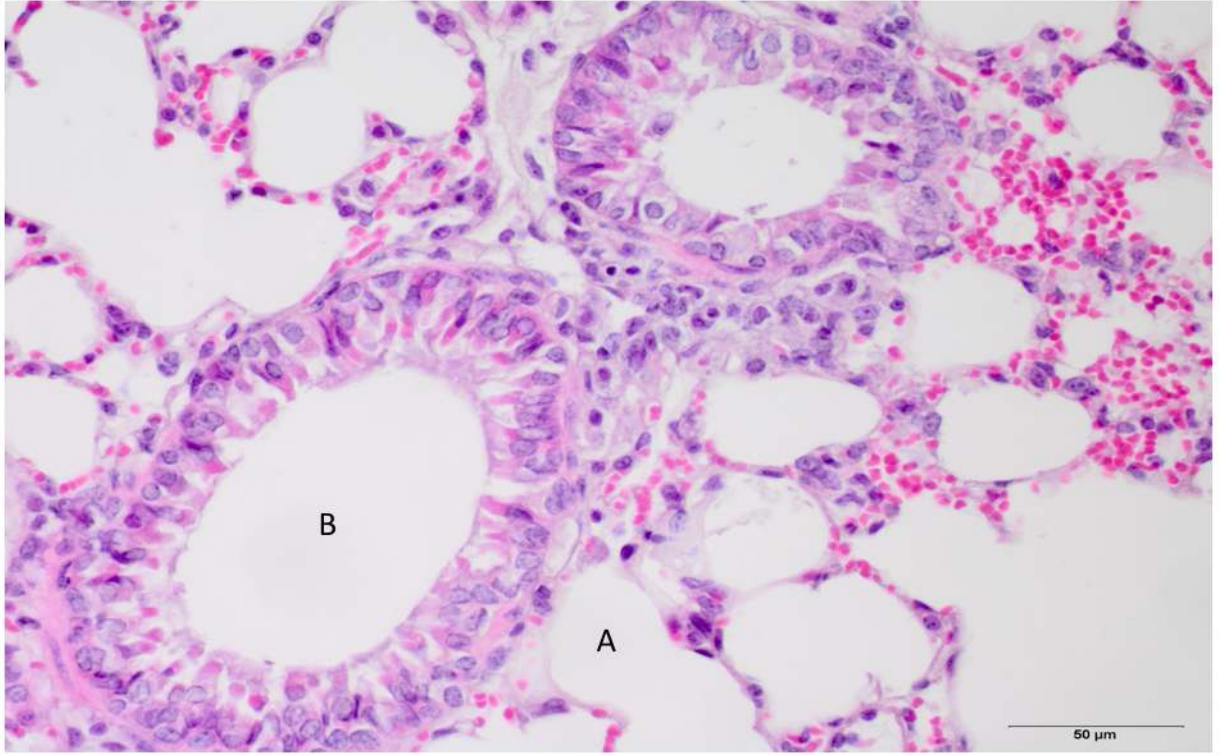


**Şekil 43.** Biyofilm grubu 72. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)

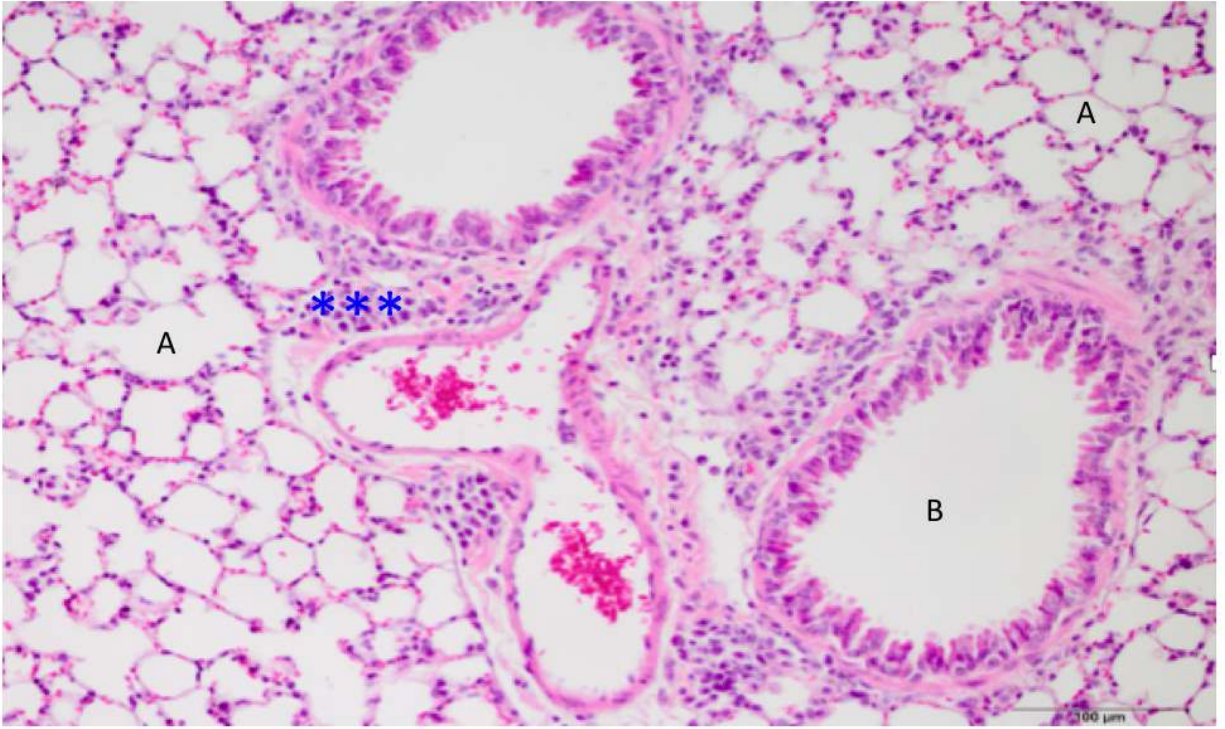


**Şekil 44.** Biyofilm grubu 96. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)

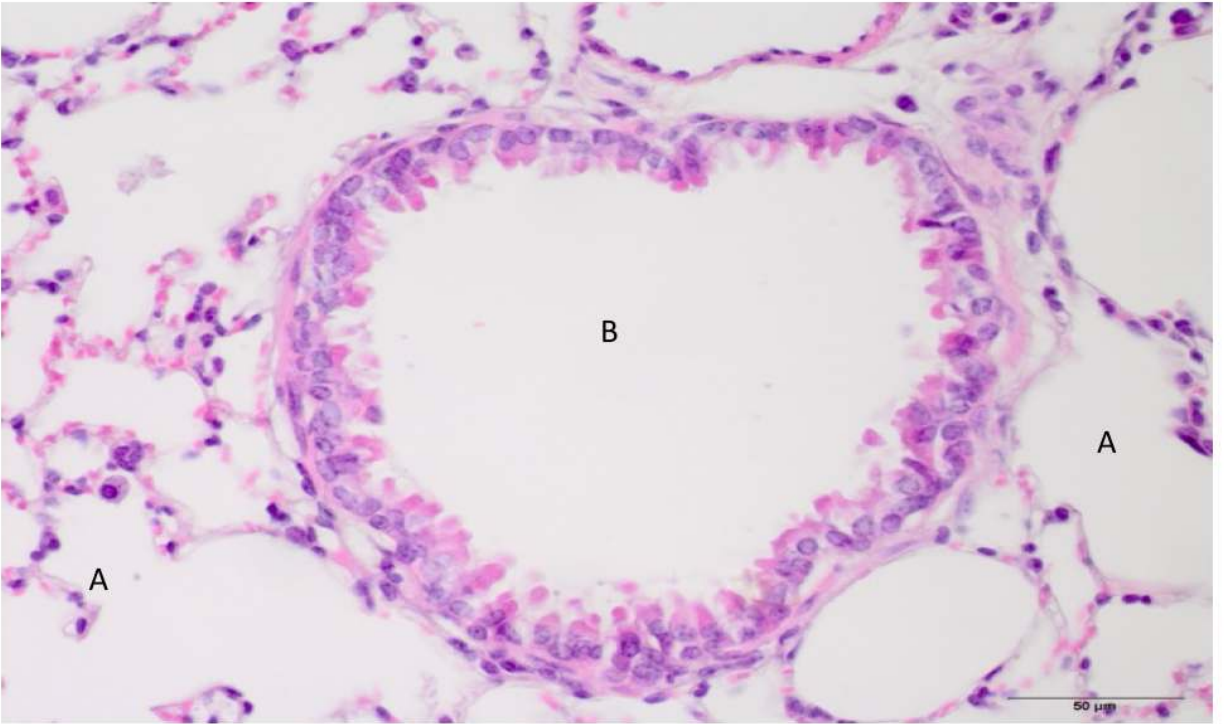




**Şekil 45.** Planktonik grubu 6. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)

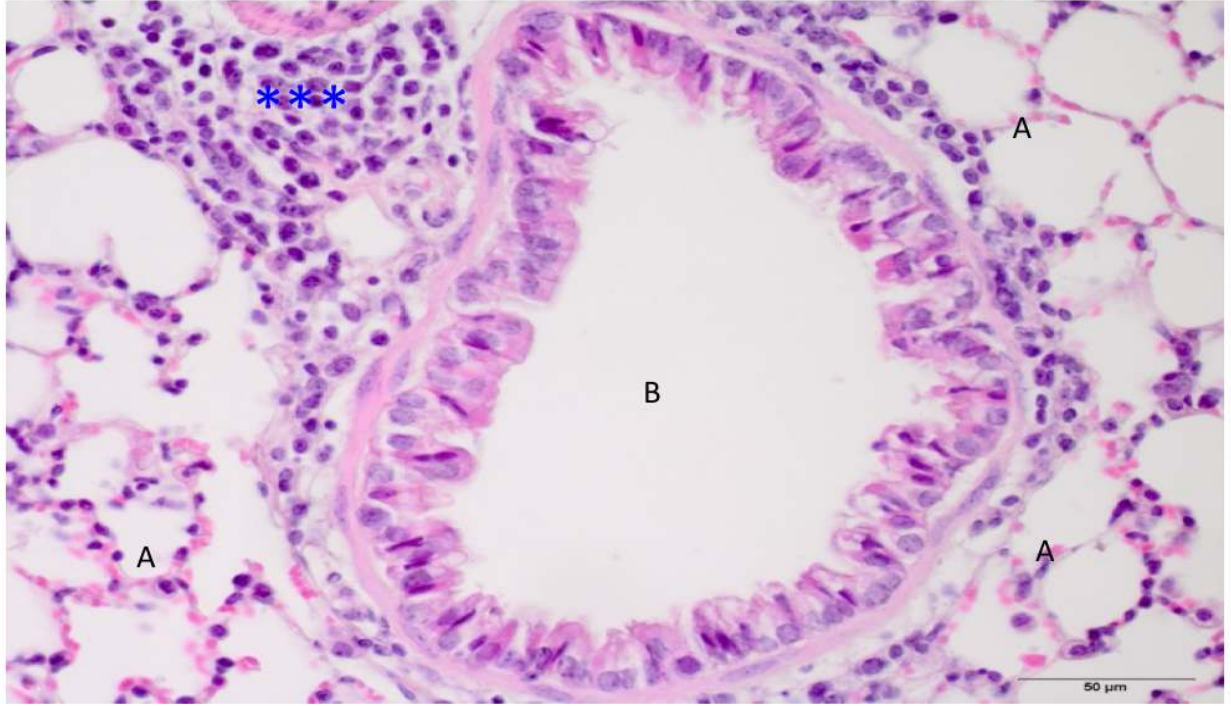


Şekil 46. Planktonik grubu 24. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X20)

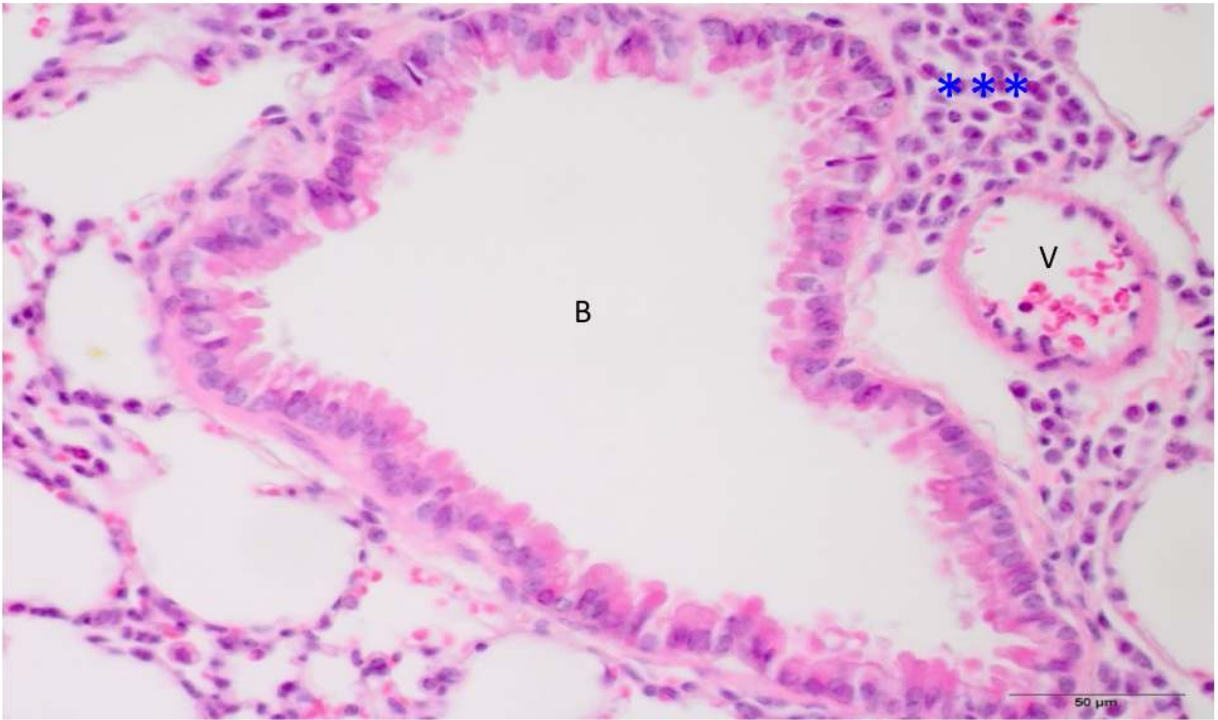


Şekil 47. Planktonik grubu 48. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)





Şekil 48. Planktonik grubu 72. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)



Şekil 49. Planktonik grubu 96. saat akciğer doku kesitleri HE boyama (X40)

## 5. TARTIŞMA

*K. pneumoniae*, hastane kökenli akciğer enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen, Gram negatif bir patojendir. Son yıllarda mevcut antibiyotiklere direnç oranlarındaki artış, tedavi seçeneklerinin azalması nedeniyle araştırmalar bakteriye özgü virülans faktörleri üzerinde yoğunlaşmıştır. *K. pneumoniae*'nin neden olduğu akciğer enfeksiyonunda gerek virülans faktörlerinin gerekse konak-patojen etkileşimlerinin açıklanabilmesi için hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu konuda çok sayıda araştırma bulunmaktadır. (87,88)

Bu ilk çalışmalarda bakterinin sadece planktonik hücre formu ile akciğer enfeksiyonunun oluşturulduğu görülmektedir. Son birkaç yıldır ise patogeneizde biyofilmin ve hücreler arası iletişimin öneminin anlaşılması ile birlikte (89,90) planktonik hücrelerin yanısıra biyofilm hücrelerinin etkilerinin de araştırıldığı sınırlı sayıda *in vivo* çalışma dikkati çekmektedir. (81,82)

Çalışmamızda, farelerde *K. pneumoniae* B5055 kökeni ile oluşturulan akut pnömoni modelinde planktonik ve biyofilm hücrelerinin immünolojik ve histopatolojik açıdan etkileri karşılaştırılmıştır. Biyofilm hücrelerinin elde edilmesinde abiyotik yüzey olarak literatürde kabul gören ETT yöntemi kullanılmıştır. (81,91)

ETT yüzeyinde bakteri kümeleri ve EPS tabakanın varlığı SEM aracılığı ile gösterilmiştir. (Şekil 21, 22) Çalışmamızı yukarıda belirtilen çalışmalardan ayıran en önemli farklılıklardan birisi, planktonik ve biyofilm hücre formlarının etkilerinin zamana bağlı olarak değerlendirilmesi ve bu değerlendirmenin biyofilm gelişiminin erken evrelerinde yapılmış olmasıdır.

Çalışmamızda literatüre katkıda bulunmak amacıyla 1-6-12-24 ve 48. saatlerde değerlendirmenin yapılması planlanmıştır. Ancak bölüm 3.9 da belirtilen kısıtlılıklar nedeniyle 6, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde izlem yapılabilmektedir. *İn vitro* çalışmalarda ilk 24 saat içinde biyofilm oluşumunun etkileri ile ilişkili veriler bulunmakla birlikte (35,36) ulaşabildiğimiz kadarıyla *in vivo* çalışmalarda ilk 24 saat içinde izlem yapan tek bir çalışma olup etken olarak *P. aeruginosa* kullanılmıştır. (37)

Çalışmamızda akut pnömoni modeli için intranazal uygulama kullanılmıştır. Benzer çalışmalarda da sıklıkla kullanılan bu yöntem, hayvanlara en az düzeyde stress, ağrı ve acıya neden olması, uygulamasının kolay olması, özel bir donanım gerektirmemesi ve ekonomik olması nedeniyle tercih edilmektedir. (76) *İn vivo* modellerde en önemli konulardan biri modelin oluşumuna ilişkin kanıtların ortaya konmasıdır. Modelleme sonrası enfeksiyon hastalığının göstergelerinden birisi ağrı ve acı nedeniyle hayvanın duruşunun, davranışlarının değişmesi, yememesi ve bunun sonucu olarak kilo kaybetmesidir.

Çalışmamızda enfeksiyon etkeni verilmeden önce ve sakrifikasyon öncesi fareler tartıldığında gruplarda anlamlı ağırlık değişiklikleri gözlenmemiştir. Kumar ve arkadaşları (92), tarafından yapılan bir çalışmada da *K. pneumoniae* B5055 kökeni ile BALB/c farelerde oluşturulan akut pnömoni modeli sonrasında hayvanların ağırlıklarında bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Bu sonucun olasılıkla intranazal modelleme nedeniyle refahlarının olumsuz etkilenmemesinden ve akut enfeksiyon modeli olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Enfeksiyon modeli açısından bir diğer gösterge KOCH kurallarında da belirtildiği gibi (93) enfeksiyon bölgesinden etkenin izole edilebilmesidir. Çalışmamızda BALB/c farelerde *K. pneumoniae* B5055 suşu ile oluşturduğumuz akut pnömoni modelinde hem planktonik hem de biyofilm hücre ile enfekte gruplarda zaman bağlı olarak akciğer dokusunda mikroorganizma üremesi ve bakteriyel yük değerlendirilmiştir. (Şekil 17, 18)

Her iki grupta da 24. saatte *K. pneumoniae* üremesinin en üst düzeye ulaştığı, biyofilm hücreleri ile enfekte grupta 96. saatte bakteri üremesi devam ederken planktonik hücrelerin verildiği grupta 24. saatten itibaren bakteriyel yükün azaldığı belirlenmiştir. 96. saatte iki grup arasında üreme açısından anlamlı farklılık saptanmıştır. Sharma ve arkadaşları da (81) aynı suş ve benzer yöntemi kullandıkları çalışmalarında biyofilm grubunda 14. güne kadar *K. pneumoniae* üremeye devam ederken planktonik grupta 7. günden sonra üremenin olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar 1, 2, 3, 5 ve 7 günlerde akciğer dokusundan yaptıkları bakteriyel yük değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptamadıklarını bildirmişlerdir. Görüldüğü gibi biyofilm oluşturan bakterilere karşı konakçının makrofaj fagositik aktivitesinin yetersizliği mikroorganizmanın ortamdan temizlenmesinde yetersiz kalmaktadır.

Yani bağışıklık sistemi hücreleri planktonik hücrelerin neden olduğu akciğer enfeksiyonuna karşı savunmada daha etkili olmaktadır. (94) Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların kronik ve tekrarlayıcı seyretmesi bu verilerle açıklanabilir. Vücudumuzda savunma sisteminin ilk basamağı doğal bağışıklık sisteminin bileşenleridir. Bu bileşenler arasında epitel dokusu, salgısal ve muköz membranlar, intraepitelial lenfositler, doğal antimikrobiyal peptidler ve fagositik hücreler büyük önem taşımaktadır.

Solunum yolu enfeksiyonları, patojen mikroorganizmaların solunum epiteli yüzeyine çeşitli yollarla ulaşmalarının ardından kolonizasyonu ve invazyonu sonrası gelişen klinik bir tablodur. Bu süreçte bakteri vücuda girdiği andan itibaren doğal bağışıklık sisteminin bileşenleri uyarılır. Solunum yolu epitel hücreleri kendilerini sürekli olarak yeniler ve bu sırada fiziksel mekanik bir bariyer oluşturma yanısıra filtrasyon, epitel yüzeyindeki tükürük, mukus, mukosilier aktivite, öksürük refleksi gibi özellikleri ile savunmaya geçer.

Bu savunma sisteminde akciğerin anatomik yapısı ve bronş açılanmalarının farklılığının yanısıra kalıcı florada önemli rol oynar. Pulmoner doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin uyarılması yoluyla TNF-alfa, IL- $\alpha$ , IL-10 ve IL-6 gibi çeşitli enflamatuvar mediatörlerde devreye girer. Burada alveolar makrofajlar oldukça etkin görev görür (95-97). Bu mekanizmalar, pnömoni sırasında gözlenen akciğer hasarı sırasında konakçı immün yanıtının, konakçıyı korumak için nasıl düzenleyici bir şekilde hareket ettiğini göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda olduğu gibi birçok pnömoni epizodunun kendiliğinden sınırlayıcı olduğu ve kendi başlarına çözüme ulaştığı bildirilmektedir. (98).

Çalışmamızda proenflamatuvar sitokin yanıtları açısından BAL örneklerinde IL-10 ve TNF alfa ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. IL-10 ve TNF alfa bakteriyel yükü paralel olarak her iki grupta da 24. saatte en üst düzeye ulaşırken, daha sonra dramatik olarak düşüş göstermiştir. 24. saat verilerinde TNF alfa açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanırken ( $p<0.003$ ), IL-10 açısından fark anlamlı bulunmamıştır. ( $p<0.485$ ) Yoshida ve arkadaşları (99) farelere, kapsül (+) ve kapsül (-) *K. pneumoniae* kökenlerini intranazal yolla vererek oluşturdukları akut pnömoni modelinde değerlendirme kriterleri olarak hayatta kalma ve sitokin düzeylerine bakmışlar. Araştırmacılar, çalışmada kapsül (+) DT-S kökenleri ile enfekte farelerde ilk 72 saat içinde mortalite oranlarını %100 saptarken, kapsül (-) DT-X kökenleri enfekte grupta ölüm gözlemediklerini, kapsül (+) DT-S kökenleri ile

enfekte grupta IL-10'un 6. ve 24. saatlerde artma, 12. ve 48. saatlerde azalma şeklinde dalgalanmalar gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki gibi *K. pneumoniae* B5055 kökeninin  $10^4$  CFU/ ml yoğunlukta verildiği bir başka akut pnömoni modelinde ise bakteriyel yüke paralel olarak 3. günde TNF alfa düzeylerinde artış gözlenirken IL-10 düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlar hem planktonik hem de biyofilm hücreleri ile enfekte farelerde benzer bulunmuştur. (81)

Farelerde oluşturduğumuz akut pnömoni modelinde enfeksiyonun bir başka göstergesi olarak akciğer dokusunda histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın en önemli eksikliklerinden biri akciğer dokusunda, alveol ve bronşiollerde ödem ve enflamatuvar hasar değerlendirilmiş olmakla birlikte kantitatif ya da yarı kantitatif bir hasar skorlamasının yapılmamış olmasıdır. Çalışmamızda her iki grupta da 6.saatte PMNL infiltrasyonu gözlenmiştir. Akciğer hasarının ve PMNL infiltrasyonunun 24.saatten itibaren arttığı saptanmış olmakla birlikte gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Şekil

36) Sharma ve arkadaşları da (81) çalışmalarında planktonik ve biyofilm hücreleri ile enfekte gruplar arasında akciğer hasar skoru açısından bir farklılık saptamadıklarını belirtmişlerdir. Planktonik grupta 7. gün, biyofilm grubunda 10. günde doku düzeyinde iyileşmenin gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 4. günde akciğer hasarının azalmakla birlikte devam ediyor olması benzer bir bulgudur.

Bir başka çalışmada ise *K. pneumoniae* B5055 kökeni planktonik hücreleri  $10^2$  CFU/ml yoğunlukta intranazal yol ile vererek sepsis,  $10^4$  CFU/ml yoğunlukta intranazal yol ile vererek akut pnömoni modeli oluşturulmuştur. İlk 5 gün içinde sepsis modelinde %100 ölüm gözlenirken akut pnömoni modelinde ölüm olmadığı belirtilmiştir. TNF alfa düzeylerine bakıldığında sepsis modelinde 1. günden itibaren 5. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış gösterdiği, akut pnömoni modelinde ise ilk üç günde artış gösterdiği daha sonra dramatik biçimde düştüğü ifade edilmiştir. (92)

Biyofilm yapının virülansta oldukça önemli bir faktör olduğu düşünülürse biyofilmin indüklediği akciğer enfeksiyonu modelinde akciğer hasarının ve mortalitenin fazla olması beklenebilirdi. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki *K. pneumoniae* kapsüler serotip 2 insan solunum yolları enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla görülmektedir. (100, 101)

Bununla birlikte K2 serotipe sahip her izolatin insan ve farede benzer şiddette klinik tabloya neden olmadığı da belirtilmiştir. Örneğin farelerde intranazal inokulasyon ile oluşturulan akciğer enfeksiyonu modelinde *K. pneumoniae* 43816 kökeni  $10^3$  CFU/ml yoğunlukta %100 ölüme neden olurken yine K2 serotip i220-94 ve i222-94 kökenleri  $10^8$  CFU/ml yoğunlukta bile ölüme neden olmamaktadır. (100) Gerek Sharma ve arkadaşlarının (81) gerekse bizim çalışmamızda enfeksiyon etkeni olarak kullanılan *K. pneumoniae* B5055 kökeninin kapsüler serotip 2 olmakla birlikte ciddi akciğer hasarına ve ölüme neden olmaması bu bilgiler ışığında açıklanabilir.

Bilindiği gibi enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve hastalık patogenezinin anlaşılmasında etkenin, etkene özgü virülans faktörlerinin, antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesi önemlidir. Bu noktada mikrobiyoloji alanında *in vitro* testler kullanılmaktadır. Bu analizlerle saptanan virülans faktörleri ya da herhangi bir ajana karşı



direnç *in vivo* modellerle, sıklıkla da fare, sıçan kullanılarak test edilmektedir. Ancak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arasında her zaman paralellik görülmediği de bir gerçektir.

Yani mikroorganizmanın cansız ortamlardaki davranışının canlı konakçı da yansımaları olmadığı gibi tam tersi de gözlenebilmektedir. Örneğin, *K. pneumoniae*' ye özgü biyofilm fenotiplerinin ve farelerde virülansının değerlendirildiği bir çalışmada mikropalak yöntemi ile *in vitro* olarak biyofilm saptanmayan bazı kökenlerin farelerde intranazal inokulasyon ile oluşturulan akciğer enfeksiyonu modelinde biyofilm üretebildikleri gösterilmiştir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda biyofilm üretmeyen *K. pneumoniae* MHV1 kökeninin  $10^3$ ,  $10^5$  ve  $10^7$  CFU/ml yoğunluklarda herhangi bir etkisi gözlenmezken daha yüksek yoğunluklarda ölümlere neden olduğu belirtilmiştir. (100).

Bu nedenle hayvan modellerinin her zaman insandaki hastalık sürecini tam olarak yansıtamayacağı, *in vitro* çalışmaların ve hayvan modellerinin kanıt piramidinin alt sıralarında yer aldığı unutulmamalıdır. Elbette bu durum bilimsel değerlerinin daha az olduğu anlamına gelmemektedir. Aksine faz öncesi çalışmalar için yapılması gereken, son derece önemli verilerin elde edildiği bir basamaktır. (101)

Özellikle biyofilm yapının etkilerinin, kronik akciğer enfeksiyonu modelinde araştırılmak istendiği çalışmalarda mikroorganizmanın biyofilm formunun intranazal yolla verilmesi konak savunma sisteminin doğrudan uyarılmasına, bunun sonucu olarak bakterinin temizlenmesi ile enfeksiyon modelinin oluşmamasına neden olmaktadır. Bu tür çalışmalarda sıklıkla biyofilm hücrelerin in intratrakeal yolla verilmesi ya da agar boncuk modeli kullanılmaktadır. Biyofilm üretme özelliğine sahip bakterinin agar içine gömülmesi ve bu agarın hayvanın trakeasına yerleştirilmesiyle oluşturulan agar boncuk modeli (102,103) oldukça kabul görmüş bir yöntemdir. Bu modelde agar, biyofilm yapıdaki EPS tabakayı taklit ederek bakteriyi içine hapsetmekte ve ilk aşamada konağın savunma sistemi hücrelerinden uzak tutarak bakterinin hava yollarında varlığını sürdürmesine ve kronik akciğer enfeksiyonunu başlatmasına zemin hazırlamaktadır. (47,104)

Görüldüğü gibi modellemede kullanılacak yöntem için mikroorganizmanın virülans faktörlerinin, konakçı savunma sisteminin gözönünde bulundurularak hipoteze uygun bir yöntem seçimi yapılması büyük önem taşımaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyofilm varlığında bakterinin kolonizasyonu ve vücutta kalıcılığının kolaylaştığı bilinmektedir. İlerleyen teknolojinin sağlık alanına yansımaları ile birlikte invazif girişim ve kalıcı katater uygulaması yapılan hasta sayısında artış kaçınılmazdır. Biyofilm matriks içindeki mikroorganizmaların kendilerini çevresel etkenlerden, dezenfektanlardan ve antimikrobiyal ajanların etkilerinden koruyabilme yeteneği gözönünde bulundurulduğunda şu anda uygulanan stratejilerle bu enfeksiyonlarla başedebilmemiz çok mümkün görünmemektedir. Dolayısıyla biyofilme karşı stratejilerin geliştirilmesi, biyofilm matriksin hedef alınması ve bu yöntemlerin antimikrobiyal sağaltımla kombinasyonu daha uygun bir yaklaşım olabilir. Bunun için biyofilm oluşum süreci içinde bakterinin konakçıdaki davranışlarının ve gerek immünolojik gerekse doku düzeyinde konak patojen etkileşimlerinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Ancak konakçıda gözlenen değişiklikleri değerlendirirken tek başına biyofilm yapı üzerinden yorum yapmamak gerekir. Biyofilm yapının patojene nasıl ve hangi ölçüde yarar sağladığı yönünde bilimsel veriler bulunmakla birlikte farklı kökenlerle farklı sonuçlar alınabileceği unutulmamalıdır. Bu karmaşık sürecin açıklanabilmesi için konuya ilginin azalmaması, altta yatan mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir. Hayvan deneyleri bu araştırmaların vazgeçilmez öğelerindendir. Deneylerin planlanması aşamasında temel hareket noktamız insandaki hastalık sürecinin taklit edilmesidir.

Bu çalışmada akut pnömoni modeli için kullanılan intranazal inokulasyon yöntemi insanda hastalığın gelişim süreci ve doğal savunma sisteminin uyarılması parametreleri açısından benzemektedir. Ancak inokulasyon sonrası akciğerin farklı loblarında bakteriyel yükün yeterli düzeye ulaşp ulaşmadığı konusunda endişe taşımaktayız. Farelerde akciğerin anatomik yapısının ve bronş dallanmalarının farklı oluşu, verilen mikroorganizmanın özellikle üst solunum yollarından başlayarak giderek azalan ve değişen konsantrasyonlarda bronşlara ulaştığını düşündürmektedir. Ayrıca unutulmamalıdır ki özellikle solunum yolu enfeksiyonları insanda bakteri-bakteri ya da bakteri-virüs birlikteliği ile polimikrobiyal seyretmektedir.

Bu çalışma mevcut modeller içinde sıklıkla kullanılan ve önerilen intranazal inokulasyon yöntemini kullanarak önemli bir virölans faktörü olan biyofilm yapının gelişim süreci içinde farede neden olduğu akut akciğer enfeksiyonunun patogenezi zamana bağlı olarak değerlendirilmesi anlayabilmek , literatüre katkıda bulunabilmek adına planlanmıştır. Biyofilm hücreleri ile eş zamanlı olarak planktonik hücrelere karşı konakçının verdiği yanıtların değerlendirilmesi nedeniyle bu alanda yapılan az sayıda çalışmalar arasında yer alacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Elmer W. Koneman W. Procop S Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed lippincott Williams and wilkins (1994); 6; 171-241
2. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone (2000); 220 : 2392-2504.
3. Colodner R, Rock W, Chazan BR, et al. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23(3): 163-7.
4. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. The New England journal of medicine. (2010); 362(19):1804-1813.
5. Austrian R: The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. Bacteriological reviews (1960) ;24(3):261-265.
6. [http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella\\_pneumoniae\\_gram\\_stain.html](http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella_pneumoniae_gram_stain.html)

7. <http://www.microbiologyinpictures.com/klebsiella%20pneumoniae.html>
8. <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab3/embklebsiella.html>
9. Ko, W.C., et al., Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis*, (2002); 8(2): 160-6.
10. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* (1998); 11(4):589-603.)
11. Bellissimo-Rodrigues F, Gomes AC, Passos AD, Achcar JA, Perdoná Gda S, Martinez R. Clinical outcome and risk factors related to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. infection among hospitalized patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2006) ;101(4):415-21.
12. Piroth L, Aube H, Doise JM, Vincent-Martin M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*: Are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value *Clin Infect Dis* (1998); 27(1):76-80.
13. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended spectrum  $\beta$  lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: A review of the literature. *Journal of Perinatology*. (2003); 23: 439-443
14. Gaynes R, Edwards HR. Overview of nosocomial infections caused by Gram- negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases*. (2005); 41: 848-854
15. Richards, M.J., et al., Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med*, (1999); 27(5): 887-92.
16. Huang Y, Zhuang S, Du M. Risk factors of nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a neonatal intensive care unit in China. *Infection*. (2007); 35(5):339-45.
17. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, , fifth edition, volume 2(2000); 2294- 2310
18. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*. (2010) ;10: 179 -189.
19. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. (2014); 9(9):1071-81.
20. Shankar-Sinha, S., et al., *The Klebsiella pneumoniae* O Antigen Contributes to Bacteremia and Lethality during Murine Pneumonia. *Infect Immun*, (2004); 72(3):

1423-1430.

21. Maayan, M.C., et al., Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect Immun*, (1985); 49(3): 785-9
22. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. (1998); 30: 285-293
23. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol*. (2012);7(8):991-1002
24. Kraemer. S.M Iron oxide dissolution and solubility in presence of siderophores. *Aquat. Sci* (2004); 66: 3–18
25. leewenhoeck A. An abstract of a letter from Mr. Anthony Leewenhoeck at Delft, dated Sep. 17. 1683 Containing some microscopical observations, about animals in the scurf of the teeth, the substance call'd worms in the nose, the cuticula consisting of scales. *Phil. Trans*. 14 568–574
26. Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng. How bacteria stick. *Sci. Am*. (1978); 238:86–95.
27. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol* (1995); 49:711–745.
28. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* (2002); 15 (2): 167-93.
29. Langstraat, J. Bohse, M. Clegg, S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect. Immun*. (2001); 69,5805–5812.
30. Liaqat, I.; Sumbal, F.; Sabri, A.N. Tetracycline and chloramphenicol efficiency against selected biofilm forming bacteria. *Curr. Microbiol*. (2009); 59, 212–220
31. Costerton, J, Stewart, P, ve Greenberg, E. “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections”, *Science*, (1999); 284(5418), 1318–1322

32. Stewart P. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* (2003); 185 (5): 1485-1491
33. Romanova I, Gintsburg A. Bacterial Biofilms as a Natural form of existence of bacteria in environment and host organism. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* (2011); 3: 99–109
34. From "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms" monroe Plos bBology vol. 5, No. 11, Doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050307 VIA WIKIMEDIA COMMONS.
35. Cyril G, Nicolas C, Nicolas P Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells *BMC Genomics* (2016); 17:237
36. Laura L. Bowler, T. Blake B , Laura L.A novel *in vitro* co-culture system allows the concurrent analysis of mature biofilm and planktonic bacteria with human lung epithelia *Saward Journal of Microbiological Methods* (2014); 49–55
37. Mittal R, Chhibber S, Sharma S, Harjai K. Macrophage inflammatory protein-2, neutrophil recruitment and bacterial persistence in an experimental mouse model of urinary tract infection. *Microbes Infect.* (2004); 6(14):1326-32.
38. Balestrino, D.; Ghigo, J.M.; Charbonnel, N. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ. Microbiol.* (2008), 10, 685–701.
39. Hoiby, N., Johansen, H.K., Moser, Z., Ciofu, O. “*Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth”, *Microbes and Infection*, (2001); 3, 23-35
40. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. ve Ciofu, O. “Antibiotic resistance of bacterial biofilms”, *Int J Antimicrob Agents*, (2010); 35(4),322–332
41. Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert Opin Ther Targets.* (2002); 6(3):257–74.
42. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, (1992); 36, 1347–51.
43. Wolcott, R.D, Rumbaugh, K.P., James, G., Schultz, G., “Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window”. *J Wound Care*, (2010); 19, 320–32
44. Bagge N, Schuster M, Hentzer M et al: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production, *Antimicrob Agents Chemother* (2004); 48(4):1175-87.

45. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature* (2005); 436(7054):1171-5.
46. Karaman M, Fırıncı F, Arıkan Ayyıldız Z, Bahar İH. [Effects of Imipenem, Tobramycin and Curcumin on Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Strains]. *Mikrobiyol Bul.* (2013); 47(1):192-4.
47. Karaman M, Yılmaz O, Bayrakal V, Bahar İH. Gentamisin ve imipenem etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing yanıtları ve biyofilm üretimi: in-vivo modelleme. *ANKEM Derg* (2010); 24(2):76-81
48. Fengjun Sun , Feng Q , Yan L , Panyong M. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies”, *Future Microbiol*, (2013); 8(7), 877-886
49. Claudia Vuotto, Francesca L, Maria Pia B, Gianfranco D “Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*”. *Pathogens*, (2014); 3(3), 743-758
50. Singhai, M., Malik, A., Shahid, M., Malik, M.A. ve Goyal, R. “A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance”, *J Glob Infect Dis* (2012); 4: 193–198
51. Reid, G. Charbonneau S, R Lam D.; Kang Y.S. Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal cord injured patients. *Paraplegia* (1992); 30, 711–717.
52. Calfee D. Crisis in hospital-Acquired healthcare-associated infections. *Annual Review of Medicine* (2012); 63: 359-371.
53. Schaberg, D. R., Culver, D. H. and Gaynes, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine*. (1991); 91(3):72-75.
54. Girard, R., Perraud, M., Pruss, A., Savey, A., Tikhomirov P ,. Prevention of hospital-acquired infections, A practical guide, 2nd Edition, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12. Edited by Ducel, G., Fabry, J. and Nicolle, L. . World Health Organization, (2002); 4-7
55. Darouiche R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infectious Diseases* (2001); 33(9): 1567-72.
56. Niveditha S, Pramodhini S ,Umadevi S Kumar S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *J. Clin. Diagn. Res.* (2012); 6, 1478–148
57. Donlan R. M. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases Journal* (2010); 7(2): 277–281
58. Özgüneş İ. Hastane Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* (2010); 3(1):5-10
59. Kumar V, Sun P, Vamathevan J, Li Y, Ingraham K, Palmer L, Huang J, Brown JR:



- Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2011), 55(9):4267-4276
60. Jaruratanasirikul S, Sriwiriyan S, Punyo J. Comparison of the pharmacodynamics of meropenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 3-hour infusion or bolus injection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* Darouiche, R. O.. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infectious Diseases* (2001); 33(9): 1567-72
  61. Kirschenbaum L, Azzi E, Sfeir T, Tietjen P, Astiz M. Effect of continuous lateral rotational therapy on the prevalence of ventilator-associated pneumonia in patients requiring long-term ventilator care. *Crit Care Med.* (2002); 30(9):1983–6.
  62. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA.* (1995); 274(8):639–44.
  63. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit. Care* (2012); 16, R93.
  64. World Health Organization (WHO) and International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals, Switzerland, (1982); 1-177.
  65. Committee on Rodents, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Rodents, USA, (1996); 1-180.
  66. International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council, Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice: Proceedings of the 1998 US/Japan Conference, USA, (1999); 1-114.
  67. <http://research.ucr.edu/ocv/laboratory-animal-guide/mouse-bi methodology.aspx>
  68. Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and diseases of mice. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, editors. *Laboratory Animal Medicine*. Second ed. USA: Academic Press; (2002). 35-120.
  69. Öznur Poyraz .labotaruvar hayvanları bilimi birinci baskı (2000); 185-200
  70. L.F.M.van Zutphen . Baumans V Beynen A Principles of laboratory animal science Revised edition ; ELSEVIER . (2007); (8) 149-171
  71. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet.* (2006);

367(9524):1747–1757.

72. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* (2005); 171(4):388–416.
73. Cook C, Zhang Y, McGuinness B, Lahm M. Intra-abdominal bacterial infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J. Infect. Dis.* (2002); 185, 1395–1400.
74. Hraiech S, Papazian L, Rolain JM, Bregeon F. Animal models of polymicrobial pneumonia. *Drug Des Devel Ther.*( 2015) ; 26;9:3279-92.
75. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2008); 294(3): 98-387.
76. Bakker-Woudenberg IA. Experimental models of pulmonary infection. *J Microbiol Methods* (2003); 54: 295–313,.
77. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2008); 294(3):L387-98
78. Reznik GK. Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ Health Perspect* (1990); 85: 171–176,.
79. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma *Clinical and Experimental Allergy* (2007);37, 973–988
80. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Replacement. In: Russell WMS, Burch RL, eds. *The principles of humane experimental technique*. Chapter 5. London: Methuen. (1959).
81. Sharma S, Mohan H, Sharma S, Chhibber S. A comparative study of induction of pneumonia in mice with planktonic and biofilm cells of *Klebsiella pneumonia*. *Microbiol Immunol* (2011); 55: 295–303.
82. Mittal R, Chhibber S., Sharma S., Harjai K. Macrophage inflammatory protein2, neutrophil recruitment and bacterial persistence in an experimental mouse model of urinary tract infection. *Microbes Infect.* (2004); 6: 1326–32.
83. A guide to scanning microscope observation. JEOL LTD, TOKYO, JAPONYA
84. Bancroft JD , Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone, Newyork, ABD, 1990

85. Çınar S. Periodontal ligament fibroblastların kök yüzeyine yapışmasının kolorimetrik yöntemler ve SEM ile değerlendirilmesi (doktora tezi) E. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir,2004
86. Neumüller J. Transmission and scanning electron microscope preparation of whole cultured cells. *Methods Mol Biol* (2001); 75:377-481
87. Yadav V, Sharma S, Harjai K, Induction and resolution of lobar pneumonia following intranasal instillation with *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Ind J Med Res* (2003) 118: 4752.
88. Laichalk L, Kunkel S, Strieter R, Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*(1996); 64: 5211–8.
89. Balestrino D, Haagensen JA, Rich C, Forestier C. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J Bacteriol.* (2005); 187(8):2870-80.
90. Yung-H , Xiaolin T . Quorum Sensing and Bacterial Social InteractioBiofilms *Sensors* ; (2012); 12: 2520-2529
91. Ladd T, Schimiel D, Nickel J, Costerton J. The use of a radiorespirometric assay for testing the antibiotic sensitivity of catheter– associated bacteria. *J Urol* (1987); 138: 1451–6.
92. Kumar V , Chhibber S Acute Lung Inflammation in *Klebsiella pneumoniae* B5055- Induced Pneumonia and Sepsis in BALB/c Mice: A Comparative Study *Inflammation*, (2011); 34 ;5, 453-462
93. Fredrick D, Relman A. Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch’s Postulates *clinical microbiology reviews*, Jan. (1996); 18– 33.
94. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* (2002); 8(9): 881- 90.
95. Bhatia, M., and S. Mochhala.. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Pathology* (2004); 133: 913–927
96. Cortés G, Alvarez D, Saus C, Albertí S. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* (2002); 70(3):1075-80.
97. Murat Songu, Hüseyin Katılmış. Enfeksiyondan korunma ve immün sistem. *J Med Updates* (2012); 2(1):31-42.
98. Matthay ,Michael A. The Acute Respiratory Distress Syndrome *Journal Article New England Journal of Medicine* (2000); 1334-1349

99. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Induction of interleukin-10 and down regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection J. Med. Microbiol. (2001); 50 456-461
100. Lavender H, Jagnow, Clegg S Biofilm Formation *In Vitro* and Virulence *In Vivo* of Mutants of *Klebsiella pneumoniae* Infect. Immun. (2004); 72(8):4888.
101. Rosner AL. Evidence-based medicine: revisiting the pyramid of priorities. J Bodyw Mov Ther. (2012); 16(1):42-9.
102. Cash HA, Woods DE, McCullough B. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*, Am Rev Respir Dis (1979); 119(3):453-9.
103. Stotland PK, Radzioch D, Stevenson MM: Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: Models for the study of cystic fibrosis, Pediatric Pulmonol 2000;30(5):413-24
104. Karaman M, Bayrakal V, Yılmaz O, Kiray M, Bağrıyanık HA, Bahar İH. *P. aeruginosa* Quorum Sensing System and the Experimental Model of Chronic Respiratory Infection: Scientific Letter Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(4):981-4.

## 8. EKLER

**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

SAYI: 2014-078  
KONU: Onay

26.11.2014

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **"BİYOFİLM ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİNİN KİNETİK DEĞERLENDİRMESİ"** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

**Yürütücü:**

Doç. Dr. Meral KARAMAN, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.  
Yük. Lis. Öğr. Ali ALVANDIAN, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.  
Dr. Öğrencisi Nevin ERSOY, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.  
Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.  
Prof. Dr. Osman Yılmaz, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Prof. Dr. Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.  
Prof. Dr. İ. Hakkı Bahar, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumunuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ  
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Özcan NALBANTOĞLU

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI

Tingiz ÖZCAN

# ÖZGEÇMİŞ

## ALİ ALVANDIAN

|              |                         |
|--------------|-------------------------|
| Doğum Yılı:  | 1986                    |
| Doğum Tarihi | 1/12/1989               |
| Telefon :    | 05516217488             |
| e-posta :    | Alvandian.ali@gmail.com |

### Eğitim Bilgileri

| Ülke    | Üniversite               | Fakülte/Enstitü            | Öğrenim Alanı         | Derece        | Mezuniyet Yılı |
|---------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|----------------|
| Türkiye | Dokuz Eylül Üniversitesi | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Mikrobiyoloji         | Yüksek Lisans | 2016           |
| Iran    | Azad Üniversitesi        | Fen Fakültesi              | Laboratuvar bilimleri | Lisans        | 2009           |

### Yayınları

*C. albicans*'ın Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında *In Vivo* Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması ALİ Alvandian , MERAL Karaman , *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 42(2):69-75, 2016

### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Meral Karaman, Ali Alvandian, İsmail hakkı Bahar *in-vivo* infeksiyon modellerin yükselen yıldızı : *Galleria mellonella* 17.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları P21-26 sayfa 282, 25-29 mart 2015 antalya (poster )

Meral Karaman, Ali Alvandian, Zeynep Gülay. *Acinetobacter baumannii* kökenlerinin virülansının araştırılmasında konakçı Modeli olarak *Galleria mellonella* larvası. 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, p 109, sayfa 241, 1-3 Nisan 2016, İstanbul (poster)

Ali Alvandian, Baran Arık, Mehmet Korkut, Adil Seze, Meral Karaman *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarında *Curcuma longa*'nın etkinliğinin araştırılması *in vivo* model *Galleria mellonella* 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi / Titanic Kongre Merkezi–Belek, Antalya (sozlu sunum) 2016

## Öduller

| Ödülün adı                                                           | Alındığı kuruluş         | Yıl  |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|------|
| Deu özel çalışma modeller sempozyumu poster sunumu (üçüncülük ödül ) | Dokuz eylül üniversitesi | 2016 |