



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DİYABETİK HASTALARDA BAKTERİLERİN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. PELİN GENÇER ORUÇ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serhan SAKARYA

AYDIN - 2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DİYABETİK HASTALARDA BAKTERİLERİN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. PELİN GENÇER ORUÇ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serhan SAKARYA

AYDIN – 2010

Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında ADÜ Araştırma Fon
Saymanlığı tarafından TPF-10014 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR:

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bu süreçte her daim yüksek hoşgörüsü ve yapıcı kişiliği ile çalışma azmimi arttıran değerli eğitimcim Doç. Dr. Serhan Sakarya' ya,

Uzmanlık eğitimim süresince enfeksiyon hastalıklarına klinik ve teorik yaklaşımını örnek almaya çalıştığım, bilgiyi kullanma ve karar verme konularında bana çok önemli katkıları olan değerli eğitimcim Doç. Dr. Serkan Öncü' ye,

Uzmanlık eğitimimin her döneminde yardımını ve güvenini benden esirgemeyen, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanı olmanın sorumluluğunu her fırsatta göstererek, hekimlik kimliğime önemli katkıları olan, bilimsel desteğine her zaman ulaşmama olanak sağlayan değerli eğitimcim Yrd. Doç. Dr. M. Bülent Ertuğrul' a

Uzmanlığımın başında başasistanım, sonrasında hocam olan, tecrübelerini benimle paylaşmasından mutluluk duyduğum, yol gösterici, değerli eğitimcim Yrd. Doç. Dr. Barçın Öztürk'e,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, bilimsel kimliğinden olduğu kadar mütevazı, hoşgörülü kişiliğiyle de beni etkileyen Doç. Dr. Bülent Bozdoğan'a,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Çetin Turan, Dr. Özlem Ersoy, Dr. Ayşe Sert ve Dr. Ayşe Eşiyok'a,

Tez hazırlama sürecinde “Merkez Araştırma Laboratuvarı”nda yardımlarını benden esirgemeyen Necati Günay'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına,

Ve birlikte çalıştığım tüm hastane personeline teşekkürlerimle...

Aileme;

Şanslı olmak herkese göre farklıdır. Kimi harcayamayacağı kadar parası olan biri ile evlenmeyi ya da bir yarışmadan sonra meşhur olmayı, kimi ilk aşkı ile bir ömür geçirmeyi, kimi de loto milyoneri olmayı şanslı olmak diye tarifler. Oysa ki; şanslı olmak, öncelikle sizi seven ve değerli olduğunuzu hissettiren, özgüven veren ebeveynlere, her daim kızının arkadaşı, sırdaşı olan bir anneye ve “babasının kızı “ dedirten bir babaya sahip olmaktır. Şanslı olmak, yirmili yaşların ortasında, aradığını, hayat arkadaşını, eşini tam da en yakınında bulmak, bulunca da kendini tamamlamaktır; ailesini, her şeyini kendine katmak, benimsemek, senden yapmak ve daha da büyümeştir. Şanslı olmak, hayatının anlamına kavuşmak, bu dünyaya kendinden kalan en güzel mirası bırakabilmektir.

Bu bağlamda;

*Tüm yaşamımca bana destek olan annem ve babam Birant- Ersan Gençer’e,
Yol arkadaşım, hoşgörüsüne ve anlayışına her zaman minnettar kalacağım, eşim Veli Bilal Oruç’a,*

Her daim yanımda olarak benden yardımlarını esirgemeyen, annem ve babam Nevin-Celal Oruç’a,

“Onlarsız olamazdı” dediğim ablam Betül Oruç ve yeğenim Esra Ceren Yıkılmaz’a,

Her şeyimiz, oğlumuz, kıymetlimiz Kaan Kerim Oruç’a,

Ve son olarak üzerimde emeği geçen herkese şükranlarımla...

İyi ki varsınız..

İÇİNDEKİLER:

	Sayfa No
1. Giriş	1
2. Genel bilgiler	5
2.1. Enfeksiyon ve diyabet ilişkisi	5
2.1.1. Enfeksiyonların diyabet gelişimine katkısı var mı?	5
2.1.2. Diyabetli hastalarda gelişen enfeksiyonlar	6
2.1.3. Enfeksiyonların ve antimikrobiklerin diyabet üzerine etkisi	13
2.1.4. Diyabetin antimikrobik yanıt üzerine etkisi	14
2.2. Diyabetes mellitusta enfeksiyona yatkınlık mekanizmaları	15
2.2.1. Diyabetes mellitusta endotel fonksiyon bozukluğu	16
2.2.2. Diyabetes mellitusta immun sistem bozukluğu	22
2.3. Biyofilm oluşumu	25
2.3.1. Bakteriler neden biyofilm oluşturlar?	27
2.3.2. Bakteriler nasıl biyofilm oluşturlar?	28
2.3.3. Biyofilm gelişim aşamaları	28
2.3.4. Biyofilmin mimarisi ve yapısı	32
2.3.5. Biyofilm ekolojisi	34
2.4. <i>Escherichia coli</i> ve virulans faktörleri	39
2.4.1. Biyofilm oluşumu	39
2.4.2. Biyofilm oluşumunda yüzey belirleyicileri	42
2.4.3. Hemaglutinasyon ve hemolizin üretimi	46
3. Gereç ve yöntem	48
4. Bulgular	53
5. Tartışma	61
6. Sonuç	68
7. Özet	69
8. İngilizce özet	71
9. Kaynaklar	73

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Diyabetik hastalarda görülen infeksiyonlar

Tablo II: Zigomikoz gelişimine zemin hazırlayan risk faktörleri

Tablo III: *E. coli* biyofilm oluşumunda yer alan yüzey oluşumları

Tablo IV: Biyofilm oluşturan izolatların diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

Tablo V: Biyofilm oluşturan idrar ve yara yeri izolatlarının diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

Tablo VI: Tip 1 fimbriyası olan izolatların diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

Tablo VII: Tip 1 fimbriyası olan idrar ve yara yeri izolatlarının diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

Tablo VIII: P-pilisi olan izolatların diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

Tablo IX: P-pilisi olan idrar ve yara yeri izolatlarının diyabetes mellitus varlığına göre dağılımı

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Nitrik oksit sentezi ve diyabette bozulan yollar

Şekil 2: Hipergliseminin oluşturduğu endotel fonksiyon bozukluğu

Şekil 3: Polyol (aldoz redüktaz) yolu

Şekil 4: Fosfokinaz C aktivasyonu

Şekil 5: Glikozun oksidatif fosforilasyonu

Şekil 6: Nötrofil kaynaklı solunumsal patlama döngüsü

Şekil 7: Biyofilm gelişim aşamaları

Şekil 8: Biyofilmin üç boyutlu yapısı

Şekil 9: Toplanan izolatların diyabet varlığına göre dağılımı

Şekil 10: Tüm izolatların antibiyotik direnç ve duyarlılıkları

Şekil 11: Biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan izolatlarda antibiyotik direnci

Şekil 12: Diyabetes mellitus pozitif ve diyabetes mellitus negatif izolatlarda antibiyotik direnci

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGEs: Advanced glycation end-products (İleri glikolizasyon ürünleri)

AHLs: Açıl homoserin laktonlar

AI-2: Otoindükleyici 2 sistemi

AIDA: Adhesin involved in diffuse adherence

AIPs: Autoinducing peptidler

AK: Amikasin

Ang II: Anjiotensin II

AMC: Amoksisilin/klavulanik asit

AMP: Ampisilin

ANP: Atrial natriüretik peptid

ARB: Asidoresistan bakteri

ATM: AztreonamBH₄: Tetrahidrobioptein

ATP: Adenozin tri-fosfat

C_{max}: İlacın maksimum plazma konsantrasyon değeri

Ca⁺²: Kalsiyum

CAZ: Seftazidim

CAZ/CLA: Seftazidim/klavulanik asit

CIP: Siprofloksasin

CLSI: Clinical and Laboratory Standarts Institute

CMV: Sitomegalovirus

CRO: Seftriakson

CRP: C-reaktif protein

CXM: Sefuroksim

CZ: Sefazolin

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

DAG: Diaçilgliserol

DM: Diyabetes mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ECM: Ekstraselluler matriks

EPC: Endotel progenitor hücre

EPS: Ekzopolisakkarit

ET-1: Endotelin-1
FEP: Sefepim
FOX: Sefoksitin
GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
HAART: Highly active anti-retroviral treatment
HCV: Hepatit C virus
HMP: Heksoz monofosfat
H-NS: Histone-like nucleoid structuring protein
HSCT: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
ICAM: Intercellular adhesion molecules (İntersellüler adhezyon molekülleri)
ICAM-1: İntersellüler adhezyon molekülü-1
IFN-gamma: İnterferon-gamma
IgA: Immunglobulin A
IHF: Integration host factor
IL-1 beta: İnterlökin-1 beta
IL-6: İnterlökin-6
IL-8: İnterlökin-8
IMP: İmipenem
IR: İnsülin reseptörü
LRP: Leucine-responsive regulatory protein
MBC: Minimum bakterisidal konsantrasyon
MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1
MCSF: Macrophage colony stimulating factor (makrofaj koloni uyarıcı faktör)
MIC: Minimum inhibitör konsantrasyon
MRHA: Mannoza dirençli hemaglutinasyon
MRSA: Metisilin dirençli *S.aureus*
MSCRAMM: Mikrobial yüzey komponentini tanıyan adheziv matriks molekülleri
MSHA: Mannoza duyarlı hemaglutinasyon
NaCl: Sodyum klorür
NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO: Nitrik Oksit
O₂: Oksijen
PAI: Plazminojen aktivatör inhibitörü

PBS: Phosphat saline buffer
PGI₂: Prostosiklin I₂
PKC: Protein kinaz C
PVC: Polivinilklorid
QS: Quorum sensing
ROS: Reaktif oksijen türleri
SCP: Sefaperazon/sulbaktam
SDF-1: Stromal cell-derived factor 1 (Stromal hücrelerden oluşan faktör-1)
SXT: Ko-trimaksazol
TNF-alfa: Tümör nekrozis faktör-alfa
tPA: Doku plazminojen aktivatörü
TXA₂: Tromboksan A₂
TZP: Piperasilin/tazobaktam
VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: *Escherichia coli* seçici besiyerinde pempe ve mor renk verenler koloniler

Resim 2: Kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi

Resim 3: Pozitif hemaglütinasyon

Resim 4: Negatif hemaglütinasyon

Resim 5: Plakta hemaglütinasyon

Resim 6: Seftazidim (CAZ) ve seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CLA) diskleri ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) varlığının gösterilmesi

Resim 7: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif *E. coli*

GİRİŞ:

Diyabetes mellitus (DM) kan şekeri yüksekliği ile karakterize, genetik faktörlerin de rol oynadığı kronik, metabolik bir hastalıktır. Diyabette birçok sistem etkilenmekte, infeksiyonlar daha sık ve uzun süre gözlenmektedir. Bu hastalar pek çok faktöre bağlı olarak infeksiyonlara daha yatkındırlar. Diyabetik süreçte, nöropati ve vasküler yetmezlik ile birlikte hipergliseminin, bakteri üzerindeki etkisinin infeksiyon oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle bazı yumuşak doku infeksiyonları (nekrotizan fasiit, furnier gangreni gibi) [1], malign eksternal otit, rinocerebral mukormikoz, amfizematöz kolesistit, deride *Candida* infeksiyonları ve diyabetik ayak gibi bazı infeksiyon hastalıkları DM hastalarında daha sık ve spesifik olarak görülmektedir [2]. Örneğin; diyabetik ayak patolojisi ve buna bağlı olarak oluşan diyabetik ayak infeksiyonu sadece diyabetik hastaları ilgilendiren ve bu hastalar için önemli sorun oluşturan bir durumdur. Amerika Birleşik Devletleri'nde alt ekstremité amputasyonlarının başta gelen nedeni de diyabetik ayak infeksiyonlarıdır ve bu oran % 50-70 arasında değişmektedir [3]. Toplum kökenli pnömonide de, hastanın ölüm riskinin belirlenmesinde kullanılan pnömoni ciddiyet indeksi puanlamasında, hastanın diyabetinin olması riski artırıcı faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir ve diyabetik hastalarda *Staphylococcus aureus* ve Gram-negatif bakteri pnömonilerinin sıklığı artmıştır [4]. Diyabetik kadınlarda asemptomatik bakteriüri sıklığının diyabetik olmayanlara göre yaklaşık 3 kat arttığı [5] , ayrıca pnömoni, üriner sistem infeksiyonları gibi infeksiyonların diyabetik hastalarda daha ciddi seyrettiği belirtilmektedir.

Diyabetik hastalar pek çok faktöre bağlı olarak infeksiyonlara daha yatkındırlar. Bu faktörlerin en önemlileri vaskülopati ve nöropati sonucu deri bütünlüğünün bozulmuş olması, nötrofil, monosit ve makrofaj fonksiyon bozukluklarıdır [1].

Diyabetik hastalarda hiperglisemi ve hipergliseye sekonder salgılanan mediatörler ile endotel fonksiyon bozukluğu gelişir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan vaskulopati, mikrosirkülasyonun ve perfüzyonun bozulmasına yol açar. Gelişen endotel fonksiyon bozukluğuna immün sistem bozukluğu da eklenir. İmmün sistem bozukluklarının içinde önemli faktörlerden biri nötrofil, monosit ve makrofaj fonksiyon bozukluklarıdır [1,3]. Özellikle nötrofil fonksiyon bozukluğunun önemli bir yeri bulunmaktadır [3]. Hipergliseminin etkisi ile diyabetik hastalarda nötrofil ve makrofaj kemotaksisi ve mikroorganizmanın intrasellüler olarak öldürülmesi yetersiz kalır [6].

Diyabette fagositik hücrelerin hareketi genellikle azalmıştır. Dünya Sağlık Örgütü diyabeti sekonder immün yetmezlikler içinde sınıflamıştır. Bu immünyetmezlik gelişimi,

nötrofil lökosit ve/veya lenfosit aktivitesindeki değişiklikleri kapsar. Nötrofil lökositler bakteriyel ajanlara karşı konağın ilk savunma bariyerini oluşturur. Diyabetik hastalarda kemotaksis, fagositoz, immunglobulin üretimi ve kompleman fonksiyonlarında bozukluk gözlenir. Bu hastalarda nötrofil lökositlerin kemotaksisi azalmıştır.

Normal koşullar altında fagositoz iki basamakta gerçekleşir. İlki adhezyon, ikincisi mikroorganizmaların intrasitoplazmik vakuollere alınmasıdır. Hiperglisemi durumunda siyalidaz enzim sekresyonunda artış, hücre membranındaki siyalik asit yapılarının koparılmasına neden olur. Bu durum, lektin reseptörlerinin hedef hücreyi tanıma yeteneğini azaltır ve fagositozun başlamasını engeller [6].

Tüm bunların sonucunda, diyabetik hastalarda endotel fonksiyon bozukluğu ve immun sistem yetersizlikleri meydana gelir.

Bakterinin infeksiyon oluşturması için patojenin hedef dokuda kolonize olması gerekmektedir. Kolonizasyon mukoza ile bakteri arasındaki adhezyon ile başlar. Konak ve bakteride adheransı sağlayan adhezyon faktörleri vardır. Bu adhezyon değişik şekillerde olabilir [7]:

1- Nonspesifik adherans: Reversibl bir adherans olup, nonspesifik çekim güçleri ile bakteri ökaryot hücreye yaklaşarak olmaktadır. Bu adheransta yer alan muhtemel çekim:

- Hidrofobik ilişki
- Elektrostatik çekim
- Atomik ve moleküler vibrasyon sonucu gelişen farklı kutupsal çekim
- Bakteriyel glikokaliks (biyofilm) aracılığı ile tutunma

ile sağlanır.

2- Spesifik adherans: Her iki hücre yüzeyindeki spesifik bağlar ile oluşan kalıcı adheranstır. Basitçe bu adheransın olması için hücre yüzeyinde reseptör ve adhesin olarak adlandırılan iki faktör gereklidir. Adhesinler genellikle lektin tabiatında moleküller şeklindeyken, reseptörler, ökaryotik hücre yüzeyinde spesifik karbonhidrat veya peptid tabiatında moleküller olarak bulunmaktadır. Diyabetli hastalarda endotel ve epitelyumun yüzey yapısındaki değişiklikler bakterinin adheransı ve tropizmini etkileyebileceğinden bakteri yüzeyindeki adherans faktörlerinin çeşitliliği de infeksiyon oluşumunda önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır [8-10].

İnfeksiyon gelişimi sırasında, mikroorganizmalar yüzeye adhezyon ve adherens sonrası bölünüp çoğalmaya başlarlar. Sayıca artan mikroorganizmaların bulundukları yüzeye daha da yayılmaları sonrası kolonizasyon, ekzopolisakkarit sentezi ve gen düzenlenmesinin de eşlik ettiği kompleks bir sistem ile biyofilm oluşumu sağlanır.

Mikrobiyal biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeye irreversibl olarak adhere olması sonrası yapısal matriks sağlayan ve adhezyonu kolaylaştıran ekstrasellüler polimerlerin üretilmesi ile gelişirler [11]. Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar [12]. Biyofilmler, normal flora gelişiminden endokardite, kistik fibrozdan otitis mediaya, yabancı cisim infeksiyonlarından üriner sistem infeksiyonlarına kadar birçok infeksiyonun gelişiminden sorumludur. Biyofilm içindeki bakteri, birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir [13-15]. Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir [16]. Biyofilmin yapısı henüz kesin olarak tanımlanamamış olmakla birlikte, fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarının birçoğundan, yapısındaki karbonhidratlar sorumlu gibi görünmektedir.

Bakteriler tercihan olumsuz ortamlarda biyofilm yaparlar [17]. Bakteriler strese yanıt, kolonizasyon, topluluk oluşturma, yaşanabilir çevre geliştirme nedenleri ile biyofilm oluştururlar. Özellikle ortamdaki glikozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının, pseudomonaslar, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ve stafilokokların ekzopolisakkarit (EPS) ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir [18,19]. Bunların sonucunda ve bunlara ek olarak, değişen glisemi nedeniyle değişen ortam şartları (ph vs.) da bakterilerin antibiyotik yanıtını da etkileyebilmektedir.

E. coli suşları klinik örneklerden en sık izole edilen ajanlardır. Virulans faktörlerinden en önemlisi yapışma (adherens) özelliğidir [20]. *E. coli*'nin hücre dışına salgılanan en önemli virulans faktörü hemolizindir. Barsak dışı infeksiyonlarından izole edilen *E. coli* suşlarının yarısından fazlası hemolizin salgılar ve hemolizin sitotoksik etkilidir.

E. coli'nin hücre yüzey virulans faktörleri çeşitli adhezinleri içerir. Bunlar esas olarak fimbrial kaynaklıdır. Fimbria üreten *E.coli* suşları, konak dokuya invaze olmalarını kolaylaştıracak farklı matriks yapılarına bağlanma özelliğindedir. *E.coli* suşlarında, tip 1 fimbria ve P, S, X faktörü (Dr Hemaglutinin) içeren tip 2 fimbria gibi konak hücreye adhezyonda etkili yüzey yapıları bulunur [21]. Bunlar epitelyum hücrelerine bakteriyel adhezyonu, invazyonu ve biyofilm oluşumunu arttırırlar [22].

Tüm bu bilgilerin ışığı altında biz bu çalışmamızda; diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarının, biyofilm oluşturma ve hipergliseminin

bakteri fenotipi üzerindeki etkisi ile enfeksiyona yatkınlığı artırma potansiyellerini incelemeyi amaçlıyoruz.

GENEL BİLGİLER:

Diyabetes mellitus (DM) toplumda sık görülen, glikoz metabolizmasının bozulmasıyla karakterize, otoimmün bir endokrin hastalıktır [23]. Dünyada 170 milyon kişiyi etkilemektedir ve hastaların % 90'dan fazlası insuline bağımlı olmayan tip 2 diyabettir [24]. Tip 1 DM patogenezinde Langerhans adacıklarının inflamasyonu söz konusudur. Langerhans adacıklarını infiltre eden makrofajlar tarafından üretilen İnterlökin-1 beta (IL-1beta) ve Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) gibi sitokinler beta-hücreleri üzerine toksik etki gösterir. Aktive T-hücreler ayrıca TNF-alfa ve İnterferon-gamma (IFN-gamma) gibi proinflamatuvar sitokinleri üretir ve apoptosisi indükleyen FasL proteinini eksprese ederler. Bu etkilerin net sonucu olarak, insulin salgılayan beta-hücreleri yıkıma uğrar [25]. Beta-hücrelerinin insulin salgı kapasitesinin, insulin direncini karşılayamaz duruma gelmeleri halinde ise tip 2 DM ortaya çıkar [25]. Tip 2 DM'te sitokinler insulin ve leptin direncinden sorumludur [27,28].

Diyabet ve infeksiyonlar birlikte değerlendirildiğinde, diyabetli hastalar pek çok faktöre bağlı olarak infeksiyona yatkınlık gösterir [1,29]. Bu faktörler hiperglisemi, obezite, nöropati, yetersiz doku perfüzyonu ve yara iyileşmesinin gecikmesidir [30]. Diyabetik hastalarda bazı infeksiyonlar özellikle bazı yumuşak doku infeksiyonları (nekrotizan fasiit, fournier gangreni gibi), *S. aureus* ve Gram-negatif bakterilere bağlı pnömoniler ve asemptomatik bakteriüri sıklığı diyabetik olmayanlara göre artmıştır. Nadir görülen invaziv otitis eksterna, rinoserebral mukormikoz, amfizematöz kolesistit gibi hastalıklara da diyabetli hastalarda daha sık rastlanır [31].

İnfeksiyon ve diyabet ilişkisini dört alt başlıkta incelemek gerekir. Bunlar;

- 1.İnfeksiyonların DM gelişimine olan katkısı,
- 2.DM'lu hastalarda gelişen toplum kökenli ve nozokomiyal infeksiyonlar,
- 3.İnfeksiyonun ve antimikrobiklerin diyabet üzerine etkileri,
- 4.Diyabetin antimikrobik tedaviye yanıt üzerine etkisidir.

2.1. İnfeksiyon ve diyabet ilişkisi:

2.1.1. İnfeksiyonların DM gelişimine katkısı var mı?

Virusların diyabet gelişimine neden olabilecekleri öne sürülmektedir. Viral infeksiyonların diyabet oluşumunu nasıl etkileyebileceğini açıklayan iki teori vardır. Birincisine göre; viruslar pankreatik beta hücresi içinde replike olurlar ve direkt sitotoksiste ile hücrenin ölümüne yol açarlar. İkinci teoriye göre ise; beta hücrelerinin viral infeksiyonu pankreas adacıklarına karşı otoimmün saldırıyı başlatır [32]. Toplumda

çok sık maruz kalınan ve persiste eden ya da kronikleşen Herpes virüsler (tip 1 ve 2), enterovirüsler ve *Chlamydia pneumoniae* gibi mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların da sağlıklı erkeklerde yağ kitlesinde artış ve insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir. Pak ve arkadaşları [33], yeni tanı konulmuş 59 diyabetik hasta ve 38 kontrol vakasında moleküler hibridizasyon yöntemi ile sitomegalovirus (CMV) genomu araştırmış, diyabetik hastaların 13'ünde (% 22), kontrol grubunun ise yalnızca birinde (% 2,6) CMV genomu saptamışlardır. Hastaların % 39'unun serumunda adacık hücre antikoruna, % 41'inin serumunda sitotoksik beta hücre yüzeyi antikoruna bulunmuştur. Aynı çalışmada, CMV genomu pozitif hastalarda adacık hücre antikoruna % 62 ve sitotoksik beta hücre yüzeyi antikoruna % 69 oranında pozitif bulunmuştur [33]. CMV genomu ile adacık antikorları arasında yakın ilişki saptanması, CMV infeksiyonu ile tip 1 diyabet arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da *Herpes simplex virus* tip 1 ile tip 2 diyabet arasında belirgin ilişki saptanmıştır [34]. Viskari ve ark. da enterovirus infeksiyonlarının tip 1 DM insidansını arttığını savunmuşlardır [35]. Kahraman ve ark. nın diyabetik olan ve olmayan hastalarda HCV antikor prevalansını araştırdığı çalışmasında da, diyabetik hastalarda daha yüksek antikor pozitifliği saptanmış ancak bu durum net olarak tip 1 diyabet gelişimi ile ilişkilendirilememiştir [32]. Virusların diyabet patogenezindeki rolünü içeren çalışmalar devam etmektedir.

Doğal immünitinin sistemik komponenti olan akut faz yanıtını gösteren birçok akut faz proteininin de tip 2 diyabeti olan hastalarda arttığı belirtilmiştir [36]. Tip 2 diyabet doğal immün sistemin aktivasyonu ile birliktedir. Bu kronik ve sitokin aracılı düşük şiddetteki inflamasyon, metabolik sendromun da birçok bulgusunu açıklamaktadır.

2.1.2. Diyabetli hastalarda gelişen infeksiyonlar

Diyabetes mellitus sistemik infeksiyonların gelişimine zemin hazırlar, infeksiyonun gelişimini, ciddiyetini ve prognozunu olumsuz olarak etkiler [24]. Diyabetik hastalarda nötrofil ve monositlerin adherans, kemotaksis ve hücre içi öldürme yetenekleri azalır ve hücrel immünite zayıflar [37].

İnflamatuar yanıt, hücrel ve salgısal komponentlerden oluşur. İnflamasyonun mikroçevresindeki ödem, hipoksiyi arttıran en önemli faktördür. Diyabetik hastalarda mevcut olan mikrovasküler ve makrovasküler fonksiyon bozukluğu ile birlikte hipoksinin birleşimi kısmen anaerobik bir mikroçevre oluşturur. İnflamatuar yanıt katılan hücreler (nötrofil ve monositler) adenosin tri-fosfat (ATP) elde etmek için glikoliz yaparlar. DM'lu hastalarda glikolizin bozulması ya da inhibe olması ve bunun da hücrelerin fonksiyonlarını olumsuz etkilemesi söz konusudur [38].

Toplum kökenli bazı infeksiyonlar diyabetik olmayan hastalara göre diyabetik hastalarda daha sık görülmektedir. Diyabetik hastalarda görülen infeksiyonlar üç ana grupta incelenebilir [38]. (Tablo 1)

- a. DM ile ilişkisi mümkün olan infeksiyonlar (yaygın infeksiyonlar)
- b. DM ile güçlü birlikteliği olan infeksiyonlar (öncelikle diyabetik hastalarda)
- c. Diyabetik hastalara yapılan girişimlere bağlı infeksiyonlar

Tablo I: Diyabetik hastalarda görülen infeksiyonlar

- | |
|--|
| <p>a. DM ile ilişkisi mümkün olan infeksiyonlar (yaygın infeksiyonlar)</p> <ul style="list-style-type: none">- Üriner sistem infeksiyonları- <i>Staphylococcus aureus</i> infeksiyonları- Yumuşak doku infeksiyonları (nekrotizan fasiit, fournier gangreni dahil)- Diyabetik ayak infeksiyonları- Sinerjistik nekrotizan kolit- Anaerobik sellulit- Tüberküloz?- Mantar infeksiyonları <p>b. DM ile güçlü birlikteliği olan infeksiyonlar (öncelikle diyabetik hastalarda)</p> <ul style="list-style-type: none">- Mukormikoz- Malign otitis eksterna- Amfizematöz piyelonefrit- Amfizematöz kolesistit <p>c. Diyabetik hastalara yapılan girişimlere bağlı infeksiyonlar</p> <ul style="list-style-type: none">- Penil protez, kalp pili ve defibrilatör- Organ transplantasyonu- Sürekli ayaktan periton diyalizi- Hemodiyaliz |
|--|

2.1.2.a. DM ile ilişkisi mümkün olan infeksiyonlar (yaygın infeksiyonlar)

Üriner sistem infeksiyonları

Nörojenik mesane disfonksiyonu nedeniyle mesanede sürekli rezidü idrar kalması ve glikozürinin bakteriyel replikasyonu arttırarak fagositozu bozması, üriner sistem infeksiyonlarına predispozisyon hazırlar [39]. Diyabetik hastalarda en sık gözlenen üriner

sistem infeksiyonu asemptomatik bakteriüridir. Genel olarak, asemptomatik bakteriüri varlığı diyabetin süresi ve retinopati, nefropati gibi komplikasyonların varlığı ile ilişkili bulunmuştur [40-41]. Özellikle diyabetik kadınlarda asemptomatik bakteriüri prevalansı diyabetik olmayanlara göre belirgin olarak artmıştır. Geerlings ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu oran yaklaşık dört kat olarak bulunmuştur [42]. Diyabetik olan ve olmayan hastalar ile yapılan diğer bir çalışmada, üriner sistemden izole edilen etkenler arasında antibiyotik direnci açısından fark olmadığı, in vitro olarak glikozürinin bakteriyel üremeyi arttırdığı, nötrofil fonksiyonlarının iki grup arasında farklılık göstermediği, asemptomatik bakteriürisi olan diyabetik kadınlarda idrar İnterlökin-6 (IL-6) ve İnterlökin-8 (IL-8) düzeylerinin diyabetik olmayan kadınlara göre düşük olduğu ve DM'lu hastalardan izole edilen üropitele *E.coli* adherensinin daha fazla olduğu saptanmıştır [43].

Asemptomatik bakteriüri tedavisi tartışmalı olmakla birlikte aşağıdaki gruplara tedavi önerilmektedir:

1.Gebeler

2.Kateter çıkarıldıktan 48 saat sonra devam eden kateter ilişkili asemptomatik bakteriürisi olan kadınlar

3.Transüretal girişim yapılacak hastalar

Solid organ transplantı yapılanlarda asemptomatik bakteriüri tedavisi hakkında öneri bulunmazken, diyabetik hastalarda tedavi endike değildir [44].

Amfizematöz sistit, amfizematöz piyelonefrit ve renal papiller nekroz gibi nadir görülen komplikasyonlar, diyabetik hastalarda daha sık ve ciddi olarak görülmektedir [29]. Papilla nekrozu sıklıkla piyelonefrit ile birlikte görülür [45]. Tüm yaşam boyunca diyabetik hastaların % 30'unda saptanır. Papilla nekrozu tespit edilen kadınlarda ise % 80 olasılıkla DM vardır. Sık idrar yolu infeksiyonları durumunda papilla nekrozu akla gelmelidir. Amfizematöz piyelonefritte etkenler genellikle *E.coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* türleri, nadiren *Streptococcus* ve *Candida* türleridir. Kadınlarda iki kat daha sık görülür ve obstruksiyon en önemli predispozan faktördür. Sadece renal toplayıcı sistemde gaz görülmesi halinde, medikal tedavi yeterlidir ancak renal parankimde gaz saptanması halinde nefrektomi yapılmalıdır [46].

Solunum sistemi infeksiyonları

Toplum kökenli pnömonilerin diyabetik hastalarda daha ciddi ve daha yüksek mortalite ile seyrettiği ve daha çok hastaneye yatış gerektirdiği gösterilmiştir. Ayrıca diyabetik hastalardaki toplum kökenli pnömonilerde, dirençli bakterilerle karşılaşma riski daha yüksektir. Toplum kökenli pnömonide, hastanın ölüm riskinin belirlenmesinde kullanılan pnömoni ciddiyet indeksi puanlamasında, hastanın diyabetinin olması, riski artırıcı

faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Diyabetik hastalarda *S. aureus* ve Gram-negatif bakteri pnömonilerinin sıklığı artmıştır [4] , *Streptococcus pneumoniae*, *İnfluenza virus* ve *Legionella*'ya bağlı solunum yolu infeksiyonları yüksek morbidite ve mortalite ile seyreder [46] , bakteriyemi riski daha yüksektir, tekrarlayan pnömoniler sıklığıdır [39]. Bu hastaların otopsilerinde, glutasyon peroksidaz aktivitesinde azalma, endotel disfonksiyonu ve mikrozomal bozukluklar sonucu akciğer volümünde ve difüzyon kapasitesinde azalmaya neden olan mikroanjiyopati, vasküler hyalinoz, interseptal nodüler fibrozis, granülomlar, amfizeme benzer septal obliterasyon ile fokal proteinoz bulguları saptanmıştır [38]. Tip 1 diyabeti olan çocuklarda, akut solunum yolu viral infeksiyonlarının, arteriyel endotel disfonksiyonunu arttırdığı da gösterilmiştir [47]. Diyabetik hastalarda toplum kaynaklı pnömokokkal bakteriyemi fatalite oranının diyabetik olmayanlardan daha fazla olmadığı belirlenmiştir [48] , bulgular diyabetik hastalarda solunum sistemi infeksiyonlarının daha ağır ilerlediğini göstermektedir. Bu nedenle tüm diyabetik hastalara pnömokok ve influenza için immünizasyon yapılması önerilmektedir [49,50].

Yumuşak doku infeksiyonları

Diyabetik hastalarda cilt ve yumuşak doku infeksiyonları sıklığıdır. Bazı bakteri ve mantarlar diyabetik hastaların cilt ve mukozalarında daha sık bulunur. Özellikle *S. aureus*'a bağlı impetigo, fronkül, karbonkül, sellülit, nekrotizan fasiit, septik bursit; *Candida*'ya bağlı onikomikoz, mukokutanöz kandidiazis gibi klinik tablolara sık rastlanır [39].

Bu hastalarda, cilt ve burunda stafilokok taşıyıcılığı yüksektir [29]. Bu nedenle, bu bakterinin neden olduğu infeksiyonlar sık görülür [38]. Diyabetes mellituslu hastalarda burun metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) taşıyıcılığı ve bunu etkileyen faktörlerin belirlenmesini amaçlayan bir çalışmada toplam 145 diyabetli hastanın % 66,2'sinin burun sürüntü örneklerinde *S.aureus* izole edilmiştir. *S.aureus* taşıyıcılığı ile diyabet tipi, diyabet süresi, insülin kullanımı, son iki hafta içinde antibiyotik kullanımı, HbA1C düzeyi, retinopati, diş protezi varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sonuç olarak, diyabet hastalarında hastalığın tipi, glisemi kontrolü, antibiyotik kullanma ve hastanede yatmanın, burun MRSA taşıyıcılığı için risk faktörü olmadıkları ancak izole edilen kökenlerin antibiyotik direncinin bu grup hastaların ampirik tedavisinde dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır [51].

Osteomiyelit/Diyabetik ayak

Diyabetik olgularda mikroanjiyopati ile ayağın periferik dolaşımı etkilenir. Mikroanjiyopatiye ek olarak travma, septik tromboz ve ya infeksiyonlara bağlı gelişen ödem, perfüzyonu bozulmuş ayağın distal arter yapılarında tam tıkanıklığa ve gelişen ağır iskemi sonucunda ülser, lokal nekroz ve ya gangrene neden olur. Diyabete bağlı gelişen nöropati ve

vasküler yetmezliğe bağlı olarak hastaların % 50-80'inde diyabetik ayak komplikasyonu ortaya çıkar. Esas olarak, diyabetik ayak infeksiyonlarının nedeni multifaktöriyeldir. Diyabetik hastalarda ayak ülserlerinin sıklığı % 12-15'tir ve her yıl yaklaşık 92.000 olgu, amputasyon ile sonuçlanmaktadır [52]. Diyabet tanısı konulduktan 10-15 yıl sonra hastaların % 50-85'inde vaskülopati gelişmekte ve hastalar vasküler cerrahi için aday konumuna gelmektedirler [53]. Amerika Birleşik Devletleri'nde alt ekstremité amputasyonlarının başta gelen nedeni de diyabetik ayak infeksiyonlarıdır ve bu oran % 50-70 arasında değişmektedir [54]. Almanya'da da travmatik olmayan alt ekstremité amputasyonlarının % 72'sinin nedeni olarak diyabet gösterilmektedir ve bu oran, diyabetik olmayan kişilerle karşılaştırıldığında 22 kat fazladır [55]. Tüm tedavi yaklaşımlarına karşın bir kez ayak infeksiyonu gelişen diyabetik hastalarda prognoz açısından yapılan araştırmalarda, ilk infeksiyonu takip eden bir-üç yıl içinde toplam amputasyon oranları % 40'a ulaşmaktadır [54]. Apelqvist tarafından yayımlanan araştırmada ilk infeksiyonun tedavi sonucu iyileşmesini takip eden üç yıl içinde hastalarda mortalite oranı % 27, amputasyon oranı ise % 41 olarak bulunmuş, mortalite oranı yaş ve cinsiyete göre karşılaştırılmış populasyona göre de iki-dört kat daha yüksek olarak saptanmıştır [56]. Diyabetik ayak infeksiyonları mortalite ve morbidite açısından olduğu kadar maliyet olarak da önemli sorun yaratmaktadır [57]. Bu nedenle son dönemde, diyabetik ülser gelişimini engelleyici, koruyucu bakıma yönelik tedavi yöntemlerine ağırlık verilmiştir. Diyabetik ayak olguları travmatik olmayan amputasyonların çoğunu oluşturmaları ve eşlik ettikleri kardiyovasküler risklerle birlikte yüksek mortaliteye neden olmaları açısından önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedirler.

2.1.2.b. DM ile güçlü birlikteliği olan infeksiyonlar (öncelikle diyabetik hastalarda)

Malign otitis eksterna

Bu olguların önemli bir bölümü diyabetik hastalarda görülmektedir. Olguların % 98'inden fazlasında *Pseudomonas aeruginosa* etken olarak bildirilmiştir. Hastaların % 90'ında kontrolsüz diyabet vardır. Hastalarda sıklıkla, özellikle gece ortaya çıkan kulak ağrısı, kötü kokulu veya pürülan kulak akıntısı, işitme kaybı ve ateş görülür [38].

Mukormikoz (Zigomikoz)

Mukormikoz *Zycomycetes* sınıfına ait mantarlar tarafından oluşturulan, ciddi ve sıklıkla ölümcül seyreden bir infeksiyondur. En sık görülen formu rinocerebral mukormikozdur ve bu olguların yaklaşık % 50-75'i diyabetiktir [58]. DM veya steroid kullanımı gibi bağışıklığın baskılandığı hastalıklarda, makrofajlar mantar sporlarının germinasyonunu inhibe edemez ve hastalığın yaygınlaşmasını önleyemez. Zigomikoza zemin hazırlayan birçok risk faktörü tanımlanmıştır (Tablo 2).

DM'lu hastalarda hastalığın oluşumunda ketoasidozun rolü oldukça önemlidir. Vakaların % 50'sinde ketoasidoz tanımlanmış predispozan faktördür [58]. Diyabette asidoz sırasında transferrine demir bağlanması engellenir ve serumda serbest demir miktarı artar. Üremek için demire gereksinim duyan *Rhizopus* türleri, bu ortamda konak savunmasından korunarak çoğalır ve hastalığa neden olabilir. Deneysel olarak tek başına asidoz ve hiperglisemi hastalık oluşmasında yeterli değildir. Diyabette oluşan immün fonksiyon değişiklikleri de buna katkıda bulunur [59,60].

Tablo II: Zigomikoz gelişimine zemin hazırlayan risk faktörleri

DM (Diyabetik ketoasidoz, iyi kontrol edilememiş DM)
Kronik metabolik asidoz (böbrek yetmezliği, kronik salisilat zehirlenmesi)
Deferoksamin tedavisi
Demirin aşırı yüksekliği
İmmünsüpresyon (nötropeni, steroid tedavisi, solid organ/hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HSCT), HIV/AIDS)
Cilt ve yumuşak doku hasarı (yanık, travma, cerrahi yara)
Sınıflanamayan (intravenöz ilaç kullanımı, prematüreler, malnütrisyon, uzun süreli geniş spektrumlu antimikrobik kullanımı)

Tüberküloz

Birçok çalışmada diyabet ve tüberküloz arasındaki ilişki araştırılmış ve diyabetik hastalarda tüberküloz riski 16 kat fazla saptanmıştır [23]. Jeon ve arkadaşlarının 13 çalışmayı içeren derlemesinde de DM'in aktif tüberküloz riskini arttırdığı belirtilmiştir [61]. Alishahbana ve ark. nın çalışmasında, tüberkülozlu hastaların % 14,8'ine DM tanısı konulmuş ve diyabetik olan ve olmayan gruplarda tedavi yanıtı araştırılmıştır. Tedavinin ikinci ayından sonra balgamın mikroskopik incelemesinde diyabetik grupta % 18,1, diyabetik olmayan grupta ise % 10 oranında asidoresistan bakteri (ARB) pozitifliği görülmüştür. Altı ay sonra DM'li hastaların balgam kültürlerinin % 22,2'sinde *Mycobacterium tuberculosis* üremesi saptanmıştır [62].

Diyabetli hastada tüberküloz gelişiminde hastanın yaşı, diyabetin şiddeti ve süresi, hastanın kilosu önemlidir [46,62]. Bu hastalarda tüberküloz alt lobları tutma eğilimindedir ve daha ciddi seyirlidir [29]. Önceki hastalık aktivasyonu, kavite oluşumu, segmenter olmayan tutulum sıklıkla görülür [46]. Amerikan Toraks Derneği tüberkülin deri testinin 10 mm ve üzerinde olması halinde diyabetli hastalara altı ay izoniazid profilaksisi önermektedir [29].

Oral ve Özefageal Kandidiazis

Günlük yaşamda diyabetik hastalarda en sık karşılaşılan mantar infeksiyonları mayalara bağlı olanlardır. Özellikle normal flora üyesi *Candida*'ya bağlı infeksiyonlar, bu hastalarda sık görülür. Yapılan bir çalışmada, uzun süreli ve kontrolsüz diyabetiklerde, *Candida* kolonizasyonu sıklığının, diğer risk faktörleri olan ileri yaş ve antibiyotik kullanımı ile birlikte, normal popülasyona göre iki kat artmış olduğu saptanmıştır. Diğer mantar infeksiyonlarında olduğu gibi özefageal kandidiazisin de görülme sıklığı diyabetli hastalarda artmıştır [29].

Amfizematöz kolesistit

Amfizematöz kolesistit, diyabetik hastalar arasında sıklığı artan, ciddi bir biliyer sistem infeksiyonudur. Tüm amfizematöz kolesistit olgularının % 35'ini diyabetikler oluşturur. Genellikle polimikrobiyaldir. Mortalitesi % 15- 45 arasındadır [29].

2.1.2.c. Diyabetik hastalara yapılan girişimlere bağlı infeksiyonlar

Nozokomiyal infeksiyonlar

İnsulin kullanan ve kan şekeri takibi yapılan hastalarda insulin enjeksiyonu bölgesinde ve parmak ucunda yumuşak doku infeksiyonları görülebilir. Ancak bu sorunlar, geliştirilen yeni cihazlar ve tek kullanımlık insulin enjektörleri ile azalma eğilimindedir [6].

Diyabetik hastalarda gelişen nöropati komplikasyonu nedeniyle nörojenik mesane ve impotans sık görülür. Nörojenik mesane nedeniyle uygulanan idrar kateterizasyonu ve impotans nedeniyle uygulanan penil protezler de infeksiyona yatkınlık oluşturur. Penil protez infeksiyonu, implantasyonu takiben genellikle ilk iki haftada ortaya çıkar ve *S.epidermidis* en sık saptanan ajandır. Tedavi, protezin çıkarılması ve uygun antibiyotik başlanmasıdır [6].

Solid organ transplantasyonu (böbrek, kalp vs.) yapılan diyabetik hastalar diyabetik olmayanlarla kıyaslandığında, infeksiyon oranlarının yine daha yüksek olduğu görülmüştür [6].

Devamlı ambulator periton diyalizi, diyabetik nefropatiye bağlı kronik böbrek yetmezliği gelişen hastalarda giderek artan şekilde uygulanmaya başlanan bir tedavi yöntemidir ve periton diyaliz kateteri gerektirir. Ek olarak, hemodiyalize giren çoğu diyabetik böbrek hastasının da haftalar boyunca femoral kateteri bulunur. Tüm bu invaziv gereçler, infeksiyona predispozisyon yaratır. *S. aureus* en sık suçlanan ajandır ve genellikle kateterin çıkarılması gerekir.

Diyabetik hastalarda gelişen nozokomiyal infeksiyonlar konusundaki bilgilerin önemli bir kısmı, özellikle kardiyak cerrahi sonrası gelişen cerrahi alan infeksiyonlarından

oluşmaktadır. Cerrahi alan infeksiyonu gelişme riskinin diyabetik hastalarda anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [39].

Sepsiste sağkalım kılavuzunda da ciddi sepsisli hastalarda insülin tedavisi ile glikoz kontrolü önerilmektedir [63].

2.1.3. İnfeksiyonun ve antimikrobiklerin diyabet üzerine etkileri

İnfeksiyonlarda ve sepsiste strese bağlı hiperglisemi gelişmektedir. Sepsiste, kritik hastalığın yarattığı stres, anormal kortizol, norepinefrin, epinefrin, glukagon ve büyüme hormonu salınımı, pankreatik alfa reseptörlerin artmış aktivasyonu sonucu insülin salınımında baskılanma ve insülin salınımının TNF- α ve IL-1 β ile inhibe edilmesi sonucunda insülin salınımında azalma ile birlikte insülin direnci gelişir. Ancak, insülin direnci rol oynayan temel mekanizmadır. İnsülin salınımında azalmaya bağlı olarak, insülin düzeyleri hastalığın şiddetine göre normal veya düşüktür [64]. Kritik hastalarda yoğun insülin tedavisi ile mortalitenin ve kan dolaşımı infeksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir [65].

Kronik hepatit C infeksiyonu olan hastalarda DM ve insülin direnci prevalansının arttığı gösterilmiştir [66].

HIV/AIDS tedavisinde kullanılan antiretroviral ajanları içeren bazı rejimlerde (HAART) istenmeyen etkilerden biri de insülin direncine bağlı DM gelişimidir [67].

Sık kullanılan antibiyotikler olan florokinolonlar özellikle gatifloksasin, kan glikoz düzeylerinde bozukluklara (hipoglisemi ya da hiperglisemi) yol açabilir. Bunların dışında nalidiksik asit, izoniazid, pentamidin kan glikoz bozukluğuna yol açan diğer antimikrobiyallerdir. Uzun etkili sulfonamidler ve kloramfenikol gibi bazı antibiyotikler, tolbutamid ve klorpropamid gibi ilaçların hipoglisemik etkilerini arttırabilir.

Ayrıca penisilinler, sefalosporinler, sulfonamidlar, tetrasiklinler, izoniazid, streptomisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, nitrofurantoinin de içinde bulunduğu çok sayıda ilaç, yalancı glikozüriye neden olabilir.

2.1.4. Diyabetin antimikrobik tedaviye yanıt üzerine etkisi

Diyabetli hastalarda ilaçların emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı farklılık gösterebilir. Gastrointestinal problemlerin sık görülmesi, vagus sinirinin fonksiyon bozukluğu sonucu otonomik nöropatiye bağlı gelişen gastroparezi nedenleriyle, diyabetli hastalarda ilaç emilimi yetersiz kalabilir. Gastroparezi olmadan ortaya çıkan hiperglisemi de gastrik pH'ı arttırarak ve mide boşalmasını geciktirerek ilaç emilimini etkileyebilir. Diyabette mikrovasküler sistemde hem yapısal hem de fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Fonksiyonel değişiklikler kan akımında artış, intravasküler basıncın yükselmesi ve vasküler geçirgenliğin artışı iken, en önemli yapısal değişiklik bazal membran kalınlaşmasıdır.

Diyabette gelişen bazal membran bozukluğu sonucu gelişen mikroanjiyopati, diyabetik hastalarda antibiyotiklerin intramuskular yoldan yapılması durumunda emilimi bozabilmektedir. Diyabette gelişen kapiller geçirgenlikteki değişiklik sonucu ilaçların interstisiyel alana geçişi azalır; plazma proteinlerinin glikolizasyonu sonucu ilaçların proteinlere bağlanma oranlarında değişiklik ortaya çıkar; obezite nedeniyle mutlak yağ kitlesine bağlı olarak ilaçların dağılımı değişir. Diyabetik nefropati varlığında da ilaçların böbrekten atılımı etkilenir. Diyabetik proteinürisi bulunan ve serum kreatinin konsantrasyonu normal olan hastalarda gentamisin farmakokinetiğinin değerlendirildiği çalışmada, gentamisin dağılım hacminin ve yarılanma ömrünün arttığı ve klirensinin tahmin edilenden az olduğu görülmüştür [68]. Tüm bu mikro ve makroanjiopatik değişiklikler, endojen mediatörler ve proteine bağlanma oranlarındaki değişiklikler sonucu diyabetik hastalarda antimikrobik ilaçların etkileri değişiklik gösterir.

Diyabetik hastalarda nöropati ile birlikte diyabet komplikasyonlarından biri olan mikrovasküler hasar, doku perfüzyon bozukluğu ile sonuçlanır. Makrovasküler hasarın buna eklenmesi ile de dokuda iskemi gelişir. İskemi ve nekroz gelişen dokulara antibiyotiğin dokuya ulaşması azalır. Periferik tıkaçıcı arter hastalığı olan diyabet hastalarında antimikrobiyallerin dokuya ulaşmasının azaldığı gösterilmiştir [69].

Diyabette gelişen inflamasyon ve mikrovasküler değişiklikler sonucu inflamasyon bölgesinde ödem gelişir. Ödem, inflamasyon alanındaki hipoksiyi arttıran en önemli faktördür. Diyabetik hastalarda mevcut olan mikrovasküler ve makrovasküler fonksiyon bozukluğu ile birlikte hipoksinin birleşimi kısmen anaerobik bir mikroçevre oluşturur. İnflamatuvar yanıt katılan hücrelerin enerji elde etmek için glikoliz yapmaları sonucu değişen ortam oksijenasyonu ve pH'ı da ilaçların dağılım ve emilimini etkiler.

Diyabetli hastalarda antibiyotiklere yanıtın azalması ya da gecikmesi söz konusudur. Samaras ve ark. nın çalışmasında antitüberküloz tedaviye yanıtın geciktiği görülmüştür [67]. Tüberkülozlu diyabetik hastalarda ortalama rifampisin plazma düzeyi, diyabeti olmayan hastalara göre % 53 daha düşük saptanmıştır. Rifampisin C_{max} değeri olan $\geq 8\text{mg/L}$; diyabetik hastaların % 6'sında diyabetik olmayanların % 47'sinde sağlanmıştır [70]. Bu çalışmada, rifampisin etkisinin düşük olmasından diyabetik hastalardaki obezite, hiperglisemi ve düşük metabolizma hızı sorumlu tutulmuştur.

Sonuç olarak, infeksiyonların tanı ve tedavisinde konak faktörleri ve diyabet hastalığının seyri önemlidir. Altta yatan diğer hastalıkların ve medikasyonların tedaviyi etkileyebileceği unutulmamalıdır. Diyabetik hastalarda diyabetin neden olduğu komplikasyonlar, ilaç farmakokinetik ve farmakodinamiklerindeki değişiklikler, çoklu ilaç

kullanımı ve ilaç etkileşimleri, ilaç yan etkileri ve antibiyotik direnci antimikrobiyal tedavi yanıtını etkiler. Bu nedenle bu hastaların infeksiyöz patojenlere ve infeksiyon tedavisine verdikleri yanıtın diyabetik olmayan hastalardan farklılık gösterebileceği akıldan çıkarılmamalıdır [24].

2.2. Diyabetes mellitusta infeksiyonlara yatkınlık mekanizmaları:

Diyabetes mellituslu hastalarda infeksiyonlara karşı duyarlılık artmıştır. Yapılan çalışmalarda bu durumdan özellikle nötrofil fonksiyonlarının bozulması sorumlu tutulmaktadır. Nötrofil fonksiyonlarındaki bozukluklar, değişik mekanizmalarla gerçekleşir. Bunlar, endotel tabakasına olan adhezyon, inflamasyon alanına yönelik migrasyon kapasitesi, kemotaksis, bakterisidal aktivite ve fagositoz aktivitelerindeki değişikliklerle birlikte reaktif oksijen metabolitlerinin üretiminden kaynaklanır. Bunun dışında, nötrofillerin lizozomal enzimlerinin salınımında da azalma meydana gelir.

Dünya Sağlık Örgütü diyabeti sekonder immun yetmezlikler içinde sınıflamıştır. Bu immünyetmezlik gelişimi, nötrofil lökosit ve/veya lenfosit aktivitesindeki değişiklikleri kapsar. Nötrofil lökositler, bakteriyel ajanlara karşı konağın ilk savunma bariyerini oluşturur. Diyabetik hastalarda kemotaksis, fagositoz, immünglobulin üretimi ve kompleman fonksiyonlarında bozukluk gözlenir [6].

Diğer bozukluklar arasında, gelişen inflamasyonda histamin ve bradikinin gibi inflamatuvar mediatörlerin mikrovasküler yanıtının azalması, ödem formasyonu ve mast hücre degranülasyonunun azalması, nötrofillerde adhezyon ve inflamasyon alanına migrasyon bozukluğu, nötrofiller tarafından üretilen sitokin ve prostoglandin düzeylerinde azalma, reaktif oksijen ürünlerinde artış, lökosit apoptozunda artış ve lenf nodu kapasitesinde azalmalar sayılabilir. Diyabetik hastalarda gelişen endotel fonksiyon bozukluğunun da infeksiyonlar ile yakın ilişkisi vardır. Diyabette gelişen endotel fonksiyon bozukluğu, eşlik eden immun sistem bozuklukları ile birlikte diyabetik hastalarda infeksiyona yatkınlığın temelini oluşturur.

2.2.1. Diyabetes mellitusta endotel fonksiyon bozuklukları

Endotel, damar sistemi içinde yer alır. Doku ve kan arasında madde alışverişi, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit migrasyon ve kemotaksisi ile fibrinolitik aktivitenin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda rolü vardır.

Prostosiklin I_2 (PGI_2) ve Nitrik Oksit (NO) endotelin vasküler tonusunda görevli iki ana vazodilatatördür. Vazodilatasyonda yer alan diğer endotel kaynaklı mediatörler, endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör ve C-tipi natriüretik faktördür [71]. NO ve PGI_2 sırasıyla

guanil siklaz ve adenil siklaz aktivitesini arttırır. Bunun sonucunda oluşan siklik guanozin 3', 5'- monofosfat (cGMP) vazodilatasyona neden olur [72,73].

NO birçok dokudan salınabilir. Vazodilatatör etkisinin yanında anti-inflamatuar, anti-proliferatif, anti-oksidan ve anti-trombositik etkiye sahiptir [74]. Vazodilatasyon yaparak kan akımını hızlandırır ve damar elastikiyetini arttırır. NFκ-B' nin aktivitesini azaltarak adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltır ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) , IL-6, IL-8, makrofaj koloni uyarıcı faktör (MCSF) gibi pro-inflamatuar mediatörlerin salınımını azaltarak anti-inflamatuar etki gösterir. Bunların yanında, endotelin-1 (ET-1), anjiotensin II (Ang II), tromboksan A₂ ve reaktif oksijen türleri (ROS), direkt veya NO sentezini bozarak vazokonstriksiyona neden olurlar [75-77]. Vasküler tonus bu mediatörler aracılığı ile bir denge halinde devam eder.

Endotel tarafından sentezlenen NO, cGMP yoluyla anti-trombotik etki gösterir. Bunun dışında, trombomodulin bir yandan trombine bağlanarak fibrinojenin fibrine dönüşümünü, diğer yandan aktive protein C aktivasyonu ile endotel yüzeyindeki fibrin oluşumunu ve koagulasyonu engeller [78]. Diğer yandan endotel, doku plazminojen aktivatörü (tPA) salgılayarak plazmini aktive eder. Bu da fibrinoliz ile endotel yüzeyinde fibrini azaltır. Böylelikle perfüzyonun ve vasküler açıklıkların devamlılığı sağlanır. Yine endotelden salgılanan plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) tPA'yı inhibe ederek anti-fibrinolitik etki gösterir. Normal endotel fonksiyonu varlığında koagulasyon ve fibrinoliz olayları denge halinde devam eder.

Vasküler endotel hücrelerle nötrofil etkileşimi, enfeksiyona karşı gelişecek akut inflammatuar yanıtta merkezi öneme sahiptir. Bu ilişki, integrinler, immünoglobülin süper ailesi ve selektinler adı verilen üç önemli adhezyon molekülü tarafından yönlendirilir. Bunlar, nötrofil adhezyonunda ve endotel hücre tabakası boyunca migrasyonun çeşitli basamaklarında rol oynar [77,79]. Nötrofiller endotel hücre duvarından geçerek inflamasyon bölgesine ulaşınca kadar sırasıyla marjinasyon, yuvarlanma, nötrofil aktivasyonu, adhezyon, diyapedez ve transendotelyal migrasyon aşamalarını geçerler. Enfeksiyon sonucu gelişen inflammatuar yanıt da dokudan histamin, trombin, oksidanlar, lökotrienler, sitokinler (özellikle IL-1 ve TNF-α gibi proinflammatuar sitokinler) ve infektif ajanın türüne göre lipopolisakkaritlerin ortama salınmasına neden olur [79]. İnflamasyon bölgesinde ilk olarak damar endotelinin uyarılması gerçekleşir. Bunun sonucunda, lökositler inflamasyon bölgesine toplanır. Lökositlerin adhezyon ve migrasyonu üç basamakta gerçekleşir [77,79].

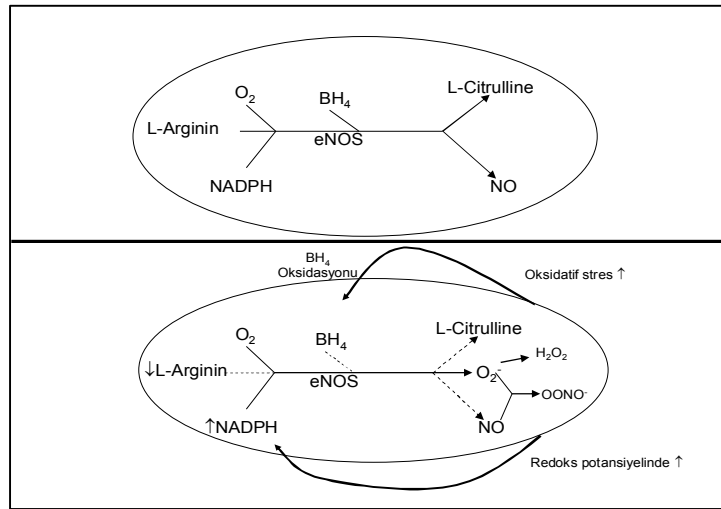
1. basamak: Selektine bağlı yuvarlanma basamağıdır. Doku hasarı ve belirli sitokinler aracılığıyla endotel, P ve E selektin eksprese etmek üzere uyarılır. Endotel yüzeyinde E ve P

selektin, L selektinin ligandının ve sitokinlerin eksprese edilmeleri ile lökosit aktivasyonu başlar. Bu ekspresyon sonucunda lökositlerde yapısal olarak bulunan L selektin ve E ve P selektin ligandlarının, uyarılmış endoteli tanımasıyla lökosit ile endotel arasında ilişki kurulur. Nötrofiller yavaşlayarak o bölgede daha sonraki basamakta oluşacak sıkı adhezyona ve inflamasyon için gerekli sitokinlerin artışına hazırlanır.

2. basamak: Aktivasyon basamağıdır. Burada integrinler rol oynar. IL-1, IL-8 ve TNF- α β_2 -integrin gibi mediatörler görev alır.

3. basamak: Sıkı adhezyon ve migrasyon basamağıdır. Intercellular adhesion molecules (ICAM) 'lar ile birlikte integrinler rol alır. Bağlanma sonucunda hem lökosit hem de endotelden salınan diğer adhezyon molekülleri eksprese edilir ve sıkı bağlanma oluşur. ICAM-1 ekspresyonunun artması, adhezyonu güçlendirir. Kan akımının yavaşlaması ile nötrofil akümüasyonu başlar. İnflamasyonun başladığı dokuda endotel, makrofaj ve mikroorganizma ürünlerinden oluşan kemotaktik ajanların çekim gücü ile nötrofil, endoteller arasından kayarak inflamasyon alanına ulaşır ve migrasyon gerçekleşir [77].

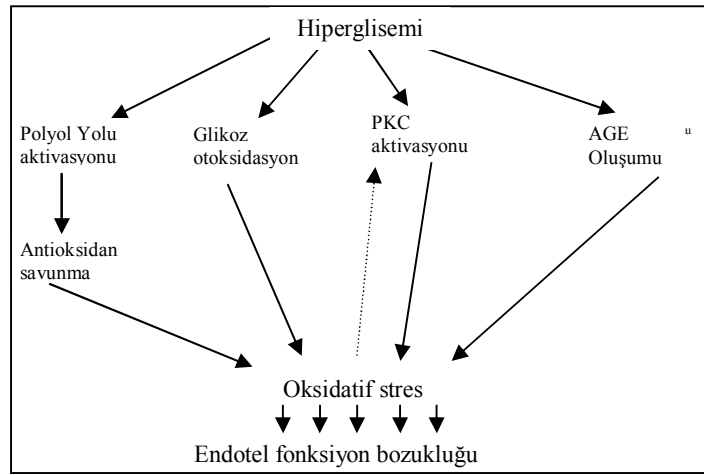
Diyabette endotel fonksiyon bozukluğu diyabetik vaskülopatinin ilk bulgusudur ve öncelikle vasküler tonüs ve fibrinolitik aktivitenin bozulmasıyla karakterize, endotelial perfüzyon bozukluğu ve enflamasyonun eşlik ettiği tablodur. Vazodilatatör ve vazokonstriktörler arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkar.



Sekil 1: NO sentezi ve diyabette bozulan yollar

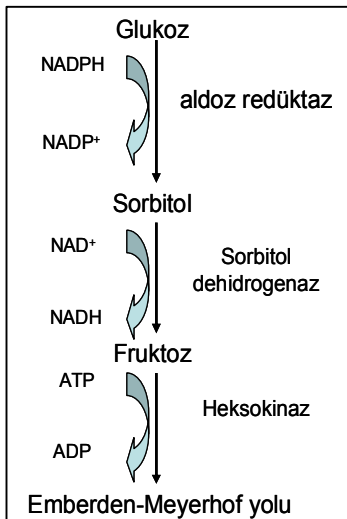
İnsülinin, NO ekspresyonunu arttırırken, E selektin, intersellüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) konsantrasyonunu ve ROS oluşumunu baskıladığı [80-82], Tip 2 diyabetli hastalarda bir yıllık insülin tedavisi ile E selektin konsantrasyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir [83]. Bu nedenle insülin salınımının azalması diyabette oluşan endotel fonksiyon bozukluğuna neden olabilir.

Endotel disfonksiyonu sonucu endotel kaynaklı NO sentezi azalır. Sonucunda NO'nın anti-inflamatuar, anti-agregan, vazodilatatör ve anormal büyümenin inhibisyonu etkileri ortadan kalkar. Normalde NO, eNOS, tetrahidrobioptin (BH₄), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve oksijenin L-arginine katılmasıyla oluşur. Diyabetli hastalarda NADH/NADPH artışı sonucu ortaya çıkan oksidasyon ile BH₄'in sentezde kullanımı, buna bağlı olarak da NO sentezi azalır. NO sentezinin azalması yanında, endotel disfonksiyonu sonucu endotelde üretimi artan ROS da, ortamdaki NO inaktivasyonuna neden olur [84]. Sonuç olarak, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu giderek artar. Kısaca; diyabetteki endotel fonksiyon bozukluğunun başlangıcında, eNOS aktivitesi, mitokondrial oksidatif fosforilasyonun serbest kalması ve vasküler NADPH oksidazın aktivasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir.



Şekil 2: Hipergliseminin oluşturduğu endotel fonksiyon bozukluğu

Diyabette komplikasyonların başlıca sorumlusu hiperglisemidir. Hiperglisemi hücre içi metabolizmada akut değişikliklere (polyol yolun aktivasyonu, diaçilgliserol-protein kinaz-C (PKC) aktivasyonu, glikoz otoaktivasyonu) ve makromoleküllerin fonksiyon ve yapılarını değiştiren ileri glikolizasyon ürünlerinin (advanced glycation end-products= AGEs) oluşumuna neden olur.



Hücresinin kullanımdan sonra kalan glukoz varlığında polyol (sorbitol-aldoz redüktaz) yolu devreye girer. Fazla glukoz, aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole, sorbitol, sorbitol dehidrogenaz ile fruktoza katalizlenir.

Şekil 3: Polyol (aldoz redüktaz) yolu

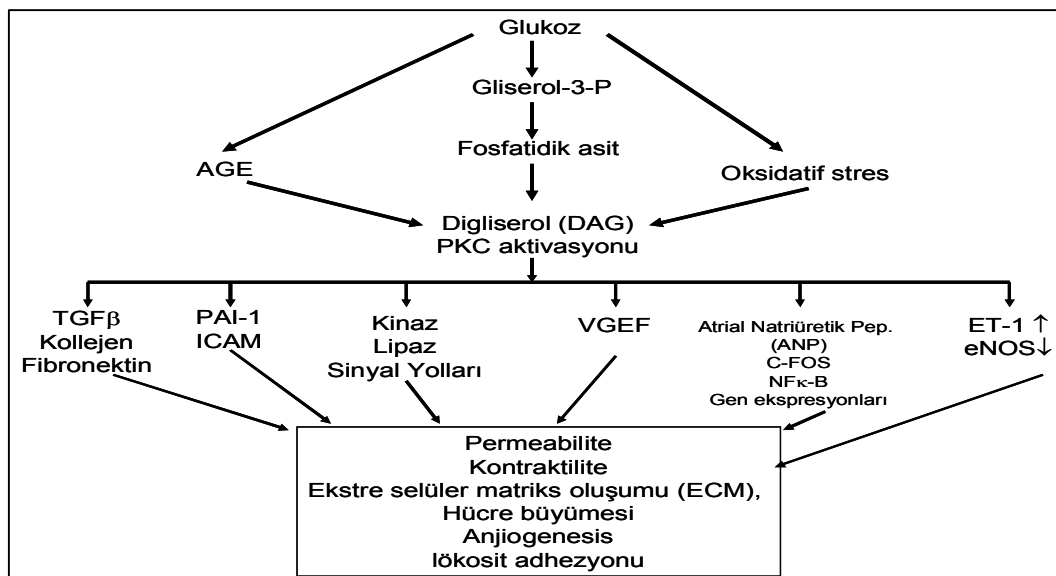
Bu yolda, NADPH'nin aldoz redüktaz ile NADP^+ ya oksidasyonu olur. Sorbitolun fruktoza dönüşümü, NAD^+ den NADH oluşumunu artırır.

Sonuçta NADPH ve okside olmuş NAD^+ da bir azalma olur. Bu yol diyabetli hastalarda nefropati, nöropati, retina ve endotel fonksiyon bozukluğu patolojilerinde önemli rol oynar [85].

Bu maddeler redoks reaksiyonu için birer kofaktör olduğu için, azalmaları durumunda indirgenmiş glutatyon, NO (endotel fonksiyonu), miyo-inositol(sinir-doku) ve taurin sentezi de azalır. Azalan NADPH yapımı nedeniyle azalan NO yapımı ve artan oksidatif stres ROS oluşumunu artırır.

Hiperglisemi sonucu hücre içine giren kullanılamayan glikoz sonuçta permeabilite, kontraktilite, ekstraselüler matriks yapımı, hücre gelişimi, angiogenez, sitokin etkileşimi ve lökosit adhezyonu üzerine etki ederek diyabette görülen tüm endotel fonksiyon bozukluklarına neden olabilir [86,87]. AGEs, glikozun protein veya lipidlerin amino gruplarına enzimatik olmayan bir mekanizma ile bağlanması sonucu oluşurlar. Bu nedenle hiperglisemi durumlarında yoğun olarak ortaya çıkarlar. AGEs bir yandan oksidatif stres ile ROS oluşturarak NO oluşumunu engellerken [88]; diğer yandan IL-6, VCAM-1 ve MCP-1 ekspresyonunu düzenleyerek vasküler inflamasyonun oluşumuna neden olur [89].

Diyabetli hastalarda, bozulan yağ metabolizması sonucu artan yağ asitleri de sitozolik redoks potansiyelini NADH ve gliserol -3- fosfat üzerinden arttırarak, superoksit radikallerinin ve oksidatif stresin artmasına, dolayısıyla endotel fonksiyon bozukluğuna neden olur.



Şekil 4: Fosfokinaz C aktivasyonu

Diyabette bozulan glikoz metabolizması, lipid metabolizmasının da bozulmasına ve obeziteye neden olur. Bu durumda adipositler ve hiperlipideminin de etkisiyle, diyabetik hastalarda endotel fonksiyon bozuklukları ve insülin reseptörü üzerinden insülin direnci gelişir. Diyabetik hastalarda endotel fonksiyon bozukluğuna eşlik eden fibroblast, epitel, keratinosit ve makrofaj fonksiyon bozuklukları yara iyileşmesinde rol oynayan mediatörlerin salınımını bozarak yara iyileşmesi üzerine negatif etki oluşturur.

Diyabetli hastalarda değişen metabolizma ile beraberinde görülen obezite, adipositler üzerinden endotel fonksiyon bozukluğuna neden olabilir. Adipositlerin TNF- α , C-reaktif protein (CRP), IL-6 ve plazminojen aktivatörü inhibitörü (PAI-1) salgıladıkları ve TNF- α nın insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir. TNF- α , İnsülin Reseptöründe (IR) serin fosforilasyonunu indüklerken tirozin fosforilasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon, insülin yanıtını ve NO sentezini bozarak endotel fonksiyon bozulmasına neden olur [90]. Böylece, adipositler insülin reseptörü üzerinden insülin direnci ve kronik inflamasyon sonucu endotel disfonksiyonu gelişmesine yol açarlar.

Kısaca diyabette vasküler endoteldeki değişiklikler sonucu oluşan endotel disfonksiyonu,

- 1-) Ang-II ve ET-1 gibi vazokonstriktörlerin plazma seviyelerinin artışı,
- 2-) Trombosit ve lökositlerin, artan adhezyon molekül ekspresyonu sonucu vasküler endotele adheranslarının artması ve
- 3-) NO salınımının azalması ve endotel cevabının bozulması ile karakterizedir.

Bunun sonucunda, vasküler tonusta ve inflamasyonda artış, doku perfüzyonunun bozulması ve iskemi ortaya çıkar.

Diyabetik hastalarda önemli bir sorun olan ve endotel ile ilişkili diğer bir patoloji ise yara iyileşmesindeki gecikmedir. Sağlıklı insanlarda yaralanma sonucunda oluşan hipoksi, makrofaj, fibroblast ve epitelyal hücrelerden vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) salınımına neden olur. VEGF fosforilasyonu uyararak kemik iliğinde eNOS aktivasyonuna ve eNOS da NO artışına neden olur [91]. Artan NO kemik iliğinden endotel progenitor hücrelerin (EPC) salınmasını sağlar. Yara bölgesinde oluşan iskemi aynı zamanda stromal hücrelerden oluşan faktör-1 (Stromal cell-derived factor 1=SDF-1) salınımına neden olur [92]. SDF-1 kemik iliğinden salınan EPC'lerin yara bölgesine yönlendirmelerini ve toplanmalarını sağlayarak yara iyileşmesini ve yeni vaskulogenezisi sağlar. Diyabetik hastalarda, kemik iliğinde eNOS üretiminin ve NO yapımının azaldığı ve buna bağlı olarak da EPC in kemik iliğinden mobilizasyonunun zayıfladığı gösterilmiştir [92].

Sonuç olarak; diyabetik süreç, lökositlerin kapiller endotele yapışmasının azaldığı, kemotaksisin, fibroblast apoptozunun bozulduğu, nötrofil hücrelerin fagositoz işlevinin azaldığı, periferik nöropati ve damar yapılarına bağlı beslenme bozukluklarının izlendiği çok etkenli bir etyopatolojidir. Diyabetli hastalarda bozulan endotel fonksiyonu, diyabetin ileri evrelerinde ciddi problemler oluşturabilen kardiyovasküler, renal ve infeksiyöz komplikasyonlar için en önemli faktördür.

Özetle, tüm bu basamakların herhangi bir noktasında yetersizliğin olması konağın mikroorganizmaya karşı geliştirdiği savunma sisteminin ilk basamağının çalışmamasına yol açar. Diyabetik süreçteki bakteriyel adherans ve bakteri-endotel ilişkisi, ileri araştırma ve sağaltım çalışmalarını gerekli kılar. Diyabetik hastaların sağaltımı açısından endotel fonksiyon bozukluklarının önlenmesi ve düzeltilmesi üzerine yeni stratejiler geliştirilmelidir.

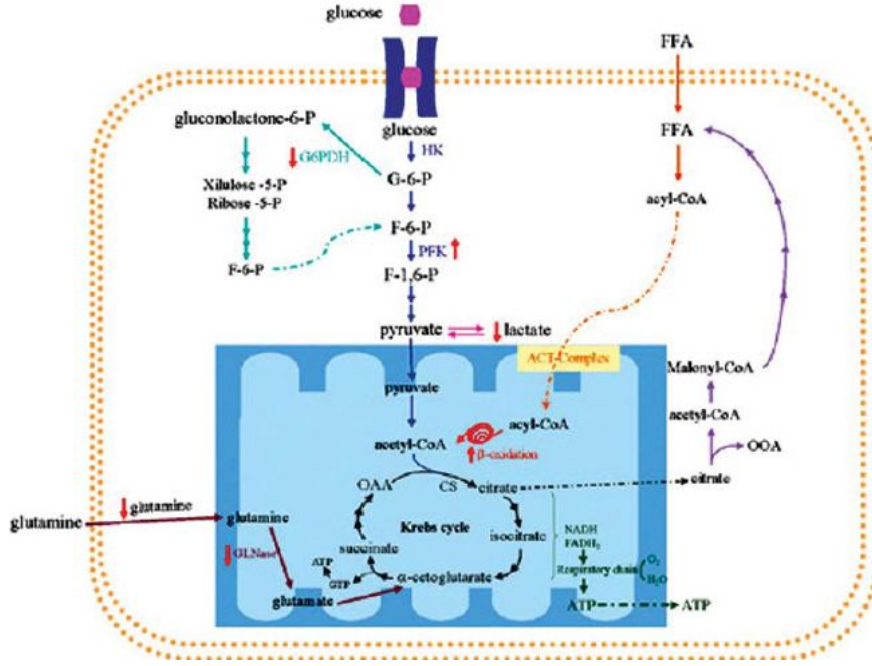
2.2.2. Diyabetes mellitusta immun sistem bozuklukları

Diyabetli hastalarda gelişen hiperglisemi, nötrofil ve makrofaj fonksiyonlarını bozar. Kemotaksi, fagositoz, adherans ve mikroorganizmaların hücre içi öldürülmesi gibi fonksiyonlarda bozulma görülür. İyi kontrol altındaki diyabetik hastalarda konak direncinde enfeksiyona eğilimi arttıracak devamlı bir bozukluk saptanmamıştır. Kötü kontrollü diyabetik hastalardaki lökosit fonksiyon bozukluklarının ise iyi kontrol ve insülin tedavisi ile düzeldiği görülmüştür [1].

Nötrofil lökositler bakteriyel ajanlara karşı konağın ilk savunma bariyerini oluşturur. Bu hücreler kemotaksi, adherans, endositoz ve hücre içi öldürme fonksiyonlarına sahiptir. Diyabette nötrofillerin inflamasyon, endotel adhezyonu, inflamasyon bölgesine migrasyon, opsonik aktivite, kemotaksis, bakterisidal aktivite, fagositoz ve reaktif oksijen türlerinin üretimi fonksiyonları bozulur [93].

Nötrofiller, fonksiyonlarını yerine getirebilmek için enerjiye gereksinim duyarlar. Bu enerji % 90-95 oranında glikozun laktata dönüşümü sırasında % 3 oranında Krebs siklusunda glikoz oksidasyonu ile ve ayrıca glutaminin aspartat, laktat, glutamat ve karbondioksit dönüştürülmesi ile sağlanır. Uyarılan nötrofillerin metabolik aktivitesindeki artış, fagositoz sırasında lökosit glikojen konsantrasyonlarında azalma, oksijen, glikoz kullanımı ve laktat şeklinde ortaya çıkar. Glikozun normal metabolizması heksoz monofosfat (HMP) şantı yoluyla olur. Diyabette glikolik ve glutaminolitik yolda bozulmalar, nitrik oksit-siklik guanozin 3'-5' monofosfat yolu aktivasyonu, polyol yolu ile glikoz ve keton cisim artışı, glikoliz ve glikojen sentezinde azalma, insülin eksikliği nedeniyle HMP yolunda aksamalar, düşük antijen yanıtı mekanizmaları ile nötrofil fonksiyonlarında bozukluk gelişir. Polyol yolu

ile laktat üretimi azalır, fosfofruktokinaz üretimi artar, fruktoz-6-fosfat ve fruktoz 2,6 bifosfat aktiviteleri sonucunda nötrofil fonksiyonlarını etkiler.

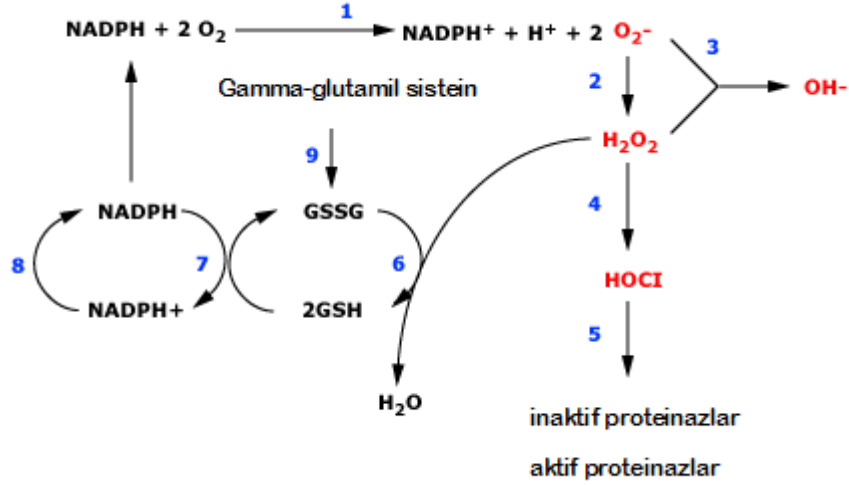


Şekil 5: Glikozun oksidatif fosforilasyonu

Nötrofillerde fagositoz sırasında fagozom ve lizozom birleşmesi olur, lizozom enzimleri mikroorganizmaları öldürür. Uyarılan nötrofillerde oksidatif bir patlama meydana gelir. Bu patlama sonucunda bakterilerin öldürülmesine katılan superoksit anyonları ve diğer oksijen metabolitleri üretilir. Superoksit anyon (O_2^-) NADPH oksidaz yoluyla oksijenden katalizlenir, spontan olarak ya da superoksit dismutaz enzimi yoluyla H_2O_2 'ye ve bu da nötrofil granullerinden myeloperoksidaz salınımı sonucu hipoklorik aside dönüşür. Hiperglisemiden kaynaklanan serbest oksijen radikallerindeki artış protein glikolizasyonunda artışa, bu da siklik GMP artışı üzerinden NO sentetaz aktivitesinde artışa neden olur [94]. Bu gibi serbest radikaller intrasellüler öldürme için gereklidir.

Oksidatif patlama, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'a bağımlıdır. Polyol yolunda da NADPH kullanılır. Polyol yoluna giren glikoz ve keton cismi arttıkça NADPH gereksinimi de artar ve diyabetiklerde intrasellüler öldürme için gerekli NADPH azaldığı için bu fonksiyonlarda da azalma görülür [23].

Sonuç olarak; diyabetik hastalarda NADPH oksidaz aktivitesi yetersizdir ve superoksit anyon düzeyi de azalmıştır [95].



Şekil 6: Nötrofil kaynaklı solunumsal patlama döngüsü [96]

(1.NADPH oksidaz, 2.süperoksit dismutaz, 3.nonenzimatik Fe² (Haber-weiss reaksiyonu), 4.miyeloperoksidaz, 5.spontan reaksiyon 6.glutatyon peroksidaz, 7. glutatyon redüktaz, 8. G6PD, 9. glutatyon sentetaz)

Diyabetik hastaların pek çoğunda nötrofil lökositlerde kemotaksi de bozulur. Kapiller bazal membrandaki kalınlaşma, lökositlerin bakteri invazyonu olan bölgeye çıkmasını ve bu bölgeye ulaşmayı başarmış olan lökositlere yeterli glikoz ve insulin sağlanmasını engeller. Diyabetiklerde kompleman komponentlerinin miktar ve aktivitelerinde azalma nedeniyle direkt ve indirekt kompleman yolunda bozukluklar gözlenir. İndirekt kompleman yolunda bozukluk, C₅ aktivasyonuna bağlı degranülasyon bozukluğu, intravasküler kompleman artışı ve kemotaksis fonksiyon bozukluğuna neden olur. Enzimatik olmayan protein katabolizması, keton cisimlerinde, katalizasyon ürünlerinde ve HbA1C'deki artış, nötrofil membran akışkanlığı ve migrasyon bozukluğu ile sonuçlanır [97]. Özetle; nötrofillerin mobilizasyon, kemotaksi ve degranulasyon fonksiyonları olumsuz etkilenir.

Bunların dışında diyabet hastalarının hücrel ve humoral bağışıklık yanıtları da bozuktur. Hücrel bağışıklıkta bozulma, mantar ve diğer alışılmamış infeksiyon etkenleri ile infeksiyonlara duyarlılıkta artışa neden olur [93]. Az sayıda diyabetik hastalarda yapılan lenfosit çalışmalarında, tip 1 diyabette bazı lenfosit alt gruplarında da değişiklikler saptanmıştır. T lenfositlerin toplam sayısında ve spesifik CD₄ fenotipinde azalma, bunun sonucunda da CD₄/CD₈ oranında düşme görülür [23]. Bu hastalarda IgA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur [98]. İn vivo immunizasyon sonrası aşuya spesifik antikor yanıtı normaldir [99]. Ancak uzun süredir tip 1 diyabeti olanlarda hepatit B aşısına antikor yanıtı

zayıf bulunmuştur. [50]. Bu olay, makrofajların antijenleri yeterince tanıyamamasına bağlı olabilir.

İnsulin kullanımı ile hücre içi glikojen sentezi artar; glikoz kullanımı, glikojen sentezi, laktat artar. Serbest oksijen (O_2) radikallerinde azalma, sonuçta migrasyon kapasitesinde artış ve nötrofilik fagositik indekste artış olur [100]. Bu durum da glikoz bağımlı nötrofil migrasyonu için insuline gereksinim duyulduğunu gösterir [101]. Hipergliseminin obez farelerde, nötrofillerin intra ve ekstravasküler kemokinetik aktivasyonunu arttırdığı görülmüştür [102]. Ancak yapılan bazı çalışmalarda hiperinsulineminin normal insan nötrofillerinde in vitro olarak opsonize edilen hedeflerin fagositozunu inhibe edebildiği, insulinin bu etkisinin de fagositoz için gerekli F-aktin dağılımını düzenleyen PKC α ve/ve ya PKC β sinyallerinin aktivasyonuna bağlı olabileceği saptanmıştır [103].

2.3. Biyofilm oluşumu:

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve kendisini oluşturan mikroorganizmaların içinde gömülü bulunan, ekstrasellüler polimerik polisakkarid matriks yapısıdır [104]. Biyofilmlerin varlığı derin yer altı suları ve okyanusun derinlikleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır. 1930'lu yıllardan bu yana yoğun olarak araştırılan biyofilm tabakası başlıca endüstri, gıda sağlık olmak üzere birçok sektörde problem olmaktadır. Enfeksiyon hastalıkları ile biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında kuvvetli bir ilişki vardır [7]. Bu mikroorganizmalar endokardit, periodontit, kistik fibrosis, osteomyelit, otitis media gibi hastalıklardan sorumludur [104].

Biyofilmler, hidrate bir matriks içine gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı, yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklardır [12]. Bakterinin yüzeyinde düzensiz şekilde dağılmış olarak bulunurlar. Bakteriler tercihan olumsuz ortamlarda strese yanıt olarak biyofilm yaparlar [17]. Bakterilerin deneysel uzay yolcuğu sırasında dahi düşük basınçlı ortama stres yanıtı olarak biyofilm oluşturduğu saptanmıştır [105, 106]. Biyofilmler bakterileri, nem, ısı, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi değişimlerin doğuracağı zararlardan korurlar [107]. Ayrıca, besinlerin depolanmasını, atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırırlar. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immun sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşması engellenmiş olur [8].

Biyofilm içinde yaşamak mikroorganizma için avantajlıdır. Öncelikle matriks, hem fiziksel güçlere hem de kimyasal saldırılara karşı (hidrojen peroksit ve klorin gibi) koruyucu

bir bariyer sağlar [108]. Biyofilm içindeki bakteri, birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye dirençlidir ve fagositoza direnç göstererek immun sistemden kaçır [13-15]. Bu nedenle kronik biyofilm enfeksiyonları antibiyotiklere, antikor ve fagositler gibi konakçı temizleme mekanizmalarına dirençlidir [11,109]. Bundan başka, matriks küçük moleküllerin biyofilm dışına difüzyonunu yavaşlatır, metabolik değişim için uygun ortam hazırlar. Bu dönüşüm, farklı nutrisyonel gereksinimlere sahip birçok tür ya da suşun biyofilm içinde bir arada olmasına izin verir [12,110].

Tüm biyofilmlerin büyük bölümü (% 73-98) hidrate şekildedir [111]. Matriks içindeki diğer bileşenler ise % 1-2 ekzopolisakkarit, % 1-2 globüler glikoproteinler ve diğer proteinler, % 1-2 nükleik asit, lipid ve fosfolipitlerdir. Polisakkarit, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve sudan oluşan ekstrasellüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmalarını sağlar. Yüzeye iyice tutunan bakteri burada çoğalır. Ekzopolisakkarit üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu, biyofilm oluşumunun göstergesidir. EPS, jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilir. Böylece biyofilm yapısı protein, kalsiyum iyonları, polisakkaritler ile daha da sağlamlaşır [7]. Biyofilm oluşumu sonrası sesil hücreler tarafından sentezlenen ekzopolisakkarit matriks, biyofilme viskoelastik bir yapı kazandırır. Bakterilerin uygun koşullarının olduğu ortamlarda oluşturdukları biyofilmler kırılğan bir yapıya sahipken, uygun olmayan koşullarda ürettikleri biyofilmlerin viskozitelerinin arttığı ve mekanik kırılmalara dayanıklı oldukları gösterilmiştir [11].

Biyofilmin yapısı saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Polisakkarit yapıdaki bu matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda etrafındaki akış oranı, farklı türlerin sayı ve tipine bağlı olarak değişiklik gösterir [7].

Biyofilm oluşumu için gerekli olan bakteriyel bileşenlerin üretimi çeşitli genler tarafından kontrol edilir [18]. Bu da biyofilm oluşumunun spesifik genler tarafından düzenlendiğinin en önemli göstergesidir [112]. Biyofilm oluşumunda genlerin rolü en iyi *P. aeruginosa*' da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Davy ve O'Toole *P. aeruginosa*' da biyofilm yapımının *LASr*, *rHLr*, *gACa*, *rPOs*, *Crc* ve *PvrR* gibi düzenleyiciler aracılığı ile kontrol edildiğini belirtmişlerdir [113]. Biyofilm oluşumunda gerekli bir diğer gen olarak tanımlanan *PA3701*'nin de bir alkol dehidrogenaz ya da oksidoredüktaz enzimini kodladığı düşünülmektedir [18]. Son zamanlarda *P.aeruginosa*' da biyofilm yapımı için gerekli alginik asit sentezinin de *algACD* gen kümesi tarafından kodlandığı üzerine çalışmalar mevcuttur [108,114]. *E. coli*' de de kolanik asit sentezinde görevli *csgA* geni tanımlanmıştır [107]. Bu genlerin ekspresyonu farklı çevresel uyaranlardan

etkilenir ve *ompR* ve *rpo S* tarafından düzenlenir [115]. *E. coli* 'nin besin azlığı, osmotik stres, asidik ortam, ısı, oksidatif DNA hasarı gibi stres faktörlerine olan hücresel cevabı *rpoS* tarafından kodlanan sigma faktörünün kontrol ettiği genler ile sağlanır.

2.3.1. Bakteriler neden biyofilm oluştururlar?

2.3.1.a. Savunma: Biyofilm oluşumunda strese yanıt

Biyofilmler, kan akımı ve salgıların yıkayıcı etkisi tarafından oluşturulan gerilme kuvvetleri gibi fiziksel kuvvetlere dirençlidir. Biyofilm içindeki organizmalar besinsel eksikliklere, pH değişikliklerine, oksijen radikallerine, dezenfektan, antibiyotik gibi antimikrobiyalere ve fagositoza karşı koymada planktonik hücrelerden daha başarılıdır. Mikroorganizmanın karbonhidrattan zengin polimerler (kapsüler polisakkaritler ve ekzopolisakkaritler) içeren matriks yapısı biyofilm oluşumu için çok önemlidir [112]. Biyofilm yapısındaki çoğu ekstrasellüler polisakkarit, suda çözebilir özellikte değildir ve hücrelerden kolay ayrılamazlar. Bu da EPS içeren yapışkan matriks yapısı ile birlikte biyofilmin direncini artırır [107,112]. Agregasyon ve biyofilm yapısındaki rolü nedeniyle EPS, bakteriyi gerilim oluşturan güçlerden ve inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korur [111].

2.3.1.b. Adhezyon ve kolonizasyon:

Bakteri, yaşamak ve gelişmek için gerekli besin, su, O₂ ve ısı gibi ihtiyaçları diğer bir hücre üzerinden temin etmek, bu nedenle de hücreye tutunmak zorundadır.

Bakteriler vücutta kalmak için birçok farklı mekanizmaya sahiptirler. Konağın ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanan bakteriyel yüzey proteinleri (fibronektin, fibrinojen, vitronektin ve elastin), mikrobial yüzey komponentini tanıyan adheziv matriks molekülleri (MSCRAMM) olarak tanımlanır ve bakterinin konakçıdaki solid yüzeylere adheransında anahtar rol oynar [112,116]. Bu adherans sonrası çoğalan mikroorganizmalar, yapıştıkları yüzeyde koloni oluştururlar. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni) aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Böylece büyüyen ve çoğalan bakterilerin oluşturduğu biyofilm tabakasında da genişleme gözlenir. Buna karşın, biyofilm oluştuğunda, bakteri popülasyonunda adhezin ve motilite faktörlerinin salınımı baskılanır. Bu durum, adhezin, pili ve flajellaların başlangıçtaki bağlanmada esas rolü oynadığını ve biyofilm geliştiğinde proteinlerin ekspresyonunun inhibe olduğunu düşündürmektedir [107].

2.3.1.c. Yaşanabilir çevre geliştirme:

Ortamdaki glikozun bakteriler tarafından kullanılabilir olması, mikroorganizma tarafından eksprese edilen EPS ve biyofilm miktarını artırır. Karbon katabolitleri, konakta

yapışmış bakterinin gen düzenlenmesini uyarak biyofilm oluşumunu indükler. Bu sayede bakteri konakta uygun ortam oluşturarak kendisi için yaşanabilir çevre geliştirmeye çalışır [117].

2.3.1.d.Topluluk Oluşturmak:

Bakterilerin ortama adaptasyonu sırasında sergiledikleri ortak tutum, biyofilm oluşumu sırasında da gözlenir. Bakterilerin biyofilm oluşumu ya da uygun uyaranlar altında serbest hale geçmeleri, ortama uygun olarak sundukları genler aracılığıyla olur. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu halde yaşamlarının bir göstergesidir [10].

2.3.2. Bakteriler nasıl biyofilm oluşturur?

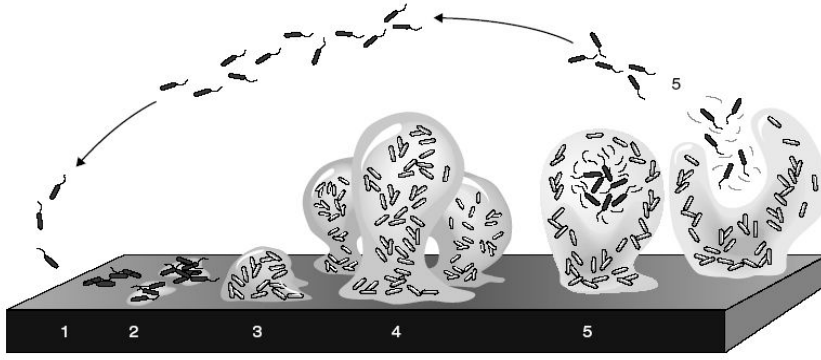
Mikroorganizmalar ökaryot hücreye adherans sonrasında uygunsuz koşullar (nem, ısı, pH değişiklikleri, besin eksikliği, oksijen radikalleri, dezenfektanlar vs.) altında algıladığı tehditler sonucunda, bir seri genin aktivasyonunu sağlayarak biyofilm oluştururlar. Bu genler sadece biyofilm oluşturmada değil, adhezyonun indüksiyon / inhibisyon, quorum sensing, hücre duvar yapımı, metabolizma olaylarında da etkilidirler. Bu genler yapısal olarak var olabildiği gibi diğer mikroorganizmalar tarafından da aktarılma özelliğine sahiptirler ve bir kısmı biyofilm oluşumunu arttırırken bir kısmı da azaltırlar.

2.3.3. Biyofilm gelişim aşamaları:

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir [111]. Biyofilm oluşumu, mikroorganizmanın bir yüzey ile karşılaştığında genetik olarak belirlenmiş bir seri süreci izlemesi sonucu gelişir. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi, birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur [118].

Bakteri yüzeyle karşılaştığında ilk olarak güçsüz ve geçici bir bağlanma oluşur. Fizikokimyasal koşullar uygun ise bunu, kolonize olunan yüzeyin ve bakteri hücre yüzeyinin özelliklerine bağlı olarak irreversibl bağlanma izler. İrreversibl bağlanma sırasında tek tabakalı hücreler yüzeye sertçe bağlanarak şekil alırlar. Bunu mikrokoloni gelişimi izler ve sonunda matür biyofilm oluşur. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta arasında değişir [118].

Koşullar uzun süre uygun gitmezse hücreler biyofilmden ayrılarak planktonik yaşama geri dönebilir [12]. (şekil 7)



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

Şekil 7: Biyofilm gelişim aşamaları

2.3.3.a. Yüzeyi algılama ve tutunma:

Mikroorganizmlar gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik (sesil) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Planktonik hücreler bireysel olarak serbest yaşarlar. Yerleşik hücreler ise bir yüzeye tutunup bir araya gelerek topluluk halinde fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bakterilerin yüzeye tutunmaları dönüşümlü (non-spesifik) ve dönüşümsüz (spesifik) olarak iki basamakta incelenebilir [8,9].

i-Dönüşümlü tutunma:

Dönüşümlü tutunmada bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas edememekte ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals bağları gibi zayıf etkileşimler meydana gelmektedir [9]. Bunların içinde en önemlisi hidrofobik etkileşimlerdir [119]. Dönüşümlü tutunma gevşek bir bağlanmadır ve oluşması için öncelikle bakteri ile yüzey yeterli yakınlığa (< 1 nm) ulaşmalıdır. Bundan sonra adhezyon, her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak gelişir [10,108]. Hücreler bu fazda durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler [7].

ii-Dönüşümsüz tutunma:

Bakteri, yüzeyindeki piluslar, fimbria ve fibriller gibi ligandlar ile ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara spesifik ve irreversibl olarak bağlanır [10]. Bu bağlanmada

yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri rol oynar. Dönüşümsüz tutunmada hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılması fırçalama, kazınma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirir [7]. Biyofilmin olgunlaşması bu bağlanma sonrası başlar.

Hareketli ve hareketsiz bakteriler kolonizasyon için farklı süreçler kullanırlar. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler [120]. Bununla birlikte, flagella ve fimbria (veya pili) gibi ekler ve aynı şekilde yüzey molekülleri (lipopolisakkarit, lipoproteinler, membran proteinleri, lektin, ligand ve adhezinler vb.) gibi yüzeyle ilişki kuran yapılar tüm bakterilerin yüzeye bağlanmasında rol oynarlar [108,119].

1- Hareketli bakteri:

a) Flagella:

Çeşitli bakteri türlerinde genetik taramalarda, flagellanın bağlanmayı başlatmada gerekli olduğu ve büyük oranda hızlandırdığı gösterilmiştir. Örneğin, flagellasız ya da flagellası paralyze olmuş mutant *E. coli K 12*' nin polivinilklorid (PVC) yüzeye bağlanmada yetersizlik gösterdiği saptanmıştır [121]. Korber ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mutant ve vahşi-tip mikroorganizmaları karşılaştırmış ve Gram-negatif bakterilerde flagella varlığının yüzeye tutunmayı arttırdığını göstermişlerdir [122]. Flagella yokluğunda bazı bağlanmalar gerçekleşse de, doğal suşlarda 12 saatin üzerinde bağlanmada gecikme görülebilir.

Flagellaların yüzeyi tanıma ve bağlanmayı kolaylaştırması ile ilgili olarak; flagellanın alt tabaka ile bakteri hücre yüzeyi arasındaki itici elektrostatik güçlerin aşılmasına yardımcı olarak adhezyon için gereken enerjiyi azalttığı düşünülmektedir [121, 123].

b) Fimbria / Pili :

Bakteriler birbirlerine ve yüzeye yapışmak için çeşitli fimbria ve pilileri kullanırlar. Örneğin; *V. cholerae*' da çeşitli canlı ve cansız yüzeylere bağlanma için mannoza duyarlı hemaglutinin (MSHA) tip IV pili, *V. cholerae El Tor* için *mshA* [124] ve *E. coli K-12* tip I pili nin [121] bağlanmada önemli pililer oldukları bilinmektedir. *E. coli* 'de konjugatif pili ekspresyonu, nonspesifik hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimleri üzerinden adhezyonun başlamasını hızlandırır. Bu durum *E.coli* 'de adhezyon için flagella, tip 1 pili ve Ag43'ün ne kadar gerekli olduğunun bir göstergesidir [126]. *P. aeruginosa* için de tip 4 pilinin varlığı biyofilm için başlangıç adhezyonunda gereklidir. Ancak buna tezat olarak, O'Toole ve Kolter, abiyotik yüzeylere bağlanmanın tip 4 pilinin olmadığı *P. aeruginosa* suşlarında daha iyi olduğunu saptamışlardır [127]. Buna göre tip 4 pili aracılı yüzeye bağlanma biofilm oluşumu için önemlidir ancak tip 4'ün buradaki rolü çevresel faktörler ile değişiklik gösterebilir [112].

Özellikle Gram-negatif bakterilerde konjugatif pili sentezi için gerekli genlerin ekspresyonunun direkt olarak biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olmaları, adherans ile başlayan biyofilm oluşumunda bir seri iyi düzenlenmiş genetik aktivasyonun birbirleri ile ne kadar ilişkili olduğunu göstermektedir [12].

c) **Ekzopolisakkarit:**

Yüzeye tutunan hücreler, bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarit yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekzopolisakkarit aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır [118].

Moorthy ve Watnick karbon kaynağı olarak aminoasit içeren ortama bağlanmada tamamen eksiklik gösteren bir *mshA* mutantının, ortama mannoz eklendiği zaman bağlanmaya başladığını göstermişlerdir [128]. Mannoze eksikliğinde EPS sentezinden sorumlu gen baskılanmaktadır. Mannoze eklenmesi ile EPS sentezine yol açan gen ekspresyonu uyarılır, tutunma ve biyofilm oluşumu için süreç başlatılmış olur [128].

2- Hareketsiz bakteri:

Hareketsiz bakterilerde biyofilm gelişimi, hareketli bakterilerle benzer aşamaları izler. İlk olarak yüzeye kararlı bağlanma gerçekleşir, bunu EPS sentez ve sekresyonu ile matür biyofilm oluşumu izler [12]. Hareketsiz bakterilerde biyofilm oluşumu çoğunlukla, implantlarla ilgili birçok infeksiyondan sorumlu patojenler olan *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te incelenmiştir.

2.3.3.b. Kolonizasyon:

Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışınca kolonizasyon sağlanır [118].

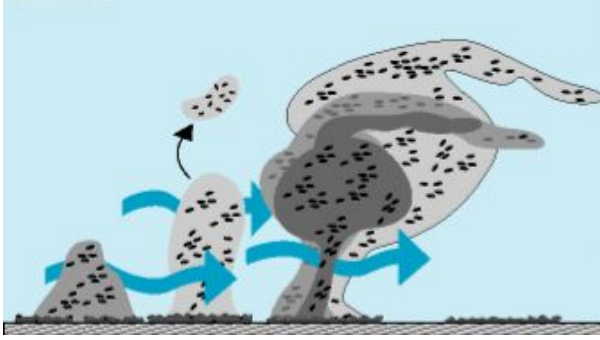
2.3.3.c. Kopma:

Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrası hareketi sağlayan flagella sentezlenir, üst taraftan kopma gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç dengeye oturunca, sürekli hal kazanır [130].

2.3.4. Biyofilm mimarisi ve yapısı:

Matür biofilm, çeşitli mikroskopik metodlarla gösterilen kompleks bir mimariye sahiptir. Mikrobiyal hücreler ve EPS biyofilmin ana iskeletini oluşturur [111]. Biyofilm üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapıdır [131]. EPS yapısı kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik gösterse de öncelikli olarak

polisakkaritlerden oluşur ve biyofilmin toplam organik karbon kaynağının % 50- % 90'lık bölümünü barındırarak ana maddeyi (matriks) oluşturur [132]. EPS'yi oluşturan polisakkaritlerden bir kısmı doğal, bir kısmı da anyonik yapıdadır. Uronik asitlerin (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asitler) ya da ketal bağlantılı piruvatların bu yapıya anyonik özellik kattığı bildirilmiştir. Bu özellik kalsiyum, magnezyum gibi divalent katyonların polimerlerle etkileşime girerek biyofilm yapısının güçlenmesini sağladığından önemlidir [131]. Biyofilmde Gram- pozitif bakterilerin varlığında EPS katyonik yapı gösterir ve ana yapı teikoik asit ve proteinden oluşur [133].



Şekil 8: Biyofilmin üç boyutlu yapısı

Biyofilmde fiziksel ve biyolojik yapı çoklu iç ve dış faktörlerin etkileşimi ile düzenlenir ve bu fiziksel yapı EPS ile bağlantılıdır. EPS gel ya da viskoelastik davranış sergileyebilir ve bu fazlara geçişinde protein, kalsiyum (Ca^{+2}) iyonları, polisakkaritler ile yapı daha da sağlamlaştırılır [131,133,134]. Tabakalı yapı alttaki hücreleri stabilize ederek antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımını sağlar [134,135].

Biyofilmde EPS dağılımı homojen değildir [136,137]. EPS yüksek seviyede su içerir ve yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar barındırır [131]. Lawrence ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, her biyofilmin derinlik, yapı ve hücresel olmayan materyal oranının farklılık gösterdiğini, buna karşılık tüm biyofilmlerde su kanallarının bulunduğunu saptamışlardır [138]. Biyofilm yapısındaki sıvı akışı sonucu oluşan su kanalları heterojen besin maddesi, oksijen hatta antimikrobiyal madde dağılımını sağlar [139].

EPS miktarı biyofilm yaşıyla doğru orantılı olarak artar. EPS metal iyonları, divalent katyonlar, protein, DNA, lipid gibi makromoleküllerle etkileşime girebilir [131]. Biyofilm yapı ve mimarisini, özellikle çevresel besin varlığı olmak üzere birçok faktör etkiler. EPS sentezi karbon, nitrojen, potasyum veya fosfat gibi besinlerin varlığına bağlıdır. Karbon fazlalığı ve diğer besinlerdeki sınırlılık EPS sentezini arttırabilir. Ek olarak yavaş bakteriyel büyüme EPS üretimini arttırabilir [131]. Demir varlığında EPS, viskozite artışı veya jelleşme gösterir

[140]. Besin varlığında biyofilm oluşumunun artışına tezat olarak, *Bacillus subtilis* ve *E. coli* 'de matür biyofilm derinliği yıkım ürünlerinin baskılaması ile azaltılır. Bu da besinden zengin çevrenin, bu bakterilerin biyofilm oluşturmaları açısından avantajlı olmadığını düşündürmektedir [141,142].

Bunların dışında, konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküller biyofilm mimarisine katılabilir. Canlı sistemlerde zaman içerisinde eritrosit ve fibrin katılımı ile besince daha zengin ve daha stabil bir biyofilm oluşumu görülür [109].

Biyofilmin karbonhidrattan zengin yapısında bir aminoşeker grubu olan siyalik asit de bulunur. Siyalik asit, organizmalarda, vertebralılarda ve tüm memelilerin dokularında glukokonjugatlar şeklinde mevcuttur ve hücre yüzeyine negatif yük verir [143,144].

Yapılan çalışmalarda siyalik asitin; glikoproteinlerin ve hücre membranlarının uyumunu stabilize ederek, hücrelerin birbirini tanımasına, hücreler arası ilişkiye ve transmembran taşıma mekanizmasına yardım etme, doku ve vücut sıvılarında kimyasal haberci olarak görev alma, antikorlar, enzimler ve mikroorganizmalar için reseptör moleküllerinin fonksiyonlarını ve kan dolaşımındaki glikoproteinlerin yaşam süresini, fonksiyonlarını ve stabilizasyonlarını etkileme, glomerül bazal mambran geçirgenliğini kontrol etme ve immun sistem hücrelerinin ilişkilerini düzenleme gibi görevleri mevcuttur [145]. Bunların yanında reseptör-ligand ve hücre-hücre ilişkisinde de fonksiyonları bulunduğundan siyalik asidin hücre yüzeyindeki miktarı; hücrenin deformabilite, motilite ve adhezivliği gibi özelliklerinde önemlidir [146].

Yapılan adherans çalışmalarında siyalik asidin birçok virus, bakteri ve protozoada bulunan ve hücre yüzeyi glukokonjugatlarının uzaklaşmasını sağlayan nöraminidaz ile [147] müdahale edilmesi sonrası nötrofillerin adheransında artış olduğu [144], biyofilm oluşturan *S. aureus*'un nöraminidaz ile muamelesi sonucu yüzeye adheransında azalma olduğu saptanmıştır [148].

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

2.3.5. Biyofilm ekolojisi:

Biyofilmin en küçük birimi mikrokolonidir [109]. Mikro kolonideki hücrelerin yakınlığı besin maddesi sentezi, gen değişimi ve Quorum Sensing (çoğunluğun algılanması) için ideal ortam sağlar.

2.3.5.a. Gen transferi:

Bakterilerin genetik yapısında meydana gelen değişiklikler hücrenin bulunduğu ortam, hücrenin diğer hücrelerle etkileşimleri ve kendi içlerindeki değişimlere bağlı olarak çeşitlilik gösterir [136]. Mikroorganizmalar arası genetik materyal değişimi;

1. Plazmidler ve konjugasyon

2. Transformasyon

3. Transduksiyon

4. Füzyon

5. Supresyon

ile sağlanabilir.

Biyofilmin ekstrakromozomal DNA (plazmid) değişimi için ideal yapı olduğu, konjugasyonun biyofilm hücrelerinde, planktonik yapıdakilerden daha fazla görüldüğü bildirilmiştir [149,150]. Ghigo ve ark. konjugasyona hazır plazmid içeren bakterilerin, biyofilm oluşturmaya yatkın olduğunu öne sürmüştür [125]. *E.coli*'ye ait F plazmidinin aktive olarak sentezlettiği F konjugatif pilusunun, hem hücre yüzeyi hem de hücre ile başka bir hücre arasında yapışma faktörü olduğu ortaya konmuştur. Donör hücrelerden, alıcı hücrelere aktarılan DNA yapısında patojenite, toksijenite, antibiyotik ve dezenfektan direncini kodlayan genler olabileceği, buna bağlı olarak, biyofilmin antibakteriyellere karşı gelişen direncin yayılmasında önemli rol oynayabileceği iddia edilmiştir.

2.3.5.b. Çoğunluğun algılanması (Quorum Sensing):

Bakteri biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan iletişim sinyalleri aracılığıyla kontrol eder. Bu sinyal sistemi “quorum sensing” olarak adlandırılır [151].

Bakteri çevredeki koşul değişikliklerinde metabolizmasında değişiklikler yaparak adaptasyon geliştirmeye ve bunun için birçok genin kontrolünü sağlamaya çalışırken bu sinyal sistemini kullanır [152]. Bakteri popülasyonu, bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizmada, hücreler arası sinyal verirken küçük yayılabilir “auto-inducer” molekülleri oluşturur ve ekstrasellüler ortama salgırlar. Bu sinyal molekül konsantrasyonunun artışı ile birlikte bakteriler diğerlerini sayabilir, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatabilir ve buna göre hedef gen ekspresyonunu değiştirebilirler [151,153-155].

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir [16]. Buna dayanarak “quorum sensing” kavramı “minimum popülasyon birimini algılama” olarak ifade edilebilir [156]. Bu hücreler arası sinyal mekanizmasının gelişim, spor oluşumu, antibiyotik direnci, virulans faktör oluşumu, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmid transferi, hücre ayrımı ve patojen bakteri

enfeksiyonları fonksiyonlarda diğerk fiziksel olaylarla birlikte mikroorganizmanın beslenme değişimini düzenlediğine inanılır [153,156]. Bu sinyaller sayesinde bir odakta toplanan mikroorganizmalar biyofilmin temelini oluşturur.

Quorum sensing (QS) sistemi iki örnek grupta sınıflandırılabilir [155].

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

Gram-negatif bakterilerde türden türe quorum-sensing mekanizmasında “açıl homoserin laktonlar (AHLs)” etki eden ana moleküldür ve biyofilm mimarisini etkilediğı gösterilmiştir [158,159]. Gram-negatif bakterilerde AHL ler, Lux I protein ailesi, Lux R ve “autoinducer” yapıları quorum sensing sisteminde rol alan diğerk yapılardır [156,158,160-162].

Her Gram-negatif bakteri türünün ürettiğı AHL’ler sonucunda da sadece aynı türün üyeleri bunu tanıyarak yanıt verir. Sabit hızla üretilen AHL ler eşik konsantrasyonda gen ekspresyonunda değişikliği uyarırlar [163].

Gram- negatif bakterilerin tersine, Gram- pozitif bakterilerde AHL-aracılı quorum sensing kullanımı gösterilmemiştir [155]. Gram-pozitif bakteriler quorum sensing için “autoinducing peptidler (AIPs)” yapılarını kullanırlar [151,164].

Acyl-Homoserine Lactone (AHL) , siklik dipeptidler sistemi bir grup Gram-negatif bakteride, otoindükleyici 2 sistemi (AI-2) Gram- pozitif ve Gram- negatif bakterilerde, peptit bağlantılı sistem ise Gram- pozitiflerde tanımlanmıştır [163]. AHL’in diğerk quorum-sensing ajanlarından farklı olarak, kolonizasyondan da sorumlu olduğı ortaya konmuştur [166].

Yapılan bir çalışmada *P. aurigunosa* ’nın insan akciğer hücrelerinde acyl-homoserine lactone bağımlı quorum sensing sinyallerinin tam tanımlanamamış konak hücre ile ilişkili faktörler tarafından inaktive edildiğı görülmüştür [167]. Akciğer hücresinde *P. aurigunosa* ’nın quorum sensing sinyallerinin immun sistem tarafından inhibisyonuna rağmen mi biyofilm oluşturabildiğı yoksa quorum sensing sinyallerinin biyofilm oluşumundaki önemi nedeniyle mi immun sistem tarafından hedef alındığının yanıtı net değıldir [107]. Ancak biyofilm oluşumu sırasında quorum sensing mekanizmasının görev aldığı bilinmektedir.

Özetle quorum sensing sisteminin bakteriye getirdiğı birçok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri, davranışlarını koordine ederek besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir, aynı besin için yarışan diğerk bakterilere karşı savaşıabilir, en önemlisi de enfeksiyon sırasında virulans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immun yanıtıdan kaçabilir.

2.3.5.c. Konak savunmasından korunma mekanizmaları:

Biyofilmler doğaları gereğı konak savunmasından ve antibiyotiklerden korunurlar. Biyofilm matriksi, biyofilm bakterilerinin konak savunmasından korunmasında anahtar rol

oyunar [168]. Shiau ve Wu, *S. epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler biyofilmin, makrofaj fagositik aktivitesine engel olduğunu saptamışlardır [169]. Meluleni ve arkadaşlarının çalışmasında, kronik kistik fibrozisli hastalara ait opsonik antikorlar, biyofilm mikrokolonilerinde gelişen bakteriyel hücrelerin fagositozu ve eliminasyonunda etkisiz kalmıştır [170]. Yasuda ve arkadaşları, biyofilm içinde gelişen *E. coli* hücrelerini, fagositoza duyarlı biyofilm dışı bakteriler ile süspanse etmiş ve in vitro olarak insan nötrofil lökositlerinin öldürücü aktivitesine karşı daha az duyarlı olduklarını saptamışlardır. Buna dayanarak fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin nötrofil lökositlerdeki oksijen ile öldürülmeye dirençli türler sonucu ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu sonuca göre; medikal araçlar veya kronik infeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan organizmalar immun sistemi aşarak infeksiyon oluşturmaya daha hazırdırlar [171].

2.3.5.d. Biyofilm ve antibiyotik direnci:

Doğal ve kazanılmış immun yanıtı sağlam bireylerde dahi biyofilme bağlı infeksiyonlar nadiren düzelir. İn vivo olarak antibiyotikler, bağlı popülasyondan dökülen serbest bakterileri öldürerek infeksiyon semptomlarını baskılayabilirler, ancak halen biyofilme gömülü olan bakteriyel hücreleri eradike etmekte yetersizdirler. Biyofilm, antibiyotik tedavisi sonlandırıldığında infeksiyonun tekrarı için bir odak oluşturur. Biyofilm infeksiyonları, kolonize yüzeyin cerrahi olarak çıkarılmasına kadar sıklıkla tekrar eder [14].

Biyofilm içinde mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre 200-500 kat daha dirençlidir [118]. Biyofilmin doğal yapısı nedeniyle mikroorganizma antimikrobiyal ajanlara (antibiyotikler, dezenfektanlar ve germisidler) karşı kalıtsal ya da kazanılmış bir direnç geliştirmiştir [104]. Bakterinin biyofilm oluşturarak yüzeye yapışmış formu (sesil) ile süspanسیون formu (planktonik) arasında antibiyotik duyarlılığı farklıdır [172,173]. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler sıvı ortamda serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençlidir. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise duyarlı hale dönüşebilir [168,174]. Bu yolla oluşan direnç mekanizmasında glikokaliks bileşimi, hücre dışı enzimler, besin sınırlaması, dezenfektanın hücreye ulaşmasında zorluk gibi çeşitli faktörler varsayılmaktadır.

Biyofilmlerin antibiyotik direnci oluşturmada bilinen direnç mekanizmaları; örneğin enzimatik inaktivasyon, atım pompaları, ilaç hedefinde mutasyon gibi mekanizmalar primer sorumlu faktörler olarak görülmemektedir [118]. Biyofilmin antibiyotik direnci oluşturmada en az 3 mekanizma suçlanmaktadır [11,13, 104,108]:

1. Moleküler filtre: Bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik direncinde ilk hipotez, antibiyotiklerin biyofilm içine yavaşlamış ya da yetersiz geçişidir [14]. Antimikrobiyal ajanlar etkilerini gösterebilmek için öncelikle biyofilm matriks içinden diffüze olmalıdır. Matriks içindeki ekstrasellüler polimerik maddeler moleküllerin geçişi için bariyer görevi görür. Bu engelleme sıklıkla antibiyotiğin biyofilm komponentlerine bağlanması sonucu artaya çıkar.

Biyofilm içindeki osmotik çevre değişiklikleri osmotik bir strese yol açıp bakterideki porin yapısında ve miktarında değişikliğe neden olabilir. Böylece osmotik stres yanıtı indüklenir [175]. Böyle bir yanıt porinlerin oranını değiştirip hücre zarfının antibiyotiklere geçirgenliğini azaltarak antibiyotik direncine katkıda bulunabilir[14]. Bu durumda özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklerin hücre içine girişi kısıtlanır. Genel stres yanıtı bakteride “Q faktör” olarak bilinen *RpoS* geninin ekspresyonuna yol açıp bir osmotik koruyucu olarak fonksiyon gören trehalozun aşırı sentezlenmesine ve biyofilmin kalınlaşmasına neden olur [176]. Düşük penetrasyon olayı, antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu ile birlikte olduğunda direnç daha belirgin hale gelir.

Suci ve ark.’nın çalışmasında siprofloksasinin steril yüzeye normalde 40 saniye olan penetrasyon süresinin *P. aeruginosa* biyofilminde 21 dakikaya kadar çıktığı görülmüştür [177]. Hoyle ve ark. serbest bakterilerin biyofilm oluşturmuş bakterilerle karşılaştırıldığında tobramisin duyarlılığının 15 kat artmış olarak bulmuştur [178]. Seftazidim, piperasilin, gentamisin ve tobramisinin ele alındığı başka bir çalışmada beta-laktam antibiyotiklerin alginat jelden difüzyonunun aminoglikozidlere göre daha çabuk olduğu gösterilmiştir [179]. Biyofilmin fiziksel bariyer oluşturma özelliğinin, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisinin, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir [180].

2. Çoğalma oranlarının değiştirilmesi: Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direncini açıklayan ikinci hipotez, biyofilm-ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden anlamlı olarak daha yavaş büyüdüğü ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanı daha yavaş tuttuğu şeklindedir [11,104]. DuGuid ve arkadaşları *S. epidermidis* biyofilm büyüme hızlarının antibiyotik duyarlılığını kuvvetle etkilediğini; hücre büyüme hızı ne kadar yüksekse, siprofloksasinle inaktivasyon hızının o kadar yüksek olduğunu göstermişlerdir [181]. Anwar ve ark., *S.aureus* biyofilminin oluşma süresi ile antibiyotik direncinde artış olduğunu saptamışlardır [182]. Bu bulgulara göre biyofilm bakteri büyüme ve beslenmesini etkileyerek antibiyotiklere direnç gelişimini sağlamaktadır.

3. Mikroçevrenin antibiyotik aktivitesine etkisi: Üçüncü hipotez biyofilm içindeki değişmiş kimyasal mikroçevreye dayanır. Bu hipotez, besin ve oksijen kısıtlılığı sonucunda biyofilme yavaş büyüme ve düşük metabolik aktivitenin, antibiyotik toleransına yol açtığını öne sürer. Biyofilmin en dış kısımlarında lokalize olan bakteriler derinlerde olanlara göre besin maddelerine ve oksijene daha rahat ulaşırlar. Bu durum bakteri popülasyonu içinde heterojeniteye yol açar. Biyofilm içindeki bu heterojenite antibiyotik duyarlılığında da farklılıklara neden olur.

Biyofilm oluşumu için gerekli pH, CO₂, iki değerlikli katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, pirimidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir [183]. Mikroelektrod ile yapılan çalışmalarda oksijenin biyofilmin yüzey tabakalarında tamamen tüketildiği, bu durumda biyofilmin derin tabakalarında oluşan anaerobik ortamın biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiştir [184,185]. Tresse ve ark.'nın çalışmasında anaerob koşullarda kalan *E. coli* suşlarının antibiyotik alımının azalmasına bağlı olarak azalmış aminoglikozid duyarlılığı görülmüştür [186]. Anaerob koşullar hem aminoglikozidlerin hem de florokinolonların etkinliğini azaltır [187].

Bunlardan başka, antibiyotik direncinde suçlanan bir mekanizma da biyofilm fenotipi varyantlarının oluşumudur. Biyofilmi oluşturan hücrelerin önemli bir kısmı antibiyotik etkisi ile ortadan kalkarken küçük bir kısmı canlılığını sürdürmeye devam eder. Bu fenotipik varyantların yüksek konsantrasyonda antibiyotiklere dirençli olma sıklıkları 10⁶ dır. Antibiyotik dirençli bu varyantlar biyofilm oluşturma yetenekleri ile dirençli biyofilmlerin oluşumuna neden olurlar [188]. Öne sürülen bir hipoteze göre, antibiyotik etkisiyle zarar gören hücrelerden bir kısmının apoptoza girdikleri, ancak bir grup varyant hücrenin bu yetenektan yoksun oldukları için canlılıklarını koruyarak biyofilmi devam ettirdikleri şeklindedir [118]. Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimler sonucunda genetik yapılarında değişiklikler olur ve biyofilmler ekstrakromozomal DNA değişimleri için uygun ortam oluşturur [107]. Direnç plazmidlerinin aktarılması ile genetik yapısı değişen hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli hale gelirler.

Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, biyofilmi oluşturan bakteri türü ve kullanılan antimikrobiyal ajana bağlı olarak farklı direnç mekanizmalarının etkili olabileceği ve bu direncin multifaktöriyel olduğu söylenebilir [189].

2.4. *Escherichia coli* ve virulans faktörleri:

2.4.1. Biyofilm oluşumu:

Escherichia coli, doğumdan sonraki ilk birkaç saatte insan gastrointestinal sistemine kolonize olur ve konakçı ile mutual bir ilişki içinde yaşamını sürdürür. Fekal flora üyesi

olması nedeniyle kanalizasyon sistemlerinin kalitesini ölçmede ve gıda sektöründe önemli bir göstergedir [190]. Genitoüriner sistemin normal flora üyesi olması ve bir çok spesifik virulans faktörüne sahip olması nedeniyle patojenik suşları çok geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilir ve insan sağlığı için dünya çapında risk teşkil eder [191].

E.coli moleküler olarak biyofilm oluşumunun en iyi tanımlanmış mikroorganizmalardan biridir. Bu bakteride de biyofilm oluşumu;

- i) hücre ve yüzey arasındaki ilişki sonrası devreye giren güçler ile solid yüzeye planktonik bakterinin geri dönüşümlü tutunması,
- ii) yüzeye temas eden pili/fimria üzerindeki spesifik adhezinler aracılığıyla geri dönüşümsüz tutunma için gerekli ekstrasellüler polimerlerin üretimi ve geri dönüşümsüz tutunmanın gerçekleşmesi,
- iii) erken biyofilm mimarisinin gelişimi,
- iv) olgun biyofilimde mikrokolonilerin gelişimi, bakterinin büyüme ve fizyolojisini devam ettirmek üzere su kanalları, porlar gibi kompleks yapıları geliştirmesi,
- v) hücrelerin biyofilm tabasından koparak çevreye yayılması, tekrar planktonik hale geçmesi

evrelerinden sonra olur [190].

Bu biyofilm gelişimi, yukarıda belirtildiği üzere Gram-negatif bakterilerde açıl homoserin laktonlar (AHLs) [192] ve Gram-pozitif bakterilerde spesifik peptidler [193] gibi hücreler arası sinyal molekülleri aracılığıyla oluşan yoğunluk-bağımlı gen ekspresyonu ile düzenlenir. *E. coli* 'nin AHLs üretememesi nedeniyle biyofilm oluşumu sırasında AHL'lar direkt rol oynamaz. *E. coli* 'nin AHLs mekanizmasındaki Lux-R tip transkripsiyon aktivatörüne yakın, reseptör-benzeri bir protein olan *SdiA* üretiminin, doğal ortamda biyofilm oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir [194,195]. Çoğu *E. coli* suşu hem Gram-negatif bakterilerde hem Gram-pozitif bakterilerde yaygın olarak bulunan ve *Lux S* gen ürünleri ile değişiklik gösteren autoinducer-2 (AI-2) üretir. AI-2, *E. coli* 'nin flagella üretimi ve motilite gibi birçok fonksiyonunda düzenleyici olarak görev yapar [196]. Hücre yoğunluğu arttıkça autoinducer konsantrasyonu da artar. Hücresel reseptörlere bağlanan autoinducer, genleri, biyofilm oluşumu [192], virulans faktörlerinin üretimi [197], siderofor sentezi [198], biyoluminesans [199], protein üretimi [200] ve plasmid konjugasyonu [201] için tetikler.

Biyofilm gelişimi sırasında birçok gen işlev görür [202]. Bu genlerin ekspresyonu farklı çevresel uyaranlardan etkilenir ve *ompR* ve *rpo S* tarafından düzenlenir [115]. *E. coli* 'nin

nin besin azlığı, osmotik stres, asidik ortam, ısı, oksidatif DNA hasarı gibi stres faktörlerine olan hücresel cevabı, *rpoS* tarafından kodlanan sigma faktörünün kontrolündeki genler ile sağlanır [203]. *E. coli* biyofilm oluşumunda *rpoS* tarafından kodlanan sigma faktörü önemlidir [204].

Schembri ve arkadaşlarının çalışmasında biyofilm oluşumu sırasında planktonik büyüme fazına göre genlerin % 5-10'unda değişiklik meydana geldiği gösterilmiştir [204]. *E. coli*' de ise bu oran % 38 olarak saptanmıştır [175]. Uyarıcı ve baskılayıcı genlerin işlevlerinin araştırıldığı çalışmada Beloin ve arkadaşları, matür biyofilm ile *E. coli* K12 gelişim fazı kültürlerinin, transkripsiyon paterni açısından karşılaştırılması amacıyla DNA dizi analizi yapmışlardır [205]. Planktonik kültürler ile karşılaştırıldığında, biyofilimde yaklaşık 250 uyarıcı ve 188 baskılayıcı gen saptamışlar, uyarıcı genlerin stres yanıtı, transport, enerji ve karbonhidrat metabolizması ile ilgili, baskılayıcı genlerin ise aminoasit, inorganik iyon transportu ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir. Hücrenin durağan fazı ile matür biyofilm oluşumunu karşılaştırdıklarında, genlerin ancak yarısının biyofilm oluşumunda değiştiği ve matür biyofilm gelişiminde rol oynadığını saptamışlardır. Her çalışmada *E. coli* biyofilm oluşumunun farklı uyarıcı ve baskılayıcı genlerin kontrolü altında gösterilmesi, bakteriyel suşların farklı oluşu, deneysel biyofilm çalışmasının türü ya da biyofilm yaşı ile ilişkilendirilmiştir [206].

İndol *E. coli* identifikasyonu için tanısal bir belirteçdir. *Tna* geni tarafından kodlanan triptofanaz enziminin, triptofandan sentezlenir. İndolün bir sinyal molekülü gibi davranarak [206], bakteriyel hücrelerin besinden fakir ortama adaptasyonunu sağlamada rolü olabileceğini belirtilmiştir [207].

Ren ve arkadaşlarının ursolik asit ile yaptıkları çalışmada ursolik asitin kemotaksis, motilite ve *E. coli*' nin ısı-şok genlerini sülfür metabolizması üzerinden indüklediği, biyofilm oluşumunu ise aşırı motilite sinyali nedeniyle inhibe ettiği gösterilmiştir [208]. Furanon ve ursolik asitin kemotaksi genlerini karşıt yönde uyararak, hücre büyümesini etkilemeden biyofilm oluşumunu inhibe ettikleri, bu yüzden biyofilm oluşumunun farklı bir evresini etkiledikleri saptanmıştır. Buna göre, motilite ve kemotaksi genlerinin biyofilm gelişiminin yanlış evresinde uyarılması, biyofilm stabilizasyonunu bozarak matür biyofilm oluşumunu engeller [208]. Bunların dışında, *E. coli*'nin asit direncini kontrol eden ve bir DNA düzenleyicisi olan AriR üzerinden işlev gören 5-fluorourasilin de *E. coli* için güçlü bir biyofilm inhibitörü olduğu gösterilmiştir [209].

2.4.2.Escherichia coli biyofilm oluşumunda yüzey belirleyicileri

2.4.2.a. Flagella (kamçı) ve motilite:

E. coli suşları peritriköz flagellalar sayesinde genellikle hareketlidirler. Flagellar filamentlerin biyofilm oluşumundaki motilite ve kemotaksi üzerine olan rolleri Pratt ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tanımlanmıştır [121]. Buna göre flagellanın potansiyel olarak dört fonksiyonu bulunur:

- i) bakterinin flagella aracılı kemotaksi ile besinden zengin abiyotik yüzeye doğru yüzmesi
- ii) bakterinin flagella aracılı motilite ile tutunacağı yüzeye erişmesi
- iii) bakterinin flagella aracılı motilite ile tutunup çoğaldığı yüzeyden koparak çevreye yayılması
- iv) flagellanın direkt olarak abiyotik yüzeye tutunması

Motiliteyi sağlayan flagella ve bunu oluşturan yapıların biyosentezi değişik genlerin aktivitesi ile düzenlenir. Bu genlerde olan delesyon ya da mutasyonlar sonuç olarak motilite ve kemotaksisi etkiler. Flagellar filamentin ana bileşeni olan flagellinin biyosentezi, bunu kodlayan *fliC* [210] ya da flagellar bölgenin diğer tüm genlerinin ekspresyonunu sağlayan ana düzenleyici gen *flhDC*'deki [211] başlangıç mutasyonu ile inhibe edilir. *motA* delesyonu paralitik flagella, kemotaksi genleri olan *cheA* ve *cheZ*'deki mutasyonlar, hareketli ancak non-kemotaktik hücreler ile sonuçlanır [190]. Buna göre, *E. coli* biyofilm oluşumunda kemotaksi gerekli değilken, motilite tutunma için kritik role sahiptir [190, 121]. Motilite başlangıçtaki hücre ile yüzey arasındaki teması sağladığından patojenik mikroorganizmaların konakçıya kolonizasyonunda virulans faktörü olarak kabul edilir.

2.4.2.b.Fimbria:

E. coli 'nin fimbria yapısı konakçı hücreye adhezyonunda önemlidir. En sık bulunan adhezin yedi nm genişliğinde ve yaklaşık bir mikrometre uzunluğunda, çubuk şeklindeki tip 1 fimbriadır [212]. Fimbrial organellerin yapısal bileşenlerini *fim* gen kümesi kodlar [210]. Bu gen ailesinin aktivitesi “integration host factor” (IHF) [213] , “leucine-responsive regulatory protein”(LRP) [214], ve “histone-like nucleoid structuring protein” (H-NS) [215] ile düzenlenir.

Tip 1 fimbria spesifik olarak D-mannozile glikoproteinlere bağlanır [216]. Ayrıca memeli bukkal hücreye, intestinal epitel hücrelere, akciğer, böbrek proksimal tübül hücrelerine ve salgısal IgA, Tamm-Horsfall gibi sekretuar glikoproteinlere tutunma özelliği gösterir [217]. Tip 1 fimbrianın tutunması sonrası in vitro olarak, granulositlerdeki

solunumsal patlamanın aktive olduğu, mast hücrelerinin yeniden düzenlendiği ve epitel hücrelerinden sitokin salınımı olduğu gösterilmiştir [218]. *Fim* mutantları incelendiğinde, mutant *E.coli K12*' nin polivinilklorid (PVC) yüzeye bağlanmada yetersizlik gösterdiği saptanmıştır [121]. Tip 1 fimbrianın bakteriyel enteroadherens patogenezindeki rolü tartışmalı olsa da, biyofilm oluşumunun başlangıç basamağında tip 1 fimbria *E. coli* için büyük önem taşımaktadır [219].

Yapılan bir çok çalışmada *E. coli*' nin mesane epiteline kolonizasyonunda da tip 1 fimbria-aracılıklı spesifik adheransın gerekli olduğu saptanmıştır [220,221]. Ancak Hull ve arkadaşlarının nörojenik mesanede yaptıkları bir çalışmada daha önceki çalışmalara tezat oluşturacak şekilde, *fimH* geni ile yönetilen tip 1 fimbria–aracılıklı spesifik adheransın, *E. coli*' nin nörojenik mesane epiteline kolonizasyonu için gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır [222].

P-fimbria üropatojenik *E. coli* 'nin piyelonefrit oluşturmada önemli bir virulans faktörüdür. P-fimbrianın, idrarın yıkayıcı etkisine karşı bakterinin tutunmasına yardım ettiği bilinmektedir. Pürifiye P fimbriaya karşı antikorların ve Fab fragmanlarının oluşması insan üriner sistem hücrelerine bakteri kolonizasyonunu engeller [223]. P-fimbriaya karşı antikor oluşumu gelecekte aşı için ümit vaat etmektedir [224].

2.4.2.c.“Autotransporter” proteinleri:

Autotransporter proteinleri sitoplazmik ve dış membrandan bakteriyel hücre yüzeyine sekresyon için gerekenlerin tamamını içeren salgısal proteinlerdir [190]. Antigen 43 (Ag43) *E. coli* 'nin başlıca yüzey proteinidir [225] ve *agn43* (ya da *flu*) tarafından kodlanır. Ag43 hücrelerin otoaggregasyonunu [226] ve mikrokoloni oluşumunu uyarak biyofilm oluşumunu [227] sağlar. Schembri ve arkadaşlarının çalışmasında *flu* geninin delesyonu, biyofilm yapımında belirgin azalma ile sonuçlanmıştır [204].

Ag43 üropatojenik ve diarojenik *E. coli* suşlarında da tanımlanmıştır [228]. Yapılan çalışmalarda, enteroaggregatif *E. coli*'nin intestinal mukozada kalın biyofilmler oluşturduğu [229,230]. Ag43 protein oranının % 33,7 olduğu bulunmuştur [231]. Ancak aynı çalışmada Ag43 varlığı ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı ilişkiye rastlanmamıştır. Bu çalışmada biyofilm oluşumu *AggR* geni varlığı ile ilişkilendirilmiştir [231]. Yapılan diğer bir çalışmada mesane hücrelerinin infeksiyonu sırasında üropatojenik *E. coli* suşlarında Ag43 ekspresyonu olduğu saptanmıştır [232].

“Adhesin involved in diffuse adherence”(AIDA) diyare etkeni *E. coli* tarafından üretilen bir diğer proteindir. İnsan hücrelerine adheransı sağlayan glikolize adhezin özelliğindedir [233]. Hücrelerin otoaggregasyonunu ve biyofilm oluşumunu Ag 43'ten daha güçlü uyandır [234].

2.4.2.d.Curli:

Curli, major (*csgA*)ve minor (*csgB*) alt ünitelerinden oluşan ve birçok biyofilm oluşturan *E. coli* suşunun yapışma özelliklerini arttıran heteropolimerik protein tabiatında yapılardır [235] . Curli üretimi için genler *csgBAC* ve *csgDEFG* operonlarında yerleşiktir. *CsgB*, bakteri yüzeyindeki insolubl curlinin nükleator katalizörü gibi davranırken, *csgA* curlin üretiminden sorumludur [236]. *CsgD*, LuxR ailesine ait bir transkripsiyon düzenleyicisidir ve *csgBAC*'nin transkripsiyonu için gereklidir [237]. Tüm *E. coli* türleri içinde curlinin, çoğu enterohemorajik ve enterotoksijenik suşlarda ekprese edilirken enteroinvaziv ve enteropatojenik suşlarda ekprese edilmemesi, patojenitede spesifik bir rolü olabileceğini düşündürmektedir [238]. İnsan kan kültürlerinden izole edilen curli üreten *E. coli* K-12 suşlarının insan makrofajlarından proinflatuvar sitokin salınımını daha fazla uyardığı saptanmıştır [239].

2.4.2.e.Ekzopolisakkarit üretimi:

Kolanik asit ya da M antijeni diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde olduğu gibi çoğu *E. coli* suşu tarafından sentezlenen bir ekstrasellüler polisakkarittir. Kolanik asit sentezi için gerekli genler *wca* kümesinde toplanmıştır [240] ve kolanik asit sentezi, *RcsC*, *RcsB* ve *YojN* proteinlerinden oluşan ve kapsül sentezinin iki bileşenli düzenleyicisi olan *Rcs* genleri tarafından kontrol edilir. *E. coli* 'nin abiyotik bir yüzeye tutunması sonrası *RcsC*- bağımlı *wca* operon biyosentezi uyarılır [241]. Burada işlev gören *RcsC* sensor kinazın, bakterinin solid yüzey üzerinde büyümesi sırasında çevresel strese verdiği yanıtta ve *E. coli* biyofilm oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

E. coli K-12' nin fazla curli fimbria üreten suşları kolanik asit içeren çok katlı bir biyofilm oluşturlar, ancak yapılan çalışmalarda kolanik asitin bakteriyel yapışma ve biyofilm oluşumu için gerekli olmadığı [242], ancak kompleks üç boyutlu mimari ve biyofilm derinliğinde önemli olduğu gösterilmiştir [243]. Kolanik asit içeren ve içermeyen suşlar, biyofilm mimarisi ve kalınlığı açısından anlamlı farklar gösterirler. Mukoid suşlarda, biyofilmdeki bakteriyel hücreler yüzeye düzenli dağılmıştır ve intrasellüler alanlar mukusla dolmuştur. Sonuçta bu mukus, biyofilmin mukoid olmayan suşlarda oluşan biyofilme göre daha kalın olmasını sağlar. Buna göre kolanik asit biyofilmin üç-boyutlu mimarisini etkileyerek uzaysal düzenlenmesinde rol oynar ancak yapışan hücre sayısını etkilemez [12]. Bunların dışında, curli fimbrianın alt tabakaya yapışan hücreleri sabitleyerek ve hücreler arası ilişkiyi sağlayarak, biyofilm oluşumunu etkilediği saptanmıştır [242]. Ayrıca, Sheikh ve

arkadaşları tarafından entero-aggregative *E. coli*' nin biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir [229].

Tablo III: *E. coli* biyofilm oluşumunda yer alan yüzey oluşumları

Yüzeyle temas ve geri dönüşümlü tutunma	Flagella Motilite
Geri dönüşümsüz tutunma	Tip 1 fimbria Curli Polisakkarit (EPS)
Mikrokoloni oluşumu ve biyofilm yapısının erken evresi	Motilite Curli Ag43 (Autotransporter protein) Kolanik asit (EPS) Polisakkarit (EPS)
Maturasyon	Kolanik asit (EPS) Curli Konjugatif pili
Kopma	Flagella Motilite

2.4.2.f.Konjugatif pili:

Bakteriyel kongugasyon, hücre-hücre teması ile plazmid bir konjugatif pili vasıtasıyla verici hücreden alıcı hücreye horizontal gen transferinin sağlanmasıdır. Curli bulundurmeyen *csgA* mutantlarında F pilusunun curlinin tüm etkilerini yerine getirebildiği görülmüştür [126]. *E. coli* K-12' nin biyofilm oluşumunda, F-pilusunun ana filament proteini olan *TraA*'nın gerekli olduğu, bu proteinin flagella, tip 1 fimbria, Ag43 yapılarının yokluğunda biyofilm oluşumunu destekleyebileceği tanımlanmıştır [126].F plasmidi taşıyan ve taşımayan *E. coli* suşlarıyla yapılan çalışmada, F konjugatif pilinin yapışma faktörü gibi davranarak hücre-yüzey temasını ve abiyotik yüzeye başlangıç tutunmayı sağladığı, biyofilmin üç boyutlu büyümesini desteklediği görülmüştür [125]. Biyofilmler ve konjugasyon arasındaki bu ilişkiye göre, konjugatif pilisi olan suşların biyofilm oluşturmaya daha yatkın olması ve konjugatif yayılımı kullanması, bu yapıların bakteri virulans özelliklerini arttırıcı bir özelliği olduğunu göstermektedir.

2.4.3. Hemagglütinasyon ve hemolizin üretimi:

Genitoüriner sistemin normal flora üyesi olması ve yukarıda bir kısmı tanımlanan virulans faktörleri nedeniyle *E.coli*'nin patojenik suşları çok geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilir. *E.coli*, en sık olarak akut piyelonefrit ve tekrarlayan idrar yolu infeksiyonlarından izole edilir. *E. coli*'nin virulans faktörlerinden en önemlisi yapışma (adherens) özelliğidir [20]. *E.coli* suşları virulans faktörleri ile selektif olarak üroepitelyal mukozada kolonize olurlar. İnflamatuvar yanıt oluşturur ve sonunda alt üriner yoldan renal kaviteye ilerlerler [244]. Ayrıca konak hücre invazyonu, *E.coli* suşlarının konak savunmasından kaçmasına ve renal dokuya yayılımına neden olur [245].

E.coli'nin hücre yüzey virülans faktörleri yukarıda tanımlandığı üzere çeşitli adhezinleri içerir. Bunlar esas olarak fimbrial kaynaklıdır. Fimbria üreten *E.coli* suşları konak dokuya invaze olmalarını kolaylaştıracak farklı matriks yapılarına bağlanma özelliğindedirler.

E.coli suşlarında bugün bilinen virulans faktörleri arasında; tip 1 fimbria, P fimbria, S, X faktörü (Dr hemaglutinin) içeren tip 2 fimbria gibi konak hücreye adhezyonda etkili yüzey yapıları [21] ve bunların dışında, hemolizin sitotoksik nekrotizan faktor-1, serum direnci, K antijen varlığı, siderofor sayılabilir [246]. Son dönemde yapılan adherans çalışmalarında üropatojenik *E.coli* suşları için hücre siyalik asit içeriğinin de fimbria-aracılı tutunmadan bağımsız bir virulans faktörü olduğu gösterilmiştir [22]. Bunlar epitel hücrelerine bakteriyel adhezyonu, invazyonu ve biyofilm oluşumunu artırır.

Eritrositler, fimbria benzeri yüzey reseptörleri içerdiğinden, fimbria bulunan *E.coli* suşları ile hemaglutinasyon oluştururlar [247]. Hemaglutinasyon, *E.coli* fimbrialarının tiplendirilmesinde kullanılır.

Tip 1 fimbria *E.coli* 'de ilk tanımlanan fimbria yapısıdır. Tip I fimbria patojenler olmayanlar da dahil olmak üzere pek çok *E.coli* suşunda bulunur, 'ortak pili' olarak adlandırılır, mannoz içeren reseptörlerle reaksiyona girer ve eritrosit süspansiyonuna mannoz eklendiğinde hemaglutinasyon inhibe edilir [244,248]. Buna, mannoza duyarlı hemaglutinasyon (MS-mannoz sensitive) (MSHA) denir. *E.coli* 'de tip 1 fimbria dışında kobay eritrositi ile MSHA oluşturan başka bir yapı yoktur. Non-tip I (Tip II=MR-mannoz resistant) fimbrialar ise mannoz içermeyen reseptörlerle etkileşir ve mannoz bulunan ortamda hemaglutinasyon önlenmez. Bu durum mannoza dirençli hemaglutinasyon (MRHA) olarak adlandırılır [247]. Bu nedenle mannoza dirençli hemaglutinasyon, Tip 1 fimbria dışında fimbria bulunduran bakterileri ayırt etmede kullanılan bir yöntemdir. Genellikle P-fimbria tespit etmede kullanılır. P fimbria dışındaki MRHA oluşturan fimbrial ve non-fimbrial adhezinlere genel olarak x adezinler denir [246].

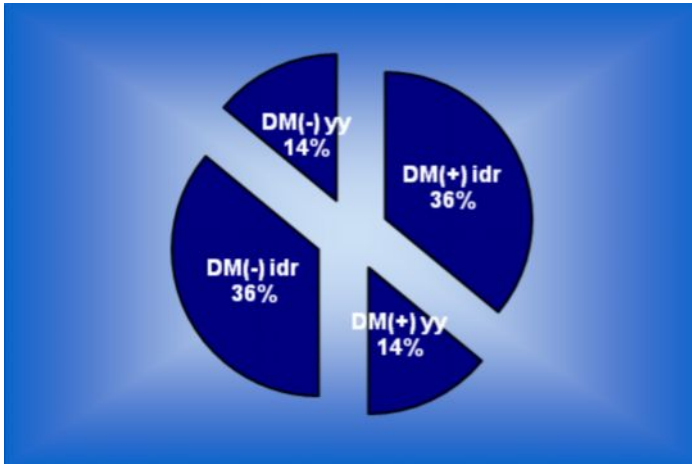
P fimbria, P kan grubu antijenlerini reseptör olarak tanır [249]. P kan grubu antijenleri, terminal ya da internal bir α -D-galaktopiranozil (1-4)s-D-galaktopiranozil (Gal-Gal) molekülü içeren, glikolipidlerin karbonhidrat residülerinden oluşmuş bir ailedir [250,251]. Bu antijen, insanlarda glikoproteinlerde, güvercin ve kuş yumurtalarında, hidatik kistlerde ve bazı enterik bakterilerde bulunur [246]. P-fimbrianın tutunması, hastalık süresince epitelial ve diğer hücreleri sitokin ve diğer proinflamatuvar faktörleri salgılamak üzere uyarır [22].

Mannoza dirençli hemagglütinasyondan sorumlu olan P-fimbrianın akut piyelonefrit gelişiminde major bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir [252]. Vranes ve ark. piyelonefrit, sistit ve asemptomatik bakteriürisi olan hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarının virülans faktörlerinin analizinde; piyelonefritli hastalarda hemolizin üretiminin, asemptomatik bakteriürlü hasta grubuna göre belirgin artmış olduğunu, benzer şekilde mannoza dirençli hemagglütinasyon oluşturan P fimbria üretiminin piyelonefrit grubunda daha fazla olduğunu, asemptomatik bakteriürisi bulunan hastalarda ise hiç bulunmadığını belirtmişler ve bu bulgulara göre, P-fimbria ve hemolizin üretiminin *E.coli*'ye bağlı üst üriner sistem infeksiyonu oluşturmada çok önemli virülans faktörleri olduğunu bildirmişlerdir [20].

Sonuç olarak patojenite ile *E.coli* aracılığıyla oluşan hemagglütinasyon arasında yakın bir ilişki mevcuttur. Böbreğe ulaşan üriner sistem infeksiyonu olan hastalardan hemagglütinin ve hemolizin üreten *E.coli* suşu izole etme oranının, mesane infeksiyonlu ve asemptomatik bakteriürlü hastalardan daha fazla olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla üropatojen *E.coli* suşlarının patogeneğinde, hemolizin ve hemagglütinin üretiminin önemli bir faktör olduğu ve özellikle MRHA varlığının üst üriner sistem infeksiyonu oluşumunda çok önemli bir faktör olabileceği belirlenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM:

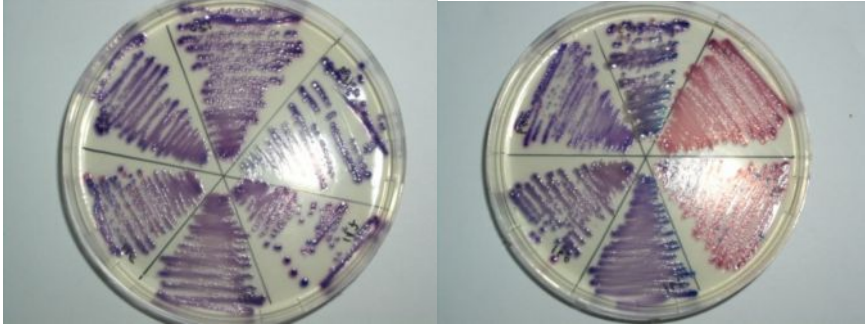
Çalışmada, diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastaların idrar ve yara yeri örneklerinden izole edilen *E. coli* suşları kullanıldı. Diyabetik olan ve diyabetik olmayan iki gruptan 36'şar adeti idrar ve 14'er adeti yara yeri izolatu olmak üzere 50'şer, toplamda 100 adet *E. coli* suşu temin edildi. Her iki gruptaki suşların, hastaların yaş, cinsiyet, örnek cinsine göre benzer özellikte olmasına dikkat edildi. Diyabetik olan ve diyabetik olmayan kontrol hastalarından izole edilen *E. coli* suşları, biyofilm oluşturma, virulan faktörler ve antibiyotik duyarlılığı yönünden karşılaştırıldı. Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kantitatif mikropalak test yöntemi, p-pili ve tip 1 fimbria varlığının tespitinde hemagglütinasyon yöntemi, antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde disk difüzyon testi kullanıldı.



Şekil 9: Toplanan izolatların diyabet varlığına göre dağılımı

3.1. Bakterilerin identifikasyonu:

İzole edilen *E.coli* suşları 0.05 mikrolitrelik özeler ile % 7 insan kanlı besiyeri ve *E.coli* seçici besiyerine (Oxoid) ekim yapıldıktan sonra etüvde 24-48 saat 35,5° C' de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen suşlardan *E.coli* seçici besiyerinde mor renk verenler *E.coli* olarak kabul edildi. Seçici besiyerinde pembe renk verenler çalışmaya dahil edilmedi. İzole edilen tüm bakteriler % 10 gliserinli triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerinde -20° C' de saklandı. Bakterilerin canlılığı pasajlarla kontrol edildi.



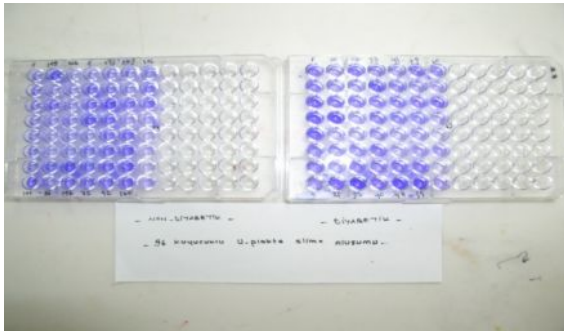
Resim 1: *E.coli* seçici besiyerinde pembe ve mor renk verenler koloniler

3.2. Biyofilm üretiminin saptanması:

Bakterilerin biyofilm üretimi kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile saptandı.

3.2.1. Kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi:

Bu yöntemde izolatlar, % 7 insan kanlı besiyerinde 35,5° C’ de bir gece inkübe edildikten sonra, Lauryl broth (Oxoid) sıvı besiyerine ekildi. 35,5° C’ de bir gece inkübe edildi. % 0.25 glikozlu 2 ml lauryl broth (Oxoid) sıvı besiyerinde 1/40 oranında ekim yapıldıktan sonra, 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plakların her bir kuyucuğuna 200 µl bakteri süspansiyonu olacak şekilde, her bakteri iki kuyucuğa ekilerek 35,5° C’ de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucukların içi boşaltıldı ve iki kez 200 µl fosfat saline buffer (PBS) ile nazikçe yıkandı. Havada kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 200 µl % 1 kristal viole eklenerek 15 dk boyanması için beklendikten sonra içerik boşaltıldı ve iki kez PBS ile yıkanarak kuyucuklar içinde kalan kristal viole uzaklaştırıldı. Havada kurutulduktan sonra, etanol-aseton (80/20) ile çözündürüldü. 595 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) okunarak optik dansitesi 0,8’ den büyük olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edildi [127].



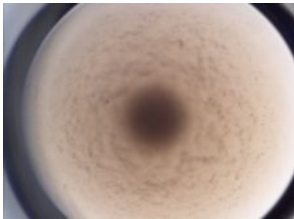
Resim 2: Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Yöntemi

3.3. Bakteri fimbria tespiti:

Bakteri virulans faktörlerinden P fimbria ekspresyonu koyun eritrositleri ile bakterinin % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında hemagglütinasyon yapması ile, tip 1 fimbria ekspresyonu ise kobay eritrositleri ile bakterinin % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında agglütinasyon yapması ile belirlendi.

Bakteriler % 7 insan kanlı besiyerinde 35,5° C' de bir gece inkübe edildikten sonra P fimbria ve tip 1 fimbria ekspresyonları açısından tarandı. P fimbria varlığını saptamak için, inkübe edilen izolatlar 1 cc triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerine ekildi. 35,5° C' de bir gece daha inkübe edildikten sonra her bakteri 96 kuyucuklu U tabanlı steril polistiren plaklara her bir bakteri ikişer ve her bir kuyucuğa 90'ar μ l bakteri süspansiyonu koyularak ekim yapıldı. Her bakteri üzerine ayrı ayrı 10 μ l % 2,5 α -methyl-D-mannoside eklendi, 35,5° C' de bir saat inkübe edildikten sonra kuyucuklarda 25'er μ l karışım kalacak şekilde üst kısımdan uzaklaştırıldı. P fimbria varlığını saptamak için defibrile koyun kanı temin edildi. Santrifüjlenerek ayrılan koyun eritrositleri 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS içinde % 1,25 oranında olacak şekilde dilüe edildi. 35,5° C' de bir saat inkübasyon sonrası her bir kuyucukta kalan 25'er μ l karışım üzerine 35 μ l % 1,25 koyun eritrositleri eklendi. Plaklar 4° C' de iki saat bekletildikten sonra hemagglütinasyon varlığı mikroskop ile değerlendirildi. Her bir bakteri için % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında ve % 2,5 α -methyl-D-mannoside yokluğunda hemagglütinasyon verenlerde p-fimbria olduğu sonucuna varıldı.

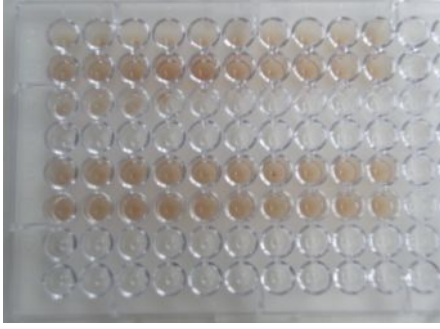
İzole edilen suşlarda tip 1 fimbria saptanması Lauryl broth (Oxoid) sıvı besiyerinde yukarıdaki gibi hazırlanan bakteri süspansiyonlarının üzerine, % 1,25 kobay eritrositleri kullanılarak yapıldı. Plaklar 4° C' de iki saat bekletildikten sonra hemagglütinasyon varlığı mikroskop ile değerlendirildi. Her bir bakteri için % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında hemagglütinasyon vermeyip % 2,5 α -methyl-D-mannoside yokluğunda hemagglütinasyon verenlerde tip 1 fimbria olduğu sonucuna varıldı.



Resim 3: Pozitif hemagglütinasyon



Resim 4: Negatif hemaglutinasyon



Resim 5: Plakta hemaglutinasyon

3.4. Antibiyotik duyarlılıklarının saptanması:

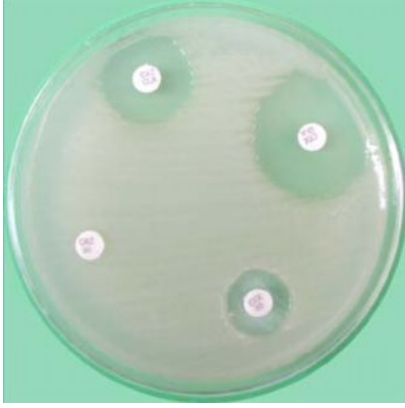
3.4.1.Disk difüzyon yöntemi:

Elde edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) kılavuzuna uygun olarak Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi [253]. Bu yöntemle belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, test mikroorganizmadan hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları üzerine yerleştirilir. Böylece diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda bakterinin üremediği dairesel bir zon oluşur. Zon çapı ölçülerek mikroorganizma duyarlılığı saptanır.

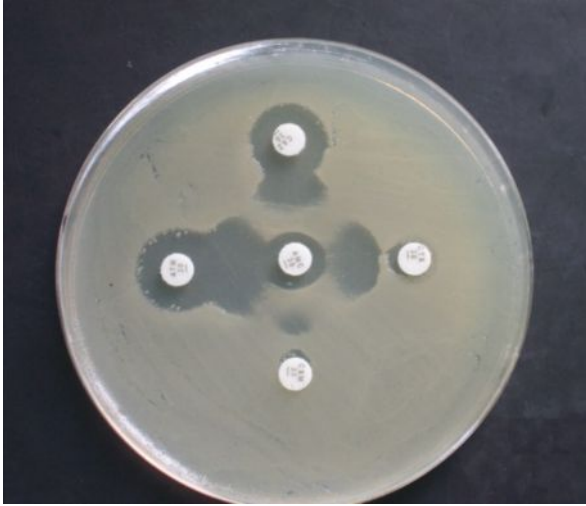
Bu yöntem için; bakterilerin 24 saatlik genç kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların triptic soy broth (Oxoid) sıvı besiyerinde 0,5 Mc Farland bulanıklığı spektrofotometrik olarak (625 nm’ de OD 0,1) belirlendikten sonra, Mueller Hinton (Oxoid) katı besiyerine ekildi. Üzerine 2 cm aralıklarla antibiyotik diskleri yerleştirildi. 35,5° C’ de 24 saat inkübe edildikten sonra, diskler etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek belirtilen zon çaplarına göre antibiyotik duyarlılıkları saptandı. Disk difüzyon yönteminde; sefazolin, sefuroksim, seftriakson, sefepim, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefaperazon/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, imipenem, amikasin, siprofloksasin ve ko-trimaksazol diskleri seçildi.

3.4.2. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi:

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) üreten suşlar CLSI önerileri doğrultusunda tarama ve doğrulama olmak üzere iki aşamada saptandı. Tarama testinde zon çapı seftazidim için ≤ 22 mm ve ya seftriakson için ≤ 25 mm olarak bulunanlarda GSBL varlığından kuşkuylanıldı. GSBL ürettiğinden kuşkuylanılan bu suşlar tekrar Müller-Hington agara ekildi. Seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit diskleri yerleştirilerek 35,5° C’ de 24 saat inkübe edilen suşlardan seftazidim/klavulanik asit diski çevresindeki zon çapı seftazidim diski çevresindeki zon çapından >5 mm daha geniş olanların GSBL ürettiğine karar verildi.



Resim 6: Seftazidim (CAZ) ve seftazidim/klavulanik asit(CAZ/CLA) diskleri ile GSBL varlığının gösterilmesi



Resim 7: GSBL pozitif *E. coli*

İstatistiksel İnceleme:

Çalışmada tanımlayıcı verilerde sayı ve yüzde, gruplar arası karşılaştırmalarda ise Chi-square (ki-kare) testi uygulandı. Verilerin analizinde SPSS 14.0 bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel analiz için $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR:

Çalışmada, diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastaların idrar ve yara yeri örneklerinden izole edilen *E.coli* suşları kullanıldı. Diyabetik olan ve olmayan iki grupta bulunan 50'şer örneğin, 36'şar adeti idrar ve 14'er adeti yara yeri izolatu olmak üzere toplamda 100 adet *E. coli* suşunun biyofilm oluşturma, tip1 fimbria ve p-pili varlığı gibi virulans faktörleri ve antibiyotik dirençleri araştırıldı.

4.1. Biyofilm oluşumu:

4.1.1. Biyofilm oluşturma ve diyabet ilişkisi:

Çalışmaya alınan toplam 100 adet *E. coli* suşunun % 84'ünün (n=84) biyofilm oluşturmadağı, % 16'sının (n=16) ise biyofilm oluşturduğu saptandı. Biyofilm oluşturan izolatların, diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruplara göre dağılımı incelendiğinde; biyofilm oluşturan suşların % 31,3'ü (n=5) diyabetik olmayan izolatlarda, % 68,8'i (n=11) diyabetik izolatlarda saptandı. Her iki gruptaki biyofilm oluşumu karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın diyabetik grupta diyabetik olmayan gruba göre yüzdelik olarak iki katın üzerinde daha fazla biyofilm oluşumu saptandı. (p=0,102) (Tablo IV)

Tablo IV:Biyoilm oluşturan izolatların DM varlığına göre dağılımı n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
Biyofilm (-)	45 (53,6)	39 (46,4)	84 (100,0)
Biyofilm (+)	5 (31,3)	11 (68,8)	16 (100,0)
Toplam	50 (100,0)	50 (100,0)	100 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır

4.1.2. İdrar ve yara yeri izolatlarının biyofilm oluşturma ve diyabet ilişkisi:

Diyabetik olan ve olmayan iki gruptan, her bir gruptan 36'şar idrar, 14'er yara yeri izolatu olmak üzere, 50'şer suş çalışıldı. İzole edilen idrar ve yara yeri örneklerinin biyofilm oluşturma ve diyabet varlığına göre dağılımı incelendiğinde; biyofilm oluşturan izolatların % 62,5'i (n=10) idrar izolatlarında , % 37,5'i (n= 6) yara yeri izolatlarında saptandı. Biyofilm oluşturan idrar izolatlarının % 60'ı (n=6) diyabetik, % 40'ı (n=4) diyabetik olmayan hastalardan; biyofilm oluşturan yara yeri izolatlarının % 83,3'ü (n=5) diyabetik, % 16,7'si (n=1) diyabetik olmayan hastalardan izole edildi. Her iki gruptaki biyofilm oluşumu karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın, biyofilm oluşum

yüzdesi diyabetik grupta diyabetik olmayan gruba göre idrar izolatları için yaklaşık birbuçuk kat; yara yeri izolatları için yaklaşık beş kat fazla bulundu. (p=0,330) (Tablo V)

Tablo V: Biyofilm oluşturan idrar ve yara yeri izolatlarının DM varlığına göre dağılımı n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
Yara yeri	1 (16,7)	5 (83,3)	6 (100,0)
İdrar	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)
Toplam	5 (31,3)	11 (68,8)	16 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır

4.1.3. Tip 1 fimbria varlığı ve diyabet ilişkisi:

Tüm izolatlarda tip 1 fimbria varlığı % 41 (n=41) olarak bulundu. Tip 1 fimbriyası olan suşların % 56,1'i (n=23) diyabetik hastalardan , % 43,9'u (n=18) diyabetik olmayan hastalardan izole edildi. Diyabetik hastalarda % 12,2 oranında daha yüksek yüzde saptandıysa da bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,309) (Tablo VI)

Tablo VI: Tip 1 fimbriyası olan izolatların DM varlığına göre dağılımı: n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
Tip 1 (-)	32 (54,2)	27 (45,8)	59 (100,0)
Tip 1 (+)	18 (43,9)	23 (56,1)	41 (100,0)
Toplam	50 (100,0)	50 (100,0)	100 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır

4.1.4. İdrar ve yara yeri izolatlarında tip 1 fimbria ve diyabet ilişkisi:

Tip 1 fimbria saptanan 41 izolatın % 22'si (n=9) yara yeri, % 78'i (n=32) idrar izolatı idi. Tip 1 fimbriyası olan idrar suşlarının % 53,1'i (n=17) diyabetlilerde, % 46,9'u (n=15) diyabetik olmayanlarda; tip 1 fimbriyası olan yara yeri izolatlarının % 66,7 'si (n=6) diyabetlilerde, % 33,3'ü (n=3) diyabetik olmayan hastalarda saptandı. İzolatlara göre her iki gruptaki tip 1 fimbria varlığı karşılaştırıldığında; diyabetik grupta yara yeri izolatlarında tip 1 fimbria varlığı iki kat daha fazla bulundu. Diyabetik grupta yara yeri izolatlarında tip 1 fimbria varlığı diyabetik olmayan gruptan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Her iki gruptaki idrar izolatlarında yine diyabetik grupta % 6 oranında daha fazla tip 1 fimbria saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,470) (Tablo VII)

Biyofilm oluşturan suşlardan % 37,5 (n=6)' inde tip 1 fimbria saptandı. Bunların üçü idrar, üçü de yara yeri izolatu olmak üzere tamamı, diyabetik hastalardan izole edildi.

Tablo VII: Tip 1 fimbriasi olan idrar ve yara yeri izolatlarının DM varlığına göre dağılımı n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
Yara yeri	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (100,0)
İdrar	15 (46,9)	17 (53,1)	32 (100,0)
Toplam	18 (43,9)	23 (56,1)	41 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır.

4.1.5. P-pili varlığı ve diyabet ilişkisi:

Tüm izolatlarda p-pili varlığı % 20 (n=20) olarak bulundu. P-pilisi olan suşların % 35'i (n=7) diyabetik hastalardan , % 65'i (n=13) diyabetik olmayan hastalardan izole edildi. (p=0,134) (Tablo VIII)

Tablo VIII: p-pilisi olan izolatların DM varlığına göre dağılımı: n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
p-pili (-)	37 (46,3)	43 (53,8)	80 (100,0)
p-pili (+)	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (100,0)
Toplam	50 (100,0)	50 (100,0)	100 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır.

4.1.6. İdrar ve yara yeri izolatlarında p-pili varlığı ve diyabet ilişkisi:

P-pili saptanan 20 izolatın % 15'i (n=3) yara yeri, % 85'i (n=17) idrar izolatu idi. P-pilisi olan idrar suşlarının % 41,2'si (n=7) diyabetlilerde, % 58,8'i (n=10) diyabetik olmayan hastalarda saptandı. P-pilisi olan yara yeri izolatlarının tamamı diyabetik olmayan izolatlardı. (p= 0,168) (Tablo IX)

Tablo IX: P-pilisi olan idrar ve yara yeri izolatlarının DM varlığına göre dağılımı: n (%)

	Diyabet		Toplam
	DM(-)	DM(+)	
Yara yeri	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (100,0)
İdrar	10 (58,8)	7 (41,2)	17 (100,0)
Toplam	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (100,0)

* Satır yüzdesi alınmıştır.

4.1.7. İdrar ve yara yeri izolatlarında p-pili ile birlikte tip 1 fimbria varlığı ve diyabet ilişkisi:

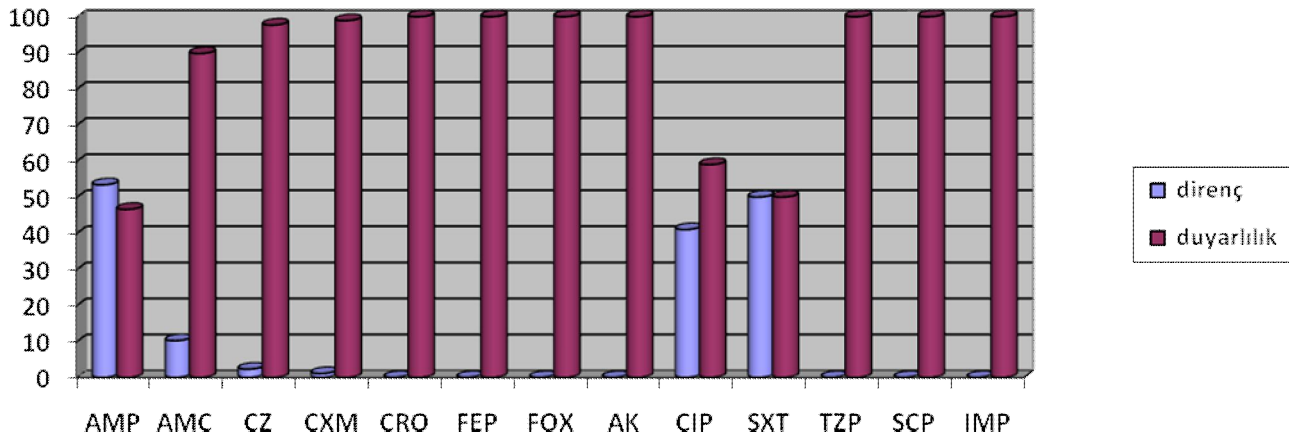
Tüm izolatlarda tip 1 fimbria ile birlikte p-pili varlığı % 10 (n=10) olarak bulundu. P-pili ile birlikte tip 1 fimbriyası olan suşların % 80'i (n=8) idrar , % 20'si (n=2) yara yeri izolatları idi. P-pili ile birlikte tip 1 fimbriyası olan idrar suşlarının % 37,5'i (n=3) diyabetlilerde, % 62,5'i (n=5) diyabetik olmayan hastalarda saptandı. P-pili ile birlikte tip 1 fimbriyası olan yara yeri suşlarının tamamı diyabetik olmayan hastalardan izole edildi.

4.2. Antibiyotik duyarlılıkları:

4.2.1. Tüm izolatlarda antibiyotik duyarlılıkları:

Çalışmada disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik diskleri; sefazolin, sefuroksim, seftriakson, sefepim, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefaperazon/sulbaktam, piperasilin/tazobaktam, imipenem, amikasin, siprofloksasin ve ko-trimaksazol olarak belirlendi. Seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit diskleri genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) -pozitif izolatları saptamak için kullanıldı.

Toplam 100 izolatın % 12'sinde (n=12) genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımı gözlemlendi. Bunun dışında tüm izolatlarda antibiyotik direnci ampisilin için % 53,4, amoksisilin/klavulanik asit için % 10,2, sefazolin için % 2,3, sefuroksim için % 1,1, siprofloksasin için % 41, ko-trimaksazol için % 50 olarak bulundu. Sefepim, sefoksitin, amikasin, piperasilin/tazobaktam, sefaperazon/sulbaktam ve imipenem dirençli izolat saptanmadı. (Şekil 10)



Şekil 10: Tüm izolatların antibiyotik direnci ve duyarlılığı

4.2.2. Antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm oluşturma ilişkisi:

Çalışmaya alınan 100 bakterinin % 84' ünün (n=84) biyofilm oluşturmadağı, % 16' sının (n=16) ise biyofilm oluşturdğı saptandı(Tablo IV). Bakterilerin biyofilm oluşturma özelliklerine göre antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel anlamlılığı karşılaştırıldı.

Biyofilm oluşturan 16 *E.coli* suşundan 1 tanesinde ve biyofilm oluşturmeyan 84 *E.coli* suşunun 11 tanesinde GSBL pozitifliği saptandığından, bu durum beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık oranı hesaplanırken dikkate alındı.

Biyofilm oluşturan 15 *E.coli* suşunun % 73,3'ü (n=11) ampisiline dirençli, % 26,7'si (n=4) duyarlı iken, biyofilm oluşturmeyan 73 *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 49,3 (n=36) ve % 53,7 (n=37) olarak saptandı. Bu bulgularla, biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlar karşılaştırıldığında; biyofilm oluşturan bakterilerin ampisilin direnci biyofilm oluşturmeyan suşlardan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,089) (Şekil 11)

Biyofilm oluşturan 15 *E.coli* suşunun % 13,3'ü (n=2) amoksisilin/klavulanik asite dirençli, % 86,7'si (n=13) duyarlı iken, 73 biyofilm oluşturmeyan *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 9,5 (n=7) ve % 90,5 (n= 66) olarak saptandı. Bu bulgularla, biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda amoksisilin/klavulanik asit duyarlılıkları karşılaştırıldığında; biyofilm oluşturan bakterilerin amoksisilin/klavulanik asit direnci biyofilm oluşturmeyan suşlardan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,663) (Şekil 11)

Biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda sefazolin duyarlılıkları karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan suşların tamamının sefazoline duyarlı olduğu, biyofilm oluşturmeyan suşlarda ise sefazolin direncinin % 2,7 (n=2), duyarlılığının ise % 97,3 (n=71) olduğu görüldü. Bu bulgularla, biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda sefazolin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Şekil 11)

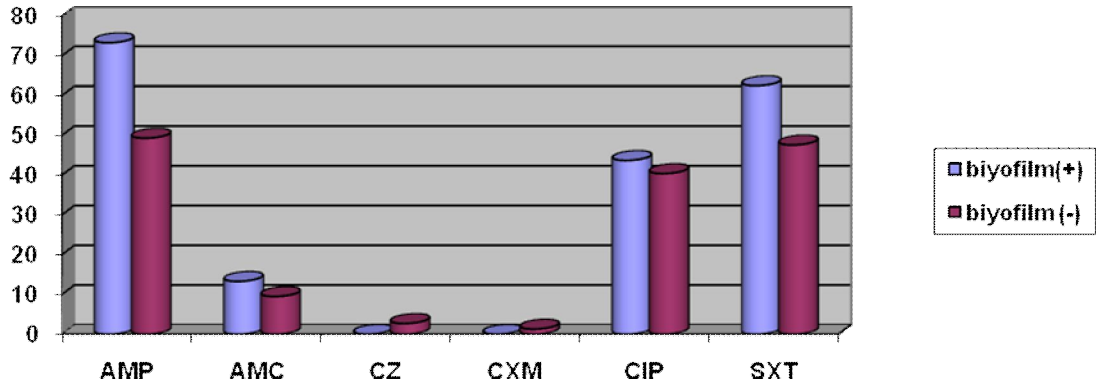
Biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda sefuroksim duyarlılıkları karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan suşların tamamının sefuroksime duyarlı olduğu, biyofilm oluşturmeyan suşlarda ise sefuroksim direncinin % 1,3 (n=1), duyarlılığının ise % 98,7 (n=72) olduğu görüldü. Bu bulgularla biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda sefuroksim duyarlılıkları karşılaştırıldığında, aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Şekil 11)

Biyofilm oluşturan 16 *E. coli* suşunun % 43,7'si (n=7) siprofloksasine dirençli, % 56,3 'ü (n=9) duyarlı iken, biyofilm oluşturmeyan 84 *E. coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 40,4

(n=34) ve % 59,6 (n=50) olarak saptandı. Bu bulgularla biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda siprofloksasin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, biyofilm oluşturan bakterilerin siprofloksasin direnci biyofilm oluşturmeyan suşlardan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,807) (Şekil 11)

Biyofilm oluşturan 16 *E. coli* suşunun % 62,5'i (n=10) ko-trimaksazole dirençli, % 37,5 'i (n=6) duyarlı iken, biyofilm oluşturmeyan 84 *E. coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 47,6 (n=40) ve % 52,4'ü (n=44) olarak saptandı. Bu bulgularla biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlarda ko-trimaksazol duyarlılıkları karşılaştırıldığında, biyofilm oluşturan bakterilerin ko-trimaksazol direnci biyofilm oluşturmeyan suşlardan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p=0,275) (Şekil 11)

Biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan tüm suşlar sefepim, sefoksitin, amikasin, piperasilin/tazobaktam, sefaperazon/sulbaktam ve imipeneme duyarlı saptandı.



Şekil 11: Biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan izolatlarda antibiyotik direnci

4.2.3. Antibiyotik duyarlılıkları ve diyabet ilişkisi:

Çalışmaya 50'si diyabetik, 50'si diyabetik olmayan hastalardan olmak üzere toplam 100 adet *E.coli* izolatu dahil edildi. Diyabetik olan ve olmayan gruplarda antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırıldı.

Diyabetik grupta dört adet, diyabetik olmayan grupta sekiz adet GSBL pozitif *E. coli* izolatu saptandığından bu durum beta-laktam antibiyotiklerin duyarlılık oranı hesaplanırken dikkate alındı.

Diyabetik grupta 46 adet *E.coli* suşunun % 58,7 'sı (n=27) ampisiline dirençli, % 41,3'ü (n=19) duyarlı iken, diyabetik olmayan gruptaki 42 *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 47,6 (n=20) ve % 52,4 (n=22) olarak saptandı. Bu bulgularla diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar karşılaştırıldığında; diyabetik gruptaki bakterilerin

ampisilin direnci diyabetik olmayan gruptan fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.(p=0,294) (Şekil 12)

Diyabetik grupta 46 adet *E.coli* suşunun % 6,5 'i (n=3) amoksisilin/klavulanik asite dirençli, % 93,5'i (n=43) duyarlı iken, diyabetik olmayan gruptaki 42 *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 14,3 (n=6) ve % 85,7 (n=36) olarak saptandı. Bu bulgularla diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar karşılaştırıldığında; diyabetik olmayan gruptaki bakterilerin amoksisilin/klavulanik asit direncinin diyabetik gruptan yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görüldü. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.(p=0,230) (Şekil 12)

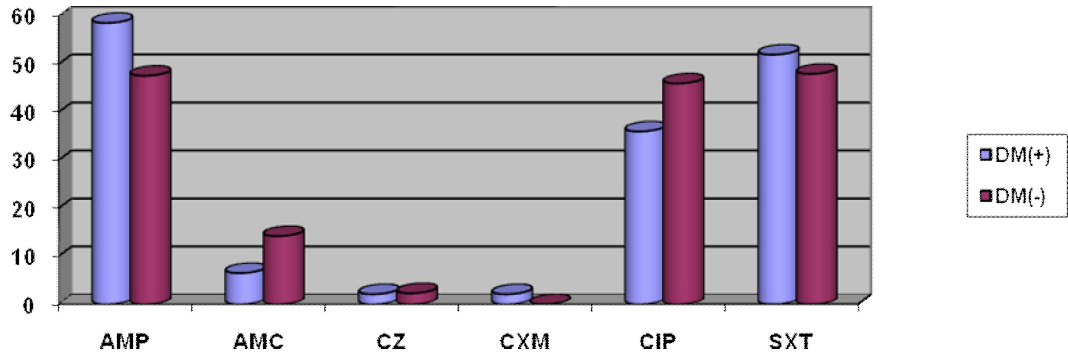
Diyabetik grupta 46 adet *E.coli* suşunun % 2,2 'si (n=1) sefazoline dirençli, % 97,8'i (n=45) duyarlı iken, diyabetik olmayan gruptaki 42 *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 2,4 (n=1) ve % 97,6 (n=41) olarak saptandı. Bu bulgularla diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar sefazolin direnci açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı.(p=0, 948) (Şekil 12)

Diyabetik olan ve diyabetik olmayan suşlarda sefuroksim duyarlılıkları karşılaştırıldığında; diyabetik olmayan gruptaki suşların tamamının sefuroksime duyarlı olduğu, diyabetik gruptaki suşlarda ise sefuroksim direncinin % 2,1 (n=1), duyarlılığının ise % 97,9 (n=45) olduğu görüldü. Bu bulgularla her iki grup arasında sefuroksim duyarlılığı açısından fark bulunmadı. (Şekil 12)

Diyabetik grupta 50 adet *E.coli* suşunun % 36 'sı (n=18) siprofloksasine dirençli, % 64'ü (n=32) duyarlı iken, diyabetik olmayan gruptaki 50 *E.coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 46 (n=23) ve % 54 (n=27) olarak saptandı. Bu bulgularla diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar siprofloksasin direnci açısından karşılaştırıldığında; diyabetik olmayan grupta siprofloksasin direnci yüzdesi daha fazla bulunsa da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.(p=0,309) (Şekil 12)

Diyabetik grupta 50 adet *E. coli* suşunun % 52 'si (n=26) ko-trimaksazole dirençli, % 48'i (n=24) duyarlı iken, diyabetik olmayan gruptaki 50 *E. coli* suşunda bu oranlar sırasıyla % 48 (n=24) ve % 52 (n=26) olarak bulundu. Bu bulgularla diyabetik ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar ko-trimaksazol direnci açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.(p=0,689) (Şekil 12)

Diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruplardaki tüm suşlar sefepim, sefoksitin, amikasin, piperasilin/tazobaktam, sefaperazon/sulbaktam ve imipeneme duyarlı saptandı.



Şekil 12: DM(+) ve DM(-) izolatlarda antibiyotik direnci

TARTIŞMA:

Diyabetes mellitus toplumda sık görülen, glikoz metabolizmasının bozulmasıyla karakterize, otoimmün, endokrin bir hastalıktır [23]. Diyabetik hastalar hiperglisemi, obezite, nöropati, yetersiz doku perfüzyonu ve yara iyileşmesinin gecikmesi nedenleriyle infeksiyonlara yatkınlık gösterirler [30]. Diyabetli hastalarda bozulan endotel fonksiyonu ve gelişen hipergliseminin neden olduğu nötrofil ve makrofaj fonksiyon bozuklukları, kemotaksi, fagositoz, adherans ve mikroorganizmaların hücre içi öldürülmesi gibi fonksiyonlardaki bozulma infeksiyonlara yatkınlık mekanizmalarını oluşturur.

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve kendisini oluşturan mikroorganizmaların içinde gömülü bulunduğu ekstrasellüler polimerik polisakkarid matriks yapısıdır [104]. Bakteriler, birçok canlı ve cansız yüzeye yapışır ve biyofilm oluşturarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar [12]. Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir [13-15].

Bakteriler tercihan olumsuz ortamlarda biyofilm yaparlar [17]. Bakteriler strese yanıt, kolonizasyon, topluluk oluşturma, yaşanabilir çevre geliştirme nedenleri ile biyofilm oluştururlar. Özellikle ortamdaki glikozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının, pseudomonaslar, *V. cholerae*, *E.coli* ve stafilokokların EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir [18,19].

Biyofilmin yapısı saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Biyofilmin gelişme potansiyeli; yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alınımı, atıklarının uzaklaştırılması, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu eksprese olan quorum sensing moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O₂ perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite ile de ilişkilidir [119,129,192,254-257]. Biyofilm oluşumu besine bağımlı bir olaydır [121]. *E.coli*'nin biyofilm oluşturma potansiyeli dış uyaranlardan ve ortam şartlarından kolayca etkilenir [104,175,258,259]. Mao ve ark.'nın çalışmasında *E.coli*'nin sentezlediği kolanik asit miktarının besiyeri ile değişiklik gösterdiği saptanmıştır [260]. Biyofilm oluşum hipotezini destekleyen diğer bir bulgu da, karbon katabolitlerini indükleyen gen regülasyonunun biyofilm oluşumunda kritik rol oynadığı bulgusudur. Eksopolisakkarit ekspresyonu ve biyofilmin genişlemesi, glikoz ya da diğer kullanılabilir karbon kaynaklarının bol olması durumunda, pseudomonaslar, *V. cholerae*, *E. coli*, stafilokoklar ve streptokoklar gibi bazı bakterilerde önemli ölçüde artmıştır [117,261,262]. Glikozun EPS sentez yolunda basit bir

substrat olduğu düşünölmektedir ve EPS yapısını transkripsiyonal regölasyon düzeyinde arttırdığı görölmüştür [261]. Yüksek glikoz düzeylerinin ve osmolaritenin biyofilm oluşumu için en güçlü uyarıcı olduğu [229], *E.coli*'nin büyüme dinamiklerini insuline yanıt olarak değıştirdiğı [263], insulitle birlikte glikoz varlığının adheransı arttırarak kolonizasyonu güçlendirdiğı ve bu insulin-aracılı değışikliklerin de glikoza bağı olduğu [264], glikoz metabolizması ve kemotaksi arasında ilişki olduğu saptanmıştır [265].

Bunlara tezat olarak; Jackson ve ark.'nın çalışmasında ortama glikoz eklenmesi biyofilm oluşumunu inhibe ederken [141]; bir diğeri çalışmada ortama sodyum klorür (NaCl) ve sukroz eklenmesi, in vivo *csgA* ekspresyonunu azaltarak biyofilm oluşumunu azaltmıştır [115]. Bu iki çalışma biyofilm oluşumunun ortam konsantrasyonundan çok çabuk etkilendiğini göstermektedir.

E. coli suşları klinik örneklerden en sık izole edilen ajanlardır. *E. coli*'nin hücre yüzey virulans faktörleri tip 1 fimbria ve P, S, X faktörü (Dr Hemagglütinin) içeren tip 2 fimbria gibi konak hücreye adezyonda etkili yüzey yapılarıdır [21]. Bunlar (flagella, tip 1 fimbria, curli ve Ag43) [126] epitelyum hücrelerine bakteriyel adezyonu, invazyonu, biyofilm oluşumunu arttırmaları [22].

Bu bilgiler ışığı altında, diyabetik olan ve olmayan hasta gruplarından izole edilen *E. coli* suşlarının biyofilm oluşumu, antibiyotik direnci ve virulans faktörlerinin karşılaştırılması açısından ilk çalışma özelliğinde olan bu tez çalışmasında hipotezimiz; hipergliseminin, bir çok kaskad ve fonksiyonları etkilemesi nedeniyle, ortaya çıkan yapı ve fonksiyon bozukluklarının biyofilm oluşumunu arttıracığı; buna bağı olarak, biyofilmin mikroorganizma virulansını arttıracığı ve antibiyotiklere karşı daha direçli hale getireceğı, dolayısıyla diyabetik hastalardan izole edilen suşlarda daha yüksek oranda antibiyotik direncinin saptanacağı idi.

Yapılan çalışmalarda *E. coli* için % 38- % 92 gibi farklı biyofilm oluşturma oranları saptanmıştır [175, 266]. Bizim çalışmamızda, tüm izolatlarda biyofilm oluşturma oranı %16 olarak bulunmuştur. Biyofilm oluşumu ve diyabet durumu değerlendirildiğinde, diyabetik grupta biyofilm oluşumunun daha fazla olduğı gözlenirken, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış, ancak diyabetik grupta diyabetik olmayan gruba göre iki katın üzerinde artmış biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Tip 1 fimbria, patojen olmayanlar da dahil olmak üzere pek çok *E.coli* suşunda bulunur, 'ortak pili' olarak adlandırılır. Başlıca kobay eritrositlerinde mannoza duyarlı hemagglütinasyon (MSHA) oluşması ile anlaşılır. Tip 1 fimbria, biyofilm oluşumunda başlangıç tutunma için gereklidir [121]. Tip 1 fimbria genotipi *E. coli* suşlarında % 92-100

gibi oldukça yüksek oranlarda bulunur [267-269]. Buna karşın fenotip % 14-90 gibi değişken oranlarda gözlenmektedir [269-271].

Bizim çalışmamızda tüm izolatlarda fenotipik olarak % 41 oranında tip 1 fimbria varlığı saptanmıştır. Diyabetik hastalarda tip 1 fimbria oranı daha yüksek gözlenmiştir. Özellikle diyabetik hastaların yara yeri kültürlerinde, artmış biyofilm oluşumu ve ortak fimbria olan tip 1 fimbria varlığı; sürekli hipergliseminin ve osteomyelit, diyabetik ayak enfeksiyonu gibi kronik enfeksiyonların, mikroorganizmayı biyofilm oluşturma yönünde sürekli uyardığını düşündürmektedir.

Tip 1 fimbria mesane epiteline tutunmayı, kolonizasyonu artırır ve sistit ile ilişkilidir [246,272,273]. Geerlings ve arkadaşlarının çalışmasında tip 1 fimbriyası olan *E. coli* suşlarının üroepitelyal hücrelere yapışma oranı incelenmiş ve diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre iki kat artmış olarak bulunmuştur. Bu durum diyabetik üroepitelyal hücrelerdeki tip 1 fimbria reseptörlerinin farklı glikolizasyonu ile ilişkilendirilmiştir [274]. Geerlings başka bir çalışmasında ise asemptomatik bakteriürisi bulunan diyabetik kadın hastaların idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında tip 1 fimbria üretimini % 86 olarak belirlemiş ve tip 1 fimbria üretiminin asemptomatik bakteriürisi bulunan diyabetik kadınlarda yaygın bir virulans faktörü olduğunu göstermiştir [275]. Bizim çalışmamızda da diyabetik hastaların idrar izolatlarında tip 1 fimbria daha fazla saptanmıştır. Biyofilm oluşturan suşlardan tip 1 fimbriyası olanlara baktığımızda ise hepsinin diyabetik hastalardan izole edildiği görülmektedir. Bu bulgular, diyabetik hastalarda adherens ve biyofilm oluşumunun daha fazla olabileceğini ve bu nedenle diyabetli hastalarda sık oluşan ve tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonlarının patogenezi açıklar niteliktedir.

P-fimbria *E.coli* 'nin yüzey adhezinlerindendir. Mannoza dirençli hemagglütinasyondan (MRHA) sorumludur ve böbrek epiteline spesifik yapışmayı indükler [276]. Akut piyelonefrit gelişiminde major bir virulans faktörü olduğu düşünülmektedir [252]. Hagberg ve ark. piyelonefritli hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarında MRHA üretimini % 77, akut sistitli hastalardan izole edilen suşlarda % 35 ve asemptomatik bakteriürisi olan hastalarda % 18 olarak tespit etmişler ve piyelonefrite yol açan suşlarda MRHA üretiminin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [277]. Bizim çalışmamızda ise tüm izolatlarda p-pili varlığı % 20 olarak bulunmuştur. P-pili üretimi diyabetik olmayan hastalarda daha fazla gözlenmiştir. P-pili saptanan izolatların % 85'i beklenildiği üzere, idrar örneklerinden temin edilmiştir ancak P-pilisi olan idrar suşlarının diyabet varlığına göre dağılımında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tüm izolatlarda tip 1 fimbria ile birlikte p-pili varlığı değerlendirildiğinde bu oran % 10 olarak bulunmuş, bu suşların % 80'i idrar , % 20'si yara yeri örneklerinden temin edilmiştir. Bu bulgular tip 1 fimbria ve p-pilin üriner sistem infeksiyonlarında önemli virulans faktörleri olduğunu göstermektedir.

Antibiyotik dirençleri irdelendiğinde, son yıllarda *E. coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) direncinin arttığı gözlenmektedir. Bu durum klinikte tedavi seçeneklerini kısıtlamakta, mortalite ve morbiditeye neden olmakta, hastanede yatış süresini ve maliyeti artırmaktadır [278]. *E.coli* suşlarında GSBL üretimi için Kuzey Amerika'da % 3,3-4,7, Güney Amerika'da % 6,7-25,4, Uzak Doğu'da % 7,9-23,6, Avrupa'da % 5,3, Türkiye'de % 13-36 gibi oranlar bildirilmektedir [279,280]. Korten ve ark. nın yaptıkları MYSTIC çalışmasında, Türkiye'de 2000-2003 yılları arasında *E.coli* suşlarının GSBL pozitiflik oranları % 15,6'dan % 32,1'e yükselmiştir [281]. Gür ve ark.'nın yaptıkları HİTİT-2 surveyans çalışmasında ise *E. coli*' lerin % 42 (merkezlere göre % 20 -% 77,1) oranında GSBL ürettiği belirlenmiştir [282]. Çalışmamızda tüm izolatlarda antibiyotik dirençlerine bakıldığında % 12 oranında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımı gözlenmiştir.

GSBL pozitif bakterilerde karbapenem dışı diğer antibiyotiklere özellikle florokinolonlara yüksek direnç oranları bildirilmektedir [278]. HİTİT-2 çalışmasında bu oran % 84 olarak bildirilmiştir [282]. Yetkin ve ark. nın idrar izolatı *E.coli*' leri içeren çalışmasında, GSBL pozitif ve GSBL negatif *E.coli*' lerde siprofloksasin ve ko-trimaksazol dirençleri sırasıyla % 79-23 ve % 63-44 olarak tespit edilmiştir [283]. Yapılan diğer çalışmalarda GSBL pozitif *E.coli* suşlarında piperasilin/tazobaktam % 35-82 [284], amikasin % 6-17 [285] oranlarında direnç saptanmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde GSBL pozitif izolatlarda diğer grup antibiyotiklere direnç oranlarının yüksek olduğu gözlenmiştir. GSBL pozitif ve negatif *E.coli* izolatlarında siprofloksasin direnci sırasıyla % 83,3 ve % 35,2, ko-trimaksazol direnci sırasıyla % 91,6 ve % 44,3 olarak bulunmuştur. GSBL üreten *E.coli*' lerde amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı % 0, piperasilin/tazobaktam, sefaperazon/sulbaktam duyarlılıkları her iki beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü için de % 100 olarak bulunmuştur. Tüm GSBL pozitif ve negatif *E.coli*' ler sefoksitine duyarlı saptanmıştır.

Son yıllarda ampisiline karşı yüksek direnç oranları saptanmaya başlamıştır ve bu nedenle ampisilin kullanım alanını oldukça sınırlandırmıştır [286]. Bu direnç, beta-laktamaz inhibitörleri ile aşılmaya çalışılabilir. Ancak ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine aminopenisilinlere karşı bildirilen direnç oranları da yüksek bulunmuştur. Otağ ve ark. idrar örneklerinden izole ettikleri 300 *E.coli* suşunda

% 30,3 oranında amoksisilin-klavulanik asit direnci saptamışlardır [287]. Bizim çalışmamızda tüm izolatlarda ampisilin direnci % 53,4, amoksisilin/klavulanik asit direnci % 10,2 olarak bulunmuştur. Sefalosporinlere karşı önemli bir direnç saptanmamıştır.

Kinolonlar, yüksek oranda bakteriyolojik ve klinik iyileşme sağladığından sık kullanılan ilaçlar arasındadır. Kinolonların yaygın kullanımı nedeniyle toplum kaynaklı *E.coli* suşlarında da kinolon direncinde artış olduğu bildirilmektedir [288]. Ülkemizde *E. coli* için siprofloksasin direnç oranı % 58'lere ulaşmaktadır [282]. Yıllar içindeki artan direnç oranları, ülkemizde kinolon direncinin önemli bir problem olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da %41 oranında siprofloksasin direnci tespit edilmiştir.

Toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde trimetoprim-sulfametoksazol halen yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir [289]. Ülkemizde toplum kökenli üriner sistem infeksiyonlarından saptanan *E.coli* suşlarında ko-trimaksazol direnci % 23-67,5 gibi birbirinden oldukça farklı oranlarda bildirilmektedir [290-291]. Bizim çalışmamızda ko-trimaksazol direnç oranı % 50 gibi yüksek bir oranda saptanmıştır. Hem siprofloksasin hem de ko-trimaksazol dirençlerinin yüksek oranlarda saptanması özellikle üriner sistem infeksiyonlarında bu iki ajanın ampirik kullanımının sık olması ile ilişkilendirilebilir.

Aminoglikozidler günde tek doz uygulanabilme kolaylığı da göz önüne alındığında alternatif tedavide kullanılabilen ajanlardır. Ancak, oral kullanımlarının olmayışı bu antibiyotiklerin en önemli dezavantajlarıdır. Üriner sistem infeksiyonu etkeni olan *E. coli* izolatları için değişik amikasine direnç oranları bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda Tolun ve ark. [292] hastane kaynaklı *E.coli* izolatlarında amikasin direncini % 1,9; Altıparlak ve ark. [293] duyarlılığı % 90,8 oranında saptamışlardır. Yurt dışında yapılan çalışmalarda ise Valdivieso ve ark. amikasine % 1,3 oranında direnç bildirmişlerdir [294]. 2008 European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) verilerine göre üropatojenik olmayanlar da dahil tüm *E. coli* suşlarında aminoglikozid direnci % 9,3, Türkiye için bu oran % 25-50 arasında bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan aminoglikozid olan amikasine karşı direnç saptanmamıştır.

Sonuç olarak *E. coli* suşlarında giderek artan aminopenisilin, siprofloksasin ve ko-trimaksazol dirençleri bizim izolatlarımızda da yüksek oranda saptanmıştır.

Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları, mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisi, azalmış biyofilm-spesifik fenotiplerin (alt populasyonların) olması, değiştirilebilir gen

ekspresyonu ve quorum sensing sistemidir. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre 200-500 kat daha dirençlidir [118]. Ceri ve ark. [172] biyofilm üreten *E. coli*' de 3-log azalma için gerekli ampisilin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerini >500 kat daha fazla, Williams ve arkadaşları ise biyofilm oluşturmuş *S.aureus*'ta 3- log azalma için vankomisin minimum bakterisidal konsantrasyonunda (MBC) >10 kat artış saptamışlardır [295].

Antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonları biyofilm matriks yapımını indükler ve daha fazla biyofilm yapılmasını sağlar [296]. Sonuç olarak, yüksek hücre yoğunluğu, artmış genetik kompedans ve biyofilmdeki hareketli genetik elemanlar sayesinde horizontal gen transferi sağlanır [297]. Horizontal gen transferi oral ve intestinal florada oluşturulan polimikrobiyal biyofilmler ve kazanılan antibiyotik dirençleri açısından önemlidir [298].

Biyofilm oluşturma özelliği ile antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiye bakıldığında; çalışmamıza dahil edilen biyofilm oluşturan bakterilerin ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol direncinin biyofilm oluşturmayan bakterilerden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Biyofilm oluşturan izolatlarda ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol dirençleri sırasıyla % 73,3, % 13,3, % 43,7 ve % 62,5 olarak saptanırken, biyofilm oluşturmayan izolatlarda bu oranlar sırasıyla sırasıyla % 49,3, % 9,5, % 40,4 ve % 47,6 oranında bulunmuştur. Bu sonuçlara göre biyofilm oluşturan izolatlarda ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol için sırasıyla % 24, % 3,8, % 3,3 ve % 14,9 oranlarında artan direnç varlığı saptanmış ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Diyabet varlığı ile antibiyotik direnci arasında direkt bir ilişkili mevcut değildir. Ancak diyabetik hastalarda infeksiyonlara karşı artmış yatkınlık olması, sık ve tekrarlayan infeksiyonlar nedeniyle uzun süreli antibiyotik kullanma gerekliliği nedenleriyle bu hastalarda normal popülasyona göre artmış antibiyotik direnci olması beklenebilir. Ayrıca diyabetik hastalarda gastroparezi, hiperglisemi, gastrointestinal sistemin mikrovasküler değişiklikleri nedeniyle ilaç farmakodinamik ve farmakokinetikleri etkilenmektedir. Diyabette gelişen mikrovasküler değişiklikler sonucu ilaçların düşük kan düzeyinde kalması, klinik yanıtsızlığa ve sonuçta ilaç direncine neden olabilir. Yapılan bir çalışmada, tip 1 diyabetli hastalarda *Helicobacter pylori* eradikasyonu üçlü rejimi kullanıldığında % 62, dördümlü rejimi kullanıldığında ise % 88 olarak saptanmıştır [299].

Sonuç olarak *E. coli* klinik örneklerden en çok izole edilen mikroorganizmalardan biridir. *E. coli*' nin biyofilm oluşturma özelliklerinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamızda diyabetik olan ve diyabetik olmayan gruptaki izolatlar

karşılaştırıldığında, diyabetik izolatların % 68,8'nin, diyabetik olmayan izolatların % 31,3'ünün biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan idrar izolatlarının % 60'ı diyabetik, % 40'ı diyabetik olmayan hastalardan; biyofilm oluşturan yara yeri izolatlarının % 83,3'ü diyabetik, % 16,7'si diyabetik olmayan hastalardan, Tip 1 fimbriyası olan suşların ise % 56,1'i diyabetik hastalardan , % 43,9'u diyabetik olmayan hastalardan izole edilmiştir. Tip 1 fimbriyası olan idrar suşlarının % 53,1'i diyabetlilerde, % 46,9'u diyabetik olmayanlarda; tip 1 fimbriyası olan yara yeri izolatlarının % 66,7 'si diyabetlilerde, % 33,3'ü diyabetik olmayan hastalarda saptanmıştır. Antibiyotik dirençleri açısından bakıldığında, biyofilm oluşturan izolatların ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol dirençlerinin biyofilm oluşturmayan izolardan, diyabetik gruptaki izolatların ampisilin, sefuroksim ve ko-trimaksazol dirençlerinin de diyabetik olmayan izolatlardan daha fazla olduğu görülmüştür. Diyabetik izolatlarda ampisilin, sefuroksim ve ko-trimaksazol dirençlerinin sırasıyla % 11, % 2,1 ve % 4 oranında artış gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamız klinik *E. coli* izolatlarının oluşturduğu biyofilm oluşumunun incelendiği az sayıdaki çalışmalardan biridir. Çalışmanın önemli bir özelliği de diyabetik olan ve olmayan hastalardan toplanan *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturma, bunların idrar ve yara yeri gibi farklı kültürlerle göre karşılaştırılması yanında; aynı suşların fimbria ve antibiyotik direnci gibi diğer virulans özelliklerinin topluca incelendiği ve karşılaştırıldığı ilk çalışma olmasıdır.

SONUÇ:

Diyabet ve infeksiyon patogenezi karmaşık ve çok faktörlü bir ilişki içerisinde. Diyabetik hastalar pek çok faktöre bağlı olarak infeksiyonlara daha yatkındırlar. İnfeksiyon gelişiminde birçok mekanizma ve mediatör rol alır. Esas olarak diyabette gelişen endotel fonksiyon bozuklukları ve immün sistemdeki bozukluklar infeksiyon gelişiminden sorumludur.

Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik infeksiyonlara kadar çok geniş bir yelpazede infeksiyon patogenezinde rol oynamaktadırlar. Biyofilm yapısını, oluşumunu ve fonksiyonlarını araştıran çalışmalar sürmektedir. Bu çalışmalar arasında biyofilm oluşumunu belirleyen genetik modülasyonlar kadar, biyofilm infeksiyonlarını tedavi etmeye ve biyofilmi eradike etmeye yönelik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *viridans streptokoklar*, enterokoklar, aktinomiçesler, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *V. cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida spp.* gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir.

Biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeylere adheransının, biyofilm oluşturmayan bakterilere oranla daha fazla olduğu, antibiyotiklere direnç göstererek infeksiyöz hastalıkların tedavi sürelerini uzattıkları, tedavi başarısızlarına neden oldukları bilinmektedir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar antibiyotiklerin etkilerine karşı korunurlar ve biyofilm üreten bakterileri eradike etmek için minimal inhibitör konsantrasyonunun 1000 katına ulaşan konsantrasyonlarda antibiyotik dozunun gerekebildiğini bildirilmiştir. Bu çalışmada da antibiyotiklere dirençli suşların daha çok biyofilm oluşturan suşlar olduğu dikkati çekmektedir.

Biyofilmin kesin yapısı belirlenememekle birlikte, karbonhidratların biyofilm yapı ve fonksiyonlarında başrolü oynadığı düşünülmektedir. Diyabetli hastalarda biyofilm oluşumunun incelendiği geniş seride farklı çalışmalar bulunmasa da diyabetin infeksiyona yatkınlık mekanizmalarının dışında, süregelen hipergliseminin bakteriyi indükleyerek karbonhidrat yapısındaki biyofilm oluşumunu arttırabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda da kronik hipergliseminin ve buna sekonder olarak ortaya çıkan değişikliklerin sonucu olarak diyabetik hastalardan izole edilen suşlarda daha fazla biyofilm oluşumu görülmüştür. Özellikle, biyofilm oluşturan idrar ve yara yeri izolatlarının diyabetik izolatlarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşumunun ilk basamağını sağlayan tip 1 fimbria varlığı açısından incelendiğinde ise, diyabetik hastaların hem idrar hem de yara yeri izolatlarında daha fazla tip 1 fimbria yapımı bulunmuştur. Diyabetik hastaların idrar izolatlarında artmış tip 1 fimbria yapımı ve biyofilm oluşumunun, tekrarlayan, tedavisi güç ve

çoklu ilaca dirençli üriner sistem infeksiyonlarına yol açabileceği, yara yeri izolatlarında artmış tip 1 fimbria varlığının ise; sürekli hipergliseminin ve osteomyelit, diyabetik ayak infeksiyonu gibi kronik infeksiyonların da etkisiyle, mikroorganizmayı biyofilm oluşturma yönünde sürekli uyarması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. P-pili yapımı ve izolatlara göre dağılımı açısından diyabetik grubun üstünlüğünü gösterecek veriler elde edilmemiştir.

Bu sonuçlara göre, hipergliseminin ve hiperglisemiye bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar sürecin meydana getirdiği değişikliklerin biyofilm oluşumunu arttırdığı, tip 1 fimbrianın biyofilm oluşumunu başlatan kolonizasyonu sağladığı ve biyofilm oluşturan izolatlarda antibiyotik direncinin daha fazla olduğu bilgilerinden yola çıkarak; çalışmamızda izole edilen suşlardan diyabetik hastalara ait olanlarda daha fazla biyofilm oluşumu, fenotipik olarak daha fazla tip 1 fimbria varlığı ve ampisilin, sefuroksim ve ko-trimaksazol antibiyotiklerine karşı artmış direnç, biyofilm oluşturan bakterilerde ise ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol antibiyotiklerine karşı artmış direnç saptanmıştır.

DIYABETİK HASTALARDA BAKTERİLERİN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

ÖZET:

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

Amaç: Diyabetik hastalar pek çok faktöre bağlı olarak infeksiyonlara daha yatkındırlar. Özellikle bazı yumuşak doku infeksiyonları (nekrotizan fasciit, furnier gangreni gibi), *S. aureus* ve Gram-negatif bakteri pnömoniler ve asemptomatik bakteriüri sıklığı diyabetik olmayanlara göre artmıştır. Tüm bunların oluşumunda diyabetik hastaların savunma sistemlerindeki yetersizliklerin yanı sıra endotel fonksiyon bozuklukları ve bakterinin farklı ortamlarda yaşama özelliklerinin etkili olduğuna dair veriler mevcuttur. Diyabetik hastalarda değişen gliseminin bakteri direnç, biyofilm oluşumu ve diğer virulan faktörlerde değişiklikler oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastalardan izole edilen aynı türdeki bakterilerin; biyofilm oluşturma, virülans faktörleri ve direnç farklılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastaların idrar ve yara yeri örneklerinden izole edilen toplam 100 adet *Escherichia coli* suşu kullanıldı. Biyofilm faktörün belirlenmesinde kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi, p-pili ve tip 1 fimbria varlığının tespitinde hemagglütinasyon yöntemi kullanıldı. Kantitatif mikrodilüsyon plak yönteminde 595 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) optik dansitesi 0,8' den büyük olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edildi. Bakteri fimbria tespitinde her bir bakteri için % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında ve % 2,5 α -methyl-D-mannoside yokluğunda koyun eritrositleri ile hemagglütinasyon verenlerde p-fimbria olduğu, % 2,5 α -methyl-D-mannoside varlığında kobay eritrositleri ile hemagglütinasyon vermeyip % 2,5 α -methyl-D-mannoside yokluğunda hemagglütinasyon verenlerde tip 1 fimbria olduğu sonucuna varıldı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzuna uygun olarak Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Çalışmada tanımlayıcı verilerde sayı ve yüzde, gruplar arası karşılaştırmalarda ise Chi-square (ki-kare) testi uygulandı. Verilerin analizinde SPSS 14.0 bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel analiz için $p \leq 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

Bulgular: Çalışmanın sonunda diyabetik olan ve olmayan hastalardan izole edilen *E. coli* suşları, biyofilm oluşturma, virulans faktörleri ve antibiyotik dirençleri incelendiğinde; diyabetik grupta biyofilm oluşum yüzdesi diyabetik olmayan gruba göre iki kat fazla saptandı ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diyabetik hastalarda tip 1 fimbria ekspresyonu % 12,2 oranında daha yüksek yüzde saptandıysa da bu değer de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Biyofilm oluşturma özelliği ile antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiye bakıldığında biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotik direncinin daha fazla olduğu gözlenirken, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışmamıza dahil edilen biyofilm oluşturan bakterilerin ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol direncinin biyofilm oluşturmeyan bakterilerden daha fazla olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Bu tez çalışmasında diyabetik olan ve diyabetik olmayan hastalardan izole edilen aynı türdeki bakterilerin; biyofilm oluşturma, virülans faktörleri ve direnç farklılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da diyabetik izolatlarda daha fazla biyofilm oluşumu, daha fazla tip 1 fimbria ekspresyonu, biyofilm oluşturan izolatlarda daha fazla ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, siprofloksasin ve ko-trimaksazol direnci saptanmıştır. Bu sonuç, diyabetik hastalarda altta yatan enfeksiyona yatkınlık mekanizmaları ile biyofilm oluşum patogenezinin anlaşılmasıyla birlikte bu hastaların enfeksiyöz hastalıklarının takip ve yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Ancak bu konuda karşılaştırmalı daha çok çalışmaya gereksinim vardır. Ayrıca çalışmamız diyabetik ve diyabetik olmayan hastaların örneklerinden izole edilen *E. coli* 'lerin biyofilm oluşturma, fimbria yapısı, bu özelliklerin idrar ve yara yeri kültürlerine göre karşılaştırılması yanında aynı suşların antibiyotik direnci ve tüm virulans faktörlerinin birbirleriyle ilişkileri gibi özelliklerinin topluca incelendiği ilk çalışma niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: diyabet, biyofilm, enfeksiyon

İletişim Adresi: Dr. Pelin Gençer Oruç

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

AYDIN

pgencer@hotmail.com

FENOTYPIC CHARACTERISTICS of BACTERIA in DIABETIC PATIENTS

SUMMARY:

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

Aim: Diabetes mellitus is one of the oldest diseases known to mankind. Diabetic patients tend to have infections due to many factors. Expecially, prevalence of some of soft tissue infections, (necrotizing fasciitis, fournier gangren etc.), *Staphylococcus aureus* and Gram-negative pneumoniae and asymptomatic bacteriuria are increased than non-diabetic patients. In these events, there are data about defects in diabetic patients' immun system with endotel dysfunction and the surviving properties of the bacteria in different conditions. It is thought that in diabetic patients altering values of glisemia triggers the antibiotic resistance, biofilm production and the other virulan characteristics of bacteria. From this point, in our study we purposed to find differences between biofilm production, virulance factors and antibiotic resistance of same species of bacteria isolated from diabetic and non-diabetic patients.

Material and Methods: In this study we examined 100 *Escherichia coli* obtained from urine and wound cultures of diabetic and non-diabetic patients. The slime production, type1 and p-pili expression of all strains were studied by quantitative microdilution plate method and hemagglütitation method respectively. The antibiotic susceptibility of strains was determined by disc diffusion method as recommended by CLSI. In quantitative microdilution plate method optical density (OD) of well content was determined at 595 nm (OD₅₉₅) using a microplate reader and strains which' optical density was greater than 0,8 were considered as slime positive. To detect p-pili of the bacteria, the heamgglutination with sheep erythrocytes in either existence or absence of % 2,5 α -Methyl-D-mannoside was observed for each strain. The dishaemgglutination with guinea erythrocytes in existence of % 2,5 α -methyl-D-mannoside % 2,5 α -Methyl-D-mannoside and heamgglutination with absence of % 2,5 α -Methyl-D-mannoside pointed the type 1 fimbria production of the strain. The antibiotic susceptibility of strains was determined by Kirby- Bauer disk diffusion method as recommended by Clinical and Laboratory Standarts İnstitute (CLSI).

Results: At the end of the study, the biofilm production, virulance factors and antibiotic resistance of *E. coli* strains which isolated from diabetic and non-diabetic patients were

investigated and; in diabetic group slime formation was two times higher than non-diabetic group but this result was statistically not significant. Type 1 fimbria expression in diabetic strains was also % 12,2 higher than the non-diabetic strains but this value was statistically not significant either. In correlation between slime forming and antibiotic resistance; antibiotic resistance in slime-forming *E. coli* was greater than non-slime forming *E. coli* group but this was statistically not significant. Antibiotic resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ciprofloxacin and co-trimoxazole in slime-forming *E. coli* strains was greater than non-slime-forming group.

Conclusion: In this study we purposed to find differences between biofilm production, virulence factors and antibiotic resistance of same species of bacteria isolated from diabetic and non-diabetic patients. Although, the results were statistically not significant, in diabetic group the greater biofilm production, type 1 fimbria expression and in slime-forming group the greater antibiotic resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, ciprofloxacin and co-trimoxazole were observed. These results would assist to develop the follow-up and new treatment modalities of diabetic patients by way of understanding the underlying predisposition mechanisms of infections and pathogenesis of biofilm production. However, numerous comparative studies are required in this subject. Furthermore, our study is the first research which includes the slime production, fimbria expression and the distribution of these findings according to urine and wound cultures beside with antibiotic resistance and the relationships between these virulence factors of *E. coli* strains obtained from diabetic and non-diabetic patients.

Key words: diabetes, biofilm, infection

KAYNAKLAR

1. Calvet HM, Yoshikawa TT. Infections in diabetes. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2001; 15:407- 21, viii.
2. Anonymous. Antimicrobial prophylaxis in surgery. *Med. Lett.* 1992;34(862):5-8.
3. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, LeFrock JL, Lew DP, Mader JT, Norden C, Tan JS. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39:885-910.
4. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2000;31:347-82.
5. Harding GK, Zhanel GG, Nicolle LE, Cheang M. Antimicrobial treatment in diabetic women with asymptomatic bacteriuria. *N Engl J Med* 2002; 347:1576-83.
6. Trivedi BB. Diabetes and infection. *Journal of Applied-Basic Medical Sciences.* 2003; 5: website: www.nhlmmcgym.com. Erişim tarihi: 29.05.2010
7. Gn İ, Ekinci FY. Biofilmler: Yzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 2009;34.165-73.
8. Çiftçi Z.Kronik tonsillitte biofilmin rolü. Uzmanlık tezi, 2005
9. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? *J.Hosp.Infect.* 2006; 64:313-25.
10. ztrk B , Sakarya S, nc S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları , *Klimik Dergisi* , 2008; 21 (3):79 - 86 .
11. Donlan RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33:1387–92.
12. Kierek-Pearson K, Karatan E. Biofilm development in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 2005; 57:79-111.
13. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS Microbiol.*,2001; 9:34-9.
14. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 2001; 358:135-8.
15. Leid JG, Shirtliff HC, Costerton, JW, Stoodley P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect. Immun*, 2002; 70: 6339–45.

16. Moller S, Korber DR, Wolfaardt GM, Molin S, Caldwell DE. Impact of Nutrient Composition on a Degradative Biofilm Community. *Appl. Environ. Microbiol*, 1997; 63(6): 2432–8.
17. Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC. Physiological ecology in biofilm systems. In Characklis WG and Marshall KC (ed.), *Biofilms. John Wiley & Sons, Inc.* New York, N.Y. 1990; p. 341–94.
18. O'Toole GA. To Build a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 2003;185:2687-9.
19. Jefferson KK, Cerca N. Bacterial–Bacterial Cell Interactions in Biofilms. *Methods in Molecular Biology*, 2004; 341:119.
20. Vranes J, Schönwald S, Sterk-Kuzmanovic N, Ivancic B. Low virulence of *Escherichia coli* strains causing exacerbation of chronic pyelonephritis. *Acta Clin. Croat*, 2001; 40:165-70.
21. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type-1 pilus mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBOJ*,2000;19: 2803-12.
22. Sakarya S, Ertem GT, Oncu S, Kocak I, Erol N, S. Oncu. *Escherichiae coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. *FEMS Immun. and Medical Microbiol.* 2003;39: 45-50.
23. Çelikbaş A. Diyabet seyrinde gelişen infeksiyonlarda patogenezi. *Klinik Dergisi* , 2005;18 (1):17 - 20.
24. Akalın H. Diyabetik hastalarda sistemik infeksiyonlar. *Klinik Dergisi*, 2008; 21; özel sayı:1
25. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996; 39:1005-29.
26. Ronn S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Diabetes and suppressors of cytokine signalling proteins. *Diabetes*, 2007; 56:541-8.
27. Grimble RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2002; 5: 551-9.
28. Munzberg H, Myers MG. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* 2005; 8:566-70.
29. Edward JE Jr, Tillman DB, Miller ME. Infection and Diabetes Mellitus. *West J. Med.* 1979; 130: 515-21.
30. Bertoni AG, Saydah S, Brancati F. Diabetes and the risk of infection-related mortality in USA. *Diabetes Care* ; 2001; 24:1044-9.

31. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*, 2003;26:510-3.
32. Kahraman H, Özyılkan E, Günaydın M, Kesim G, Dabak Ş, Tanyeri F. Diyabetik hastalarda hepatit C virusu antikorü prevelansı. *Klimik Derg.* 1997;10(2):83-6
33. Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of Cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet*, 1988; 2:1-4.
34. Sun Y, Pei W. An association of Herpes simplex virus type 1 infection with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2005; 2:435-6. Kanters SDJM, Banga J, Algra A. Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care*, 2001 ;24:323-7.
35. Viskari HR, Koskela P, Lönnrot M, Luonansuu S, Reunanen A, Baer M, Hyöty H. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabetes Care* 2000;23(3):414-6
36. Kanters SDJM, Banga J, Algra A . Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes care* 2001;24:323-7
37. Rajagopalan S. Serious infections in elderly patients with diabetes mellitus. *Clin. Infect. Dis*, 2005;40: 990-6.
38. Gupta S, Koirala J, Khardori R, Khardoni N. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2007; 21:617-38.
39. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TME. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*, 2007; 23: 3-13.
40. Nicolle EL. Asymptomatic bacteriuria in diabetic women. *Diabetes Care*, 2000; 23:722-3.
41. Zhanel GG, Harding GKM, Nicolle LE. Asymptomatic bacteriuria in patients with diabetes mellitus. *Rev Infect Dis* 1991;13:150-4
42. Geerlings SE, Stolk RP, Camps MJL. Asymptomatic bacteriuria might be considered a diabetic complication in women with diabetes. *Diabetes Care*, 2000; 23:744-9.
43. Geerlings SE. Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus: epidemiology, pathogenesis and treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:54-7.
44. Nicolle EL, Bradley S, Colgan R, Rice JC. Infectious diseases society of America guidelines for diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. 2005; 40:643-54.
45. Naber KG, BM Björklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Grabe M, Lobel B, Palou J, Tenke P. Guidelines on the management of urinary and male genital tract infections. European Association of Urology, 2006

46. Çolpan A. Diyabetik hastalarda üriner sistem, solunum sistemi ve karınıçi infeksiyonlar. *Klimik*, 2005; 18:14-6.
47. Aburawi E, Liuba P, Pesonen E, Yla-Herttuala Si Sjöblad S. Acute respiratory viral infections aggravate arterial endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes. *Diabetes care* 2004; 27(11):2733-5
48. Thomsen R, Hundborg H, Lervang HH, Johnsen SP, Sorensen H, Schonheyder HC. Diabetes and outcome of community-acquired pneumococcal bacteremia. *Diabetes care* 2004;27(1):70-6
49. American Diabetes Association. Immunization and the prevention of influenza and pneumococcal disease in people with diabetes. 2000; 23:109-11.
50. Smith SA, Poland GA. Use of influenza and pneumococcal vaccines in people with diabetes. *Diabetes care* 2000;23(1):95-108
51. Şahin İ, Şencan İ, Kaya D, Gülcan A, Gülcan E. Diyabetes mellituslu hastalarda nazal metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığını etkileyen faktörler. KLiMiK 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları kongresi poster sunumu
52. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association 60th scientific sessions.the diabetic foot.*Diabetes care* 2001;24:946-51
53. Hill SL, Holtzman GI, Buse R. The effects of peripheral vascular disease with osteomyelitis in the diabetic foot. *Am J Surg* 1999;177:282-6.
54. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1318-26.
55. Trautner C, Haastert B, Giani G, Berger M. Incidence of lower limb amputations and diabetes. *Diabetes Care* 1996; 19:1006-9.
56. Apelqvist J, Ragnarson-Tennvall G, Larsson J, Persson U. Long-term costs for foot ulcers in diabetic patients in a multidisciplinary setting. *Foot Ankle Int* 1995;16:388-94.
57. Stockl K, Vanderplas A, Tafesse E, Chang E. Costs of lower-extremity ulcers among patients with diabetes. *Diabetes care* 2004;27(9):2129-34
58. Eren Ş. Diyabetik hastalarda görülen invaziv infeksiyonlar.*Klimik*, 2005;18:3-5.
59. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006; 25: 215-29.
60. Artis WM, Fountain JA, Delcher HK, Jones HE. A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. *Diabetes*, 1982; 31: 1109-14.

61. Jeon JY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systemic review of 13 observational studies. *PLoS Med*. 2008;15;5:152.
62. Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Nelwan EJ, et al. The effect of type 2 diabetes mellitus on the presentation and treatment response of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 2007; 45: 428-35.
63. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, *et al*. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, 2008; 34: 17-60.
64. Marik PE, Raghavan M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med*, 2004; 30: 748-56.
65. Van Den Berghe G, *et al*. Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients *N Engl J.Med* 2001;345:13.
66. Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. *Liver International*, 2008; 28: 355-62.
67. Samaras K. Metabolic consequences and therapeutic options in highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61: 238-45.
68. White JR, *et al*. *Clin Ther* 1994;16(2):173-80.
69. Joukhadar C, Klein N, Frossard M, *et al*. Angioplasty increases target site concentrations of ciprofloxacin in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:532–9.
70. Nijland HMJ, Ruslami R, Stalenhoef JE. Exposure to rifampicin is strongly reduced in patients with tuberculosis and type 2 diabetes. *CID* 2006;43.
71. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-6.
72. Nicosia S, Oliva D, Bernini F, Fumagalli R. Prostacyclin-sensitive adenylate cyclase and prostacyclin binding sites in platelets and smooth muscle cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Re,s* 1984;17: 593-9.
73. Riddell DR, Owen JS. Nitric oxide and platelet aggregation. *Vitam Horm* ,1999; 57: 25-48.

74. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, *et al.* Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res*, 2004; 64:172-8.
75. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001; 38 (Suppl 2): 3-6.
76. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002; 105: 546-9.
77. Sakarya S. İnfeksiyonlara karşı konağın savunmasında lökosit adezyon moleküllerinin rolü. *Klimik Dergisi*, 1998; 11:75-81.
78. Van 't Veer C, Golden NJ, Mann KG. Inhibition of thrombin generation by the zymogen factor VII: implications for the treatment of hemophilia A by factor VIIa. *Blood*, 2000; 95: 1330-5.
79. Etzioni A. Adhesion molecules in host defense. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1:1-4.
80. Guerci B, Kearney-Schwartz A, Bohme P, Zannad F, Drouin, P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. *Diabetes Metab*, 2001; 27: 425-34.
81. Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* ,1999; 22: 1865-70.
82. Thorand B, Baumert J, Chambless L, *et al.* Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle-aged men and women from the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ,2006; 26: 398-405.
83. Ryysy L, Yki-Jarvinen H. improvement of glysemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes. *Diabetes care* 2001;24(3):549-54
84. Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*, 2002; 38: 259-69.
85. Gabbay KH. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med*, 1973; 28: 831-6.
86. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 1998; 47: 859-66.
87. Craven PA, Studer RK, Negrete H, DeRubertis, FR. Protein kinase C in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*, 1995; 9: 241-5.

88. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 1991; 87: 432-8.
89. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, *et al.* Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*, 2003; 108: 472-8.
90. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993; 259: 87-91.
91. Potter CF, Kuo NT, Farver CF, *et al.* Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups. *Pediatr Res*, 1999; 45: 8-13.
92. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, *et al.* Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α . *J Clin Invest* 2007; 117: 1249-59.
93. Hostetter MK. Handicaps to host defense. Effects of hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*. *Diabetes* 1990;39:271-5.
94. Zhang C, Yang J, Jennigs L. Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose stimulated, vascular non-leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes* 2004;53:2950-9.
95. Osar Z, Samancı T, Demirel GY, Damcı T, İlkova H. Nicotinamide effects oxidative burst activity of neutrophils in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *Exp. Diabetes Res.* 2004;5:155-62.
96. Curnutte JT, Orkin SH, Dinarello MC. Genetic disorders of phagocyte function. In: Stamatoyannopoulos G, ed. *The molecular basis of blood diseases*, 2008.
97. Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, *et al.* Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001;24:104-10.
98. Jirkovska A, Fejfarova V, Hosova J, Striz I, Kalanin J, Skibova J. Analysis of the inflammation reaction and selected indicators of immunity with an infected diabetic ulcer. *Cas.Lek.Cesk.* 2002;141:483-6.
99. Beam TR Jr, Crigler ED, Goldman CK, Schiffman G. Antibody response to polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine in diabetics. *JAMA* 1980;244:2621-4.
100. Top C, Yildiz S, Oncul O, Qydedi T, Cevikbaş A. Phagocytic activity of neutrophils improves over the course of therapy of diabetic foot infections. *Journal of infection* 2007;55:369-73.

101. Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans. *J.Clin.Endocrin Metab* ,2006;10
102. Oldenburg PA, Sehlin J. Effects of D-Glucose on chemokinesis and resting production of reactive oxygen species in neutrophil granulocytes of lean or obese-hyperglycemic mouse. *Bioscience Reports*, 1997; 17:5
103. Saiepour D, Sehlin J and Oldenburg PA. Insulin inhibits phagocytosis in normal human neutrophils via PKC α/β -dependent priming of F-actin assembly. *Inflamm. Res*, 2006; **55**: 85-91
104. Donlan RM, Costerton CW. Biofilms; Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol. Rev.* 2002; 15:167-93.
105. McLean RJ, Cassanto JM, Barnes MB, Koo JH. Bacterial biofilm formation under microgravity conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;195:115-19
106. Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, Ayyaswamy PS, Matin A. *Escherichia coli* biofilms under low-shear modeled microgravity in a ground-based system. *Appl. and. Env. Microbiol.* 2006; 72(12):7701-10.
107. Jefferson KK. What drives a bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology letters* 2004;236:163-73.
108. Dunne WM .Bacterial adhesion:seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews* 2002;15:155-66.
109. Costerton JW.Introduction to biofilm. *Int. Jour. of Antimicrob. Agents*; 1999; 11:217-21.
110. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology* 2003;185:1485-91.
111. Donlan RM. Biofilms:Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002;881-90.
112. Branda SS,Vik A, Friedman L, Kolter R.Biofilms:the matrix revisited. *Trends in Microbiol.*2005;13:20-6.
113. Davy ME, O'Toole GO. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*2000;64:847-67.
114. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene alg C in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995;61:860-7.

115. Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, Dorel C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *Journal of Bacteriology* 2001;183:7213-23.
116. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*1994;48:585-617.
117. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu.Rev. Microbiol* 2000;54; 49-59.
118. Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe tıp dergisi*,2008;39:82-8.
119. Carpentier B,Cerf O. Biofilm and their consequences with particular refence to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 1993;75:499-511.
120. Poulsen LV.Microbial biofilm in food processing. *Lebensm.Wiss.U.Techn*,1999; 32:321-6.
121. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.*Mol Microbiol* 1998; 30(2): 285-93
122. Korber DR, Lawrence JR, Sutton B. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb.Ecol.* 1989, 18:1-19
123. Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol* 2003; 11(4): 179-84.
124. Watnick PI, Lauriano CM, *et al.* The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* 2001; 39(2): 223-35.
125. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; **412**(6845): 442-5.
126. Reisner A, Haagenzen JA, et al. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* 2003; 48(4): 933-46.
127. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998; 30(2): 295-304.
128. Moorthy S, Watnick PI. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* 2004 ; 52(2): 573-87.
129. O'Toole GA, Kolter R. Initiation if biofilm formation in *Pseudomonas florescens* WCS365 proceeds via multiple,convergent signalling pathways:a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*1998;28:449-61.

130. Marsh PD. Dental Plaque. In Lappin-Scott HM, Costerton JW, eds. Microbial biofilms. Cambridge university press, 1995; 282-300.
131. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147:3-9.
132. Flemming H-C, Wingender J, Griegbe, Mayer C. Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 19-34
133. Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase negative *Staphylococci*: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.* 1993; 10:191-207.
134. Leriche V, Sibille P, Carpendier B. Use of ELISA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66:1851-6.
135. Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.* 2000; 9:9-10.
136. Davison J. Genetic exchange between bacteria and environment. *Plasmid.* 1999; 42:73-91.
137. La Gido C, Wilson IJ, Glover LA, Prosser JI. A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces. *FEMS Microbiol. Eco.* 2003; 44:67-78.
138. Lawrence JR, Korber DR *et al.*). Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; 173(20): 6558-67.
139. Lewandowski Z. Structure and function of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 1-17.
140. Loaec. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res.* 1997; 31: 1171-9.
141. Jackson DW, Simecka JW *et al.* Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol* 2002; 184(12): 3406-10.
142. Stanley NR, Britton RA, *et al.* Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* 2003; 185(6): 1951-7.
143. Cross AS, Sakarya S, Rifat S, Held TK, Drysdale BE. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *The journal of biological chemistry* 2003; 278:4112-20.
144. Sakarya S, Rifat S, Zhou J, Bannerman DD, Stamatou NM, Cross AS, Goldblum SE. Mobilization of neutrophil sialidase activity desialylates the pulmonary vascular endothelial

- surface and increases resting neutrophil adhesion to and migration across the endothelium. *Glycobiology*,2004;14:481-94.
145. Sillanauke P, Ponnio M, et al. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(5): 413-25.
 146. Cross AS, Wright DG. Mobilization of sialidase from intracellular stores to the surface of human neutrophils and its role in stimulated adhesion responses of these cells. *J. Clin. Invest.* 1991;88:2067-76.
 147. Roggentin P, Schauer R, Hoyer LY, Vimr ER. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol. Microbiol.* 1993; 9:915-21.
 148. Scar M, Onem G, Baltalarli A, Sacar S, Turgut H, Goksin I, Ozcan V, Sakarya S. Neuraminidase produces a decrease of adherence of slime-forming *Stapylococcus aureus* to gelatin-impregnated polyester fiber graft fabric: an experimental study. *J Artif Organs* 2007;10:177-80
 149. Ehlers LJ, Bouwer EJ. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* 1999; 7:163-71.
 150. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum-sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1626-32.
 151. Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(2): 133-7.
 152. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J. Infec.* 2003, 46;207-14.
 153. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 165-99.
 154. Camara M. Quarum sensing: A cell-to-cell signalling machanism used to coordinate behaviorual changes in bacterial populations. 2007. <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf> (Erişim tarihi: 24.04.2010)
 155. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 2003; 112(9): 1291-9.
 156. Fuqua WC. Quorum sensing in bacteria. LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol* 1994;176:269-75.
 157. Williams P. Quorum sensing. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 (2-3): 57-9.
 158. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13(1): 27-33.
 159. Wong ACL. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy.Sci* 1998;81:2765-70.

160. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(16): 8789-93.
161. Engebrecht. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 1983; 32(3): 773-81.
162. Kaplan. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 1985; 163(3): 1210-4.
163. Whiteley M, Lee KM, *et al.* Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(24): 13904-9.
164. Lazazzera BA, Grossman AD. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* 1998; 6(7): 288-94.
165. Redfield R. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *TRENDS Microbiol.* 2002,10:365-70.
166. Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Ecology Indust.Microbiol.* 2002; 5:254-8.
167. Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia.*Proc.Natl.Acad.Sci.* 2004; 101:3587-90.
168. Fux CA, Costerton JW, *et al.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13(1): 34-40.
169. Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* 1998; 42(1): 33-40.
170. Meluleni GJ,Grout M, *et al.*). Muroid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the muroid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol* 1995; 155(4): 2029-38.
171. Yasuda H, Ajiki Y, Aoyama J,Yokota T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm-models. *J.Med. Microbiol.* 1994; 41(5):359-67.
172. Ceri H,Olson ME , *et al.* The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1771-6.

173. Schierholz JM, Beuth J, König D, Nurnberger A, Pulvever G. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. *Zentralbl Bacteriol.* 1999;289(2):165-77.
174. Drenth E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003;5:1213-9.
175. Prigent-Combaret C, Vidal O, *et al.* Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999; 181(19): 5993-6002.
176. Foley I, Marsh P, Wellington EM, Smith AW, Brown MR. General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *Antimicrob. Chemother* 1999;43:164-5.
177. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38:2125-33.
178. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 1991; 37: 91-105.
179. Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic-fibrosis- derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1988;22:(5):667-74.
180. Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J. Infect. Dis.* 1990;161(1):37-40.
181. DuGuid IG, Evans E, Brown MRW. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 1992;30:803-10.
182. Anwar H, Strap JL, *et al.* Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(6): 1208-14.
183. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1999, 7th edition p.1526-1543
184. Anderl JN, Zahller J, *et al.* Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4): 1251-6.
185. Walters MC, 3rd, F. Roe, *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1): 317-23.

186. Tresse O, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob Chemother* 1995;36:521-6.
187. Zabinski RA, Walker KJ, *et al.* Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(2): 507-12.
188. Yassien M, Khardoni N. Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;40:79.
189. Sauer K, Camper AK, Erhlich GH, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriol* 2002;184:1140-54.
190. Houdt RV, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. in Microbiol.* 2005;156:626-33.
191. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2:123-40.
192. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Igleski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-8.
193. Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum-sensing in *Staphylococcus biofilms*. *J. Bacteriol.* 2004;186:1838-50.
194. Ahmer BM. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004;52: 933-45.
195. Henikoff S, Wallace JC, Brown JP. Finding protein similarities with nucleotide sequence databases. *Methods Enzymol.* 1990;183:111-32.
196. DeLisa MP, Wu CP, Wang L, Valdes JJ, Bentley WE. DNA-microarray based identification of genes controlled by autoinducer-2 stimulated quorum-sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183:5239-47.
197. Bodman B, Majerczak SDR, Coplin DL. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii subsp. stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:7687-92.
198. Stintzi A, Evans K, Meyer JM, Poole K. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasL mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol.Lett.* 1998;166:341-5.

199. Cao JG, Meighen EA. Purification and structural identification of an autoinducer for luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.* 1989;264:21670-6.
200. DeLisa MP, Valdes JJ, Bentley WE. Quorum- signalling via AI-2 communicates the metabolic burden associated with heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2001;75:439-50.
201. Lithgow JK, Danino VE, Jones J, Downie JA. Analysis of N-acyl homoserine-lactone quorum-sensing molecules made by different strains and biovars of *Rhizobium Leguminosarum* containing different symbiotic plasmids. *Plant soil* 2001;232: 3-12.
202. Re S, Quere B, Ghigo JM, Beloin C. Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl. and. Env. Microbiol.* 2007; 73(10):3391-3403.
203. Loewen PC, Hengge-Aronis R. The role of the sigma factor (katF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994; 48: 53-80.
204. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gen expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiol.* 2003;48(1):253-67.
205. Beloin, C. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 2004; 51(3): 659-74.
206. Collet A, Vilain S, Cosette P, Junter GA, Jouenne T, Phillips RS, Martino P. Protein expression in *Escherichia coli* S17-1 biofilms: impact of indole. *Antonie van Leewenhoek* 2007;91:71-85.
207. Wang D, Ding X, Rather PN. Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001;183:4210-6.
208. Ren D, Zuo R, Barrios AF, Bedzyk L, Eldridge GR, Mark EP, Wood TK. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *App. and Env. Microbiol.* 2005;71(7):4022-34.
209. Attila C, Ueda A, Wood TK. 5-fluorourasil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;82:525-33.
210. Fernandez LA, Berenguer J,. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*2000; 24:21-44
211. Soutourina OA, Bertin PN. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*2003; 27:505-23.
212. Klemm P, Krogfelt KA. Fimbria, adhesion, genetics, biogenesis and vaccines. *CRC Press,Inc.* 1994, 9-26

213. Dorman CJ, Higgins CF. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: Dependence of integration host factor and homologies with older site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* 1987;169:3840-3.
214. Blomfield IC, Calie PJ, Eberhardt KJ, McClain MS, Eisenstein BI. Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1993;175:27-36
215. Kawula TH, Orndoff PE. Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonlike protein H-NS. *J. Bacteriol.* 1991;173:4116-23.
216. Sokurenko EV, Courtney HS, Ohman DE, Klemm P, Hasty DL. FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J. Bacteriol.* 1994; 176:748-55.
217. Ofek I, Mirelman D, Sharon N. Adherence of *Escherichia coli* to human mukosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 1977; 265. 623-5.
218. Bar-Shavit Z, Ofek I, Godman R, Mirelman D, Sharon N. Mannose residues on phagocytes as receptors for attachment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; 78:455-60.
219. Gaastra W, DeGraaf FK. Host-specific fimbria adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 1982;46:129-61.
220. Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N, Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl- α -D-mannopyranoside. *J. Infect. Dis.* 1979; 139:329-32.
221. Connell H, Agace W, Klemm P, Schebri M, Marild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93:9827-32.
222. Hull R, Donovan WH, Terzo M, Stewart C, Rogers M, Darouiche RO. Role of type 1 fimbria and P fimbria specific adherence in colonization of neurogenic human bladder by *Escherichia coli*. *Infect. and Imm.* 2002, 70:6481-4.
223. Rhen M, Knowles J, Penttila ME, Sarvas M, Korhonen TK. P-fimbria of *Escherichia coli*: molecular cloning of DNA fragments containing the structural genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1983;19:119-23.
224. Pere A, Vaisanen -Rhen V, Rhen M, Tenhunen J, Korhonen TK. Analysis of P fimbria on *Escherichia coli* O2,O4 and O6 strains by immunoprecipitation. *Infect. and Immun.* 1986;51(2):618-25.
225. Owen P, et al. Phase variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996;16(2):63-76.

226. Hasman H, Chakraborty T, Klemm P. Antigen 43 mediated autoaggregation is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol.* 1999;181:4834-41.
227. Danese P, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 2000; 37(2):424-32.
228. Vargas M, Gascon J, Casals C, Schellenberg D, Urassa H, Kahigwa E, Ruiz J, Vila J. Etiology of diarrhea in children less than five years of age in Ifakara, Tanzania. *Am. J.Trp. Med. Hyg.* 2004;70:536-9.
229. Sheikh J, Hicks S, *et al.* Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2001; 41(5): 983-97.
230. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro J, Sarantuya J *et al.* Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004;71(5):687-90.
231. Arancibia-Mendez E, Vargas M, Soto S, Ruiz J, Kawigwa E, Schellenberg D, Urassa H, Gascon J, Vila J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara, Tanzania. *Am. J.Trp. Med. Hyg.* 2008; 78(6):985-9.
232. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 2003; 301:105-7.
233. Benz I, Schmidt MA. Cloning and expression of an adhesion (AIDA) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1989; 57:1506-11.
234. Sherlock O, Schembri MA, Reisner A, Klemm P. Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *Escherichia coli*: Cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacterol.* 2004; 186:8058-65.
235. Olsen A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 1989; 338: 652-55.
236. Bian Z, Normars S. Nucleator function of CsgB for assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO j.* 1997; 16: 5827-36.
237. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two csg operon is required for production fibronectin and congo-red binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 1995; 18: 661-70.
238. Nasr AB, Olsen A, Sjobring U, Muller-Esterl W, Bjorck L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 927-35.

239. Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. Expression and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis.* 2000; 181:602-12.
240. Stevenson G, Adrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* 1996;178: 4885-93.
241. Ferrieres L, Clarke DJ. The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol. Microbiol.* 2003;50:1665-82.
242. Prigent-Combaret C, Prensier G, *et al.* Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2000; 2(4): 450-64.
243. Danese PN, Pratt LA, *et al.* Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000; 182(12): 3593-6.
244. Emody L, Kerenyi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003;22: 29-33.
245. Ljungh A, Faris A, Wadström T. Hemagglutination by *Escherichia coli* in septicemia and urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 1979;10:477-81.
246. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991;4:80.
247. Hernandez F, Caballero M, Rivera P, Hird D. Mannose resistant hemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy for detection of K99 fimbrial antigen in *Escherichia coli* from calves. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:2123-4.
248. Salit IE, Gotschlich EC. Hemagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. *Journal of Experim. Med.* 1977; 146:1169- 81.
249. Johnson JR, Swanson JL, Neill MA. Avian P1 antigens inhibit agglutination mediated by P1 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; 60: 578 .
250. Gander RM, Thomas VL, Forland M. Mannose-resistant hemagglutination and uropathogenic *Escherichia coli* isolated from adult patients. *J Infect Dis* 1985; 151: 508.
251. Leffler H, Svanborg-Eden C. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 1981;34: 920-9.
252. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 2002;4:257-71.

253. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute Ninth informational supplement* 2006 ; (M2-A9) Wayne, PA7 CLS.
254. Sakarya S, Oncu S, Ozturk B, Tuncer G, Sari C. Neurominidase produces dose-dependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative staphylococci. *Arch.Med.Res.* 2004;35:275-8.
255. Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3486-90.
256. McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua C. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997;154:259-63.
257. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998;167:179-84.
258. Chen J, Yeh JY. Production of slime polysaccharide by EHEC and STEC as well as the influence of culture conditions on slime production in *E. coli* O157:H7. *Letters in Appl. Microbiol.* 2004, 38: 488-92.
259. Reisner A , Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriol.* 2006; 188: 3572-81.
260. Mao Y, Doyle MP, Chen J. Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 *Journal of Bacteriol.* 2001; 183: 3811-5
261. Jefferson KK, Pier DB, *et al.* The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186(8): 2449-56.
262. Ammendolia MG, Di Rosa R, *et al.* Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3235-8.
263. Plotkin BJ, Viselli SM. Effects of insulin on microbial growth. *Current Microbiol.* 2000;41: 60-4.
264. Klasowska K, Plotkin BJ. Human insulin modulation of *Escherichia coli* adherence and chemotaxis. *Am. J. of Infec. Dis.* 2006; 2: 197-200.
265. Taylor B , Zhulin I. In search of higher energy: metabolism-dependent behavior in bacteria. *Mol. Microbiol.* 1998; 28:683-90.

266. Sharma MA, Yadav S, Chaudhary U. Biofilm production in uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian jour. pathology and microbiol.* 2009; 52: 294.
267. Hull RA, Rudy DC, Wieser IE, Donovan WH. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from patients with symptomatic and asymptomatic bacteriuria and neuropathic bladders due to spinal cord and brain injuries. *J.Clin. Microbiol.* 1998; 36: 115.
268. Foxman B, Zhang L, Palin K, Tallan P, Marrs CF. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 1514.
269. Arthur M, Johnson JE, Rubin RH, Arbeit RD, Campanelli C, Kim C, Steinbach S, Agarwal M, Wilkinson R, Goldstein R. Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Imm.* 1989; 57:303.
270. Hughes C, Hacker J, Roberts A, Goebel W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infection by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1993; 39:546.
271. Domingue GJ, Roberts JA, Laucirica C, Ratner MH, Bell DP, Suarez GM, Kallenius G, Svenson S. Pathogenic significance of p-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections, *J.Urol.* 1985; 133:983
272. Langermann S, Palaszynski S, Branhart M . Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by Fim-H-adhesin based systemic vaccination. *Science* 1997;276:607-11.
273. Hull RA, Rudy DC, Donovan WH. Clinical outcome of intentional bladder colonization with *E. coli* 83972. *J. Urol.* 2000;163:872-7.
274. Geerlings S, Meiland R, Lith EC, Brauwer EC, Gaastra W, Hoepelman AIM. Adherence of type-1 fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial cells. *Diabetes care* 2002; 25:1405-9.
275. Geerlings SE, Brauwer EC, Gaastra W, Stolk R, Diepersloot RJA, Hoepelman AIM. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates from urine of diabetic women with asymptomatic bacteriuria: correlation with clinical characteristics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;80:119-27.
276. Cook SW, Hammill HA, Hull RA. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from female reproductive tract infections and neonatal sepsis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2001;9:203-7.
277. Hagberg L, Jodal U, Korhonen TK, Lidin-Jonson G, Lindberg U, Eden CS. Adhesion, hemagglutination and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect immun.* 1981;31:564-70.

278. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Clin Infect Dis* 2001;33(8):1288-94.
279. Akova M: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve klinik önemi, Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (editorler): "Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri Enfeksiyonları" kitabında s.85-94, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2004).
280. Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum betalactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003;47(4):273-95.
281. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B, Turkish MYSTIC Study group: Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: result of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(4):453-7.
282. Gür D, Gülay Z, Haşcelik G. ve ark. Gram Negatif Hastane izolatlarında Yeni β -Laktamlara Direnç ve GSBL Sıklığı- Çok Merkezli HiTiT-2 Projesinin Sonuçları , 2007
283. Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A. İdrarda üreyen *E. coli*'lerin geniş spektrumlu beta laktamazlar yönünden irdelenmesi. İnönü Üniv. Tıp Fak. Dergisi 2006; 13(4) 249-52.
284. Bishara J, Livne G, Ashkenazi S. Antibacterial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Isr Med Assoc J* 2005;7(5):298-301.
285. Kizirgil A, Demirdag K, Ozden M, Bulut Y, Yakupogullari Y, Toraman ZA. In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. *Microbiol Res* 2005;160(2):135-40.
286. Coşkun Ş, Yücedağ G, Önder Y, Ünlü E. İdrar yolu enfeksiyonlarında izole edilen bakteriyel etkenler ve bunların antimikrobiklere karşı duyarlılıklarının son dört senelik değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1991; 21:167
287. Otağ F, Yıldız Ç, Delialioğlu N. İdrardan soyutlanan *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2003;17:384-7.
288. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N *et al.* Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:223-8.
289. İlhan F, Palabıyıkoglu İ, Bengisun S. *Escherichia coli* suşlarında direnç profillerinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2001;31: 33-5.

290. Baykan M, Kaya M, Arslan U ve ark: İdrar örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarının antimikrobiyallere duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2001;8:15-7.
291. Demirci M, Cicioğlu Arıdoğan B, Arda M. Poliklinik hastalarının idrar kültürlerinden izole edilen Gram-negatif çomakların antibiyotiklere duyarlılığı. *ANKEM Derg* 2000;14:576-9.
292. Tolun V, Törümküney Akbulut D, Çatal Ç ve ark. Yatan ve ayakta hastalardan izole edilen üriner sistem infeksiyonu etkeni Gram negatif çomakların antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002;32:69.
293. Altoparlak Ü, Özbek A, Aktaş F. Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002;32:167.
294. Valdivieso F, Trucco O, Prado V, Diaz MC, Ojeda A. Antimicrobial resistance of agents causing urinary tract infections in 11 Chilean hospitals. PRONARES Project. *Rev Med Chil* 1999;127:1033.
295. Williams J, Venables WA, Lloyd D .The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997;143:2407-13.
296. Rachid S, et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilmforming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44, 3357–63.
297. Li YH, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2002; 184, 2699–2708
298. Wang BY, et al. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002; 17, 108–12.
299. Gasbarrini A, Ojetto V, Pitocco D, et al. Efficacy of different *Helicobacter Pylori* eradication regimens in patients affected by insulin- dependent diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 260-3.