

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

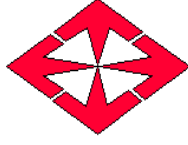
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KATETER İLİŞKİLİ HASTANE ENFEKSİYONLARINDA SIK
KARŞILAŞILAN BİYOFİLM OLUŞTURAN BAKTERİLERDE,
BİYOFİLM İLİŞKİLİ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fulya BAYINDIR BİLMAN

ANKARA, 2010



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**KATETER İLİŞKİLİ HASTANE ENFEKSİYONLARINDA SIK
KARŞILAŞILAN BİYOFİLM OLUŞTURAN BAKTERİLERDE,
BİYOFİLM İLİŞKİLİ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fulya BAYINDIR BİLMAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Füsün CAN

ANKARA, 2010

Tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından KA09/08 Proje Numarası ile Desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

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

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı olmanın sorumluluğunu her fırsatta göstererek, eğitimime önemli katkıları olan, bilimsel desteğine her zaman ulaşmama olanak sağlayan değerli eğitmenlerim Doç.Dr. Müge Demirbilek'e, Yrd.Doç.Dr. Hikmet Eda Alışkan ve Yrd.Doç.Dr. Şule Çolakoğlu'na,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgiye ulaşma konusunda bana yol gösteren, farklı bakış açısı ile enfeksiyon hastalıklarına yaklaşım konusunda bana çok önemli katkıları olan değerli hocam Enfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hande Arslan'a,

Elektron mikroskopik incelemelerdeki katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Attila Dağdeviren'e

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşım Dr. Melek Kaya'ya,

Tüm asistanlığım ve tez hazırlama sürecimde benimle birlikte laboratuvar çalışmalarını yürüten ve sonsuz desteklerini benden esirgemeyen teknisyen arkadaşlarım Murat Ural ve Serdar Kurşunlu'ya,

Uzmanlık eğitimime başlarken, bu zorlu yolda daima yanımda olan eşim Gürkan Bilman'a ve oğlum Oğuz'a

Yaşamım süresince her zaman destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, büyük özverilerle beni yetiştiren, bu günümü borçlu olduğum saygıdeğer anneme ve babama teşekkür ederim.

ÖZET

Hastaneye yatış sürecinde tanı ve tedavi amaçlı kullanılan yabancı cisimlerden kateterlerin, en önemli komplikasyonları arasında lokal ve sistemik enfeksiyon riski yer almaktadır. Bu çalışma kateter yüzeylerinde mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısının tedaviye direnci artıran ve tedavi sürecini zorlaştıran önemli bir etken olduğuna dayanılarak yapılmıştır.

Çalışmada Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi'nde 2006-2009 yılları arasında çeşitli servislerde ve yoğun bakımlarda yatarak tedavi gören hastaların kateterlerinde üremiş metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA), metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) ve *P.aeruginosa* izolatlarının planktonik hücre aşamasında ve in vitro koşullarda biyofilm yaptırıldıktan sonra sesil hücrelerinin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Antibiyotiklerin seçiminde MRSA ve MRKNS suşları için vankomisin, siprofloksasin, rifampisin, gentamisin, meropenem, tigesiklin, linezolid, seftazidim ve sefazolin tercih edilirken, *P.aeruginosa* suşları için de siprofloksasin, gentamisin, meropenem, tigesiklin, piperasilin, seftazidim ve amikasin çalışmaya alınmıştır.

Seçilen bu antibiyotikler ile önce planktonik hücrelerde duyarlılık araştırılmış, böylece minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) belirlenmiştir. Daha sonra her bir suş ile biyofilm oluşturulup sesil hücrelerde aynı antibiyotikler ile yine MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. Ardından ikili ve üçlü antibiyotik kombinasyonları oluşturulup, çoklu kombine bakterisidal test (ÇKBT) yöntemi ile hem planktonik hem de biyofilmden etkinlikleri belirlenmiştir. Her bir antibiyotik ile planktonik ve biyofilm hücrelerinde elde edilen veri seti istatistiksel olarak iki oran z testi ile analiz edilmiştir.

Sonuç olarak; sesil hücrelerde planktonik forma göre genel olarak duyarlılıklarda anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Hem ikili hem de üçlü kombinasyonlar ile yapılan çalışmaların sonucunda da sesil hücrelerin kombinasyonların çoğuna duyarlılıklarında anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Planktonik ve sesil hücrelere kombinasyonların etkinliğinin karşılaştırılmasında, suşların % 90'ından fazlasını inhibe etme açısından, ikili kombinasyonlar ile üçlüler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, kateter ilişkili enfeksiyon, biyofilm duyarlılık, metisilin dirençli stafilokok, P.aeruginosa



ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOFILM RELATED ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES OF BACTERIA FREQUENTLY ISOLATED FROM CATHETER RELATED HOSPITAL INFECTIONS

Local and systemic infection risks are one of the most important complications of catheters used for diagnosis and treatment in hospitalization process. This study is undertaken on the basis of the biofilm formation by microorganisms on catheter surface is one of the important factors which increase the resistance and complicate the treatment process.

In this study, the sensitivity of methicillin resistant *S.aureus* (MRSA), methicillin resistant coagulase negative staphylococcus (MR-CNS) and *P.aeruginosa* isolates from the catheters of inpatients hospitalized in different clinics and intensive care units in Başkent University Medicine Faculty Hospital between 2006-2009 was investigated in vitro in planktonic phase and on sessile cells after biofilm was formed. Vancomycin, ciprofloxacin, rifampicin, gentamicin, meropenem, tigecycline, linezolid, ceftazidime and cephazolin were preferred for MRSA and MR-CNS isolates and ciprofloxacin, gentamicin, meropenem, tigecycline, piperacillin, ceftazidime and amikacin were selected for *P.aeruginosa*.

First of all, the sensitivity of planktonic cells to antibiotics was examined so minimal inhibitor concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) were determined. Next, each strain was transformed to sessile cell in biofilm environment, and MIC and MBC values were determined for sessile cells. Double and triple antibiotics combinations were arranged, the effectiveness of combinations were studied on both planktonic and biofilm cells with multiple-combination bactericidal testing (MCBT) method. The data set obtained from planktonic and biofilm cells with each antibiotic analyzed with two proportion z test.

In conclusion, a significant decreases were found in the sensitivities of sessile cells when compared to planktonic cells. Experiments with both double and triple antibiotic combinations showed a significant decrease in the sensitivities of sessile cells to all combinations tested. In the comparison of effectiveness of double and triple combinations against planktonic and sessile cells in terms of the inhibition of more than %90 of the strains, no difference was determined.

Key words: Biofilm, catheter related infection, biofilm sensitivity, methicillin resistant staphylococcus, P.aeruginosa



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<i>Sayfa</i>
Özet	<i>iii</i>
İngilizce özet	<i>v</i>
İçindekiler dizini	<i>vii</i>
Kısaltmalar ve simgeler dizini	<i>ix</i>
Şekiller dizini	<i>x</i>
Tablolar dizini	<i>xii</i>
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. Kateter İlişkili Enfeksiyonlar, Etkenleri ve Önemi	2
2.2. Kateter İlişkili Enfeksiyonların Antibiyotiklerle Tedavisinde Karşılaşılan Direnç Sorunu	6
2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması	9
2.4. Biyofilmde Direnç Gelişimi ve Kombine Tedavi Yaklaşımları	12
3. Gereç ve Yöntem	19
3.1. Gereç	19
3.2. Klinik İzolatların Tiplendirilmesi	19
3.2.1. MRSA ve MRKNS	19
3.2.2. <i>P.aeruginosa</i> Suşları	19
3.3. Antibiyotikler ve Sulandırıcıları	20
3.3.1. Antibiyotiklerin Hazırlanması	20
3.3.2. Antibiyotik Sulandırıcıları	21
3.4. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	21
3.4.1. Planktonik Hücrelerde Minimal İnhibitör Konsantrasyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonların Belirlenmesi	22
3.4.2. Biyofilmde Minimal İnhibitör Konsantrasyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonların Belirlenmesi	23
3.5. Çoklu Kombinasyonlu Bakterisidal Test	25
3.5.1. Planktonik Hücrelerde ÇKBT	25

3.5.2. Biyofilmde ÇKBT	27
3.6. Elektron Mikroskopik İnceleme	28
3.7. İstatistiksel Analiz	28
4. Bulgular	29
4.1. MRSA ve MRKNS İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	30
4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	48
4.3. Elektron Mikroskopi ile Biyofilm Oluşumunun Gözlenmesi	56
5. Tartışma	57
6. Sonuç	68
7. Kaynaklar	70

KISALTMALAR DİZİNİ

A:	Amikasin
AHL:	Asil homoserin lakton
C:	Siprofloksasin
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇKBT (MCBT):	Çoklu kombine bakterisidal test
EPIC:	Europe Prevalance Infection Committe
G:	Gentamisin
INICC:	Uluslararası Enfeksiyon Kontrol Konsorsiyumu
KİKDE:	Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu
KNS:	Koagülaz negatif stafilokok
L:	Linezolid
MDR:	Çok ilaca dirençli
M:	Meropenem
MRSA:	Metisilin dirençli <i>S.aureus</i>
MRKNS:	Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok
MSSA:	Metisilin duyarlı <i>S.aureus</i>
NNIS:	Amerika Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Surveyans
P:	Piperasilin
PQS:	<i>Pseudomonas</i> kinolon sinyal molekülü
QS:	Quorum sensing
R:	Rifampisin
S1:	Sefazolin
S2:	Seftazidim
SVK:	Santral venöz kateter
T:	Tigesiklin
TPN:	Total parenteral nütrisyon
V:	Vankomisin
VİP:	Ventilatör ilişkili pnömoni
VİSA:	Vankomisine orta duyarlı <i>S.aureus</i>
VRSA:	Vankomisin dirençli <i>S.aureus</i>
YBÜ:	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikroorganizmaların Damar İçi Kateterlere Giriş Yerleri	3
Şekil 2.2. Biyofilm Oluşum Basamakları	11
Şekil 2.3. Kateter Üzerinde Bakteriyel Biyofilm	13
Şekil 2.4. Biyofilmde Antibiyotik Direncini Oluşturan Mekanizmalar	15
Şekil 2.5. Biyofilmde QS Sistemi İçinde Sinyal Moleküllerinin Düzenlenişi	16
Şekil 3.1. Doksan Altı Kuyucuklu Steril U Tabanlı Polistren Plaklarda Çalışılmıştır	22
Şekil 3.2. Triptik Soy Agarda Planktonik Hücrelerin MBK'larının Belirlenmesi	23
Şekil 3.3. Biyofilm Oluşturmaya Yarayan İğneli Kapaklı Polistren Plaklar	24
Şekil 3.4. Kuyucuklarda Üremenin Gözlenmesi	24
Şekil 4.1. <i>P.aeruginosa</i> İzolatında Biyofilmin İntakt Hücre Duvarı Dışında Yüzeyi Kaplayan Görünümü (Transmisyon Elektron Mikroskopi ile x60.000 büyütülmüş görünüm)	56
Şekil 4.2. Biyofilm Yapısı İçinde Farklı Yaşlarda <i>P.aeruginosa</i> Hücrelerinin Etrafını Çevreleyen Ektzopolisakkarit Yapı (Biyofilm Matriks, x46600 büyütme ile)	56
Grafik 4.1. MRSA İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları	34
Grafik 4.2. MRKNS İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları	35
Grafik 4.3. MRSA İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği	38
Grafik 4.4. MRKNS İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği	38
Grafik 4.5. MRSA İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren İkili Kombinasyonların Etkinliği	41
Grafik 4.6. MRKNS İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren İkili Kombinasyonların Etkinliği	41
Grafik 4.7. MRSA İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği	44
Grafik 4.8. MRKNS İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği	44
Grafik 4.9. MRSA İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliği	47
Grafik 4.10. MRKNS İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliği	47

Grafik 4.11. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları	49
Grafik 4.12. <i>P.aeruginosa</i> İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği	52
Grafik 4.13. <i>P.aeruginosa</i> İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği	55



TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Hastane Kökenli Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Etkenler	5
Tablo 3.1. Antibiyotik tartım miktarları ve stok konsantrasyonları	20
Tablo 3.2. MRSA ve MRKNS İçin Antibiyotik Kombinasyon Şablonu	25
Tablo 3.3. <i>P.aeruginosa</i> için Antibiyotik Kombinasyon Şablonu	26
Tablo 3.4. Çoklu Kombine Bakterisidal Test için Kullanılan Antibiyotik Sınır Değerleri	26
Tablo 4.1. MRSA/MRKNS ve <i>P.aeruginosa</i> için Antibiyotik MİK Sınır Değerleri (mg/L)	29
Tablo 4.2. Kalite Kontrol Suşları için Kabul Edilebilir MİK Sınırları (mg/L)	29
Tablo 4.3. MRSA İzolatlarında Planktonik ve Biyofilmde Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)	31
Tablo 4.4. MRKNS İzolatlarında Planktonik ve Biyofilmde Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)	32
Tablo 4.5. ÇKBT ile İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri	37
Tablo 4.6. ÇKBT ile meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili antibiyotik kombinasyonlarına duyarlı olan MRSA ve MRKNS izolat sayısı ve yüzdeleri	40
Tablo 4.7. ÇKBT ile Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri	43
Tablo 4.8. ÇKBT ile Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri	46
Tablo 4.9. <i>P.aeruginosa</i> İzolatlarında Planktonik ve Biyofilmde Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)	50
Tablo 4.10. ÇKBT ile İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan <i>P.aeruginosa</i> İzolat Sayısı ve Yüzdeleri	51
Tablo 4.11. ÇKBT ile Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan <i>P.aeruginosa</i> İzolat Sayısı	54

1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılda tıp biliminin elde ettiği en önemli kazanımlardan biri, ortalama insan yaşam süresinde belirgin artış olmasıdır. Global olarak bakıldığında, 1955 yılında 48 yaş olan ortalama yaşam süresi 1997 yılında 66 yaşa kadar uzamıştır. Bu başarıya rağmen, enfeksiyon hastalıkları insanların karşılaştığı en önemli sağlık problemlerinden biri olmaya devam etmektedir. Tüm dünyada görülen ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir.

Damar içi kateterler modern tıbbın vazgeçilmez araçlarından biri haline gelmiştir. Kateterler sıvı tedavileri, parenteral beslenme, yakın izlem, kan ve kan ürünleri uygulanması, çeşitli ilaçların infüzyonu, hemodiyaliz, kemoterapi gibi pek çok girişim için gereklidirler. Özellikle yoğun bakım üniteleri kateter uygulamalarının en sık yapıldığı birimlerdir. Bu denli geniş uygulama alanına sahip kateterler, enfeksiyon başta olmak üzere birçok sorunun kaynağı olabilmektedirler. Örnek olarak santral venöz kateterlerin (SVK) kullanımları sırasında hastalarda; lokal enfeksiyon, septik tromboflebit, kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonları (KİKDE), endokardit ve diğer metastatik enfeksiyonlar (akciğer absesi, beyin absesi, osteomyelit vb) gelişebilir.

Yoğun bakımlarda kolonize durumda olan mikroorganizmaların çeşitli yüzeylerde biyofilm yapabilme eğilimi, bunların etkeni olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavi sürecinde elde edilecek başarıyı gölgeleyen önemli bir etkidir. Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir.

Bu çalışma kateter yüzeylerinde mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısının tedavi sürecini zorlaştıran önemli bir etken olduğu tezine dayanılarak yapılmıştır. Çalışmanın amacı; çeşitli kateter tiplerinde enfeksiyon etkeni olarak üretilmiş metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının planktonik hücre aşamasında ve ardından in vitro koşullarda biyofilm oluşturulduktan sonra çeşitli antibiyotiklere ve antibiyotik kombinasyonlarına duyarlılıklarının araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kateter İlişkili Enfeksiyonlar, Etkenleri ve Önemi

Hastaneye yatış sürecinde tanı ve tedavi amaçlı kullanılan ve birçok durumda kaçınılmaz olarak uygulanması gereken kateterlerin en önemli komplikasyonları arasında lokal ve sistemik enfeksiyon riski yer almaktadır. Damar yolu, total parenteral nütrisyon (TPN), kan ve kan ürünleri, santral venöz basınç ölçümü, hemodiyaliz, kemoterapotik ajanların uygulamaları sırasında kullanılan kateterler ne yazık ki hastane ortamlarında sıkça bulunan gram pozitif, gram negatif bakteriler ve kandidalarla kolonize olup, enfeksiyonlar için giriş kaynağı teşkil etmektedirler.

Santral venöz kateter kullanımı yaygın bir uygulamadır ve hastaneye yatan hastaların %6'sında kullanım gereksinimi olmaktadır. Santral venöz kateterizasyon, durumu kritik hastalarda sıvı tedavisinde, tıbbi ilaç uygulamalarında, kan-total parenteral nütrisyon verilmesinde ve hemodinamik durumun monitörizasyonunda kullanılmaktadır (1).

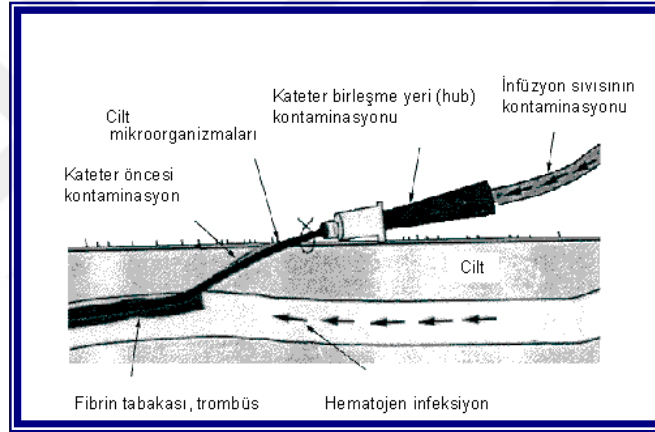
Latin Amerika, Asya, Afrika ve Avrupa'da 173 yoğun bakım ünitesinin (YBÜ) katıldığı bir çalışmanın 2010 Mart ayında yayınlanmış (2) verilerine göre Uluslararası Enfeksiyon Kontrol Konsorsiyumu (INICC)'nun 2003-2008 yılları arası dönemde 155358 hasta üzerinde yapılan çalışmasında %7.6 KİKDE/1000 SVK günü saptanmıştır. Yine aynı nedenle mortal seyreden olgu oranı da % 23.6 bulunmuştur.

Avrupa'dan Fransa, İtalya, İngiltere, Almanya'nın katıldığı çok merkezli başka bir çalışmanın verileri ise KİKDE epidemiyolojisi, insidansı, maliyetini ve mortalite oranlarını göstermektedir. Ortaya çıkan sonuçlarda ülkeler arası belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin; 1.12-4.2 KİKDE /1000 kateter günü, 8400-14400 KİKDE epizodu/yıl, 1000-1584 ölüm/yıl, 35.9-163.9 milyon euro maliyet yükü oranları tespit edilmiştir (3).

Türkiye'den 2002 yılına ait SVK ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları insidansı : 0,5 -10,5 / 1000 kateter günü olarak bulunmuştur (4). Düzce Üniversitesi'nde 2006 yılında yapılmış bir tez çalışmasında Dahili YBÜ'nde SVK ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu: 17.6/1000 kateter

günü ve Cerrahi YBÜ’nde SVK ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu: 20.5/1000 kateter günü olarak bildirilmiştir (5). Çok merkezli bir çalışmada Leblebicioğlu ve ark (6) 12 merkezden 13 yoğun bakımda enfeksiyon insidansını 17,6 / 1000 kateter günü olarak tespit etmişlerdir. Ne yazık ki bu rakamlar Amerika kaynaklı benzer çalışma verilerinden 5 kat, İngiltere kaynaklı verilerden ise 3.4 kat yüksek bulunmuştur (7).

Mikroorganizmalar, intravasküler kateterlere kateter giriş yerinden, kateter birleşme yerinden, kontamine infüzyon sıvısından veya başka bir enfeksiyon odağından hematojen yayılımla ulaşabilir (Şekil 2.1). Kateter giriş yeri ve kateter birleşme yeri, kateter enfeksiyonlarının en sık kaynağını oluşturmaktadır. Nadiren, kateter diğer bir enfeksiyon odağından hematojen olarak enfekte olabilmekte veya infüzyon sıvısı kontaminasyonu KİKDE gelişimine yol açabilmektedir (4).



Şekil. 2.1. Mikroorganizmaların Damar İçi Kateterlere Giriş Yerleri
(Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2005;9 :Ek 1, sy.13)

Zürcher ve arkadaşlarının (8) tek-çok lümenli santral venöz kateterlerde kolonizasyon ve kateter ilişkili enfeksiyon olasılıklarını araştırdıkları çalışmaları göstermiştir ki lümen sayısının artışı beraberinde artan enfeksiyon riskini taşımaktadır.

Ancak çok lümenli kateterlerin bu riski artırmadığını öne süren bulguların olduğu çalışmalar da mevcuttur (9). Genel kabul edilen görüş ise takip ve tedaviyi karşılayacak en az lümenli SVK seçilmesi, çok lümenli takılmış ise TPN için bir lümen ayrılması ve sadece bu amaçla kullanılması şeklindedir (10).

KİKDE hızları, hastalığın ağırlığı ve tipi (örneğin; üçüncü derece yanığa karşı postkardiyak cerrahi) gibi hasta ile ilgili parametrelerden; kateterin takılma koşulları (örneğin; elektife karşılık acil), kateter tipi (örneğin; tünelliye karşılık tünelli olmayan veya subklavyene karşılık juguler) gibi kateterle ilgili parametrelerden ve sağlık çalışanlarının el yıkama alışkanlığı gibi hastane ile ilgili parametrelerden etkilenebilir. Bu enfeksiyonlar için bildirilmiş bazı risk faktörleri ile ilgili daha güvenilir kanıtlar olmasına karşın, bazıları üzerinde halen görüş birliği oluşmamıştır (4).

Son 20 yılda yapılmış çalışmaların tümü, aseptik teknik standardizasyonu ve bu konuda verilen eğitimleri takiben enfeksiyon riskinde azalma olduğunu, kateter takılması ve bakımının tecrübeli olmayan kişiler tarafından yapılmasının kateter kolonizasyonu ve KİKDE riskini arttırabileceğini göstermiştir. Kateter takılacak bölgedeki cilt florasının yoğunluğu, KİKDE için majör risk faktörüdür. Enfeksiyon riskini azaltmak için, santral venöz kateterlerin juguler veya femoral bölge yerine subklavyen bölgeye takılması önerilmektedir (11).

Koagülaz negatif stafilokoklar (özellikle *S.epidermidis*) derinin en baskın flora bakterilerinden olması ve sıklıkla yabancı cisimlere bağlanmayı da sağlayan glikokaliks (slime) oluşturma yeteneğine sahip olmasından dolayı kateter ilişkili enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan etkenlerdendir. *S.aureus*, *E.coli* ve diğer enterik bakteriler de sık rastlanan bakteriler olarak dikkati çekmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde bu etkenler dışında daha az sıklıkta olmakla birlikte özellikle *P.aeruginosa*, *A.baumannii* ile gelişen dirençli enfeksiyonlar da saptanmaktadır. Ayrıca son yıllarda *Candida* spp. enfeksiyonlarında ve enterokoklarda artış görülmektedir. Parenteral lipid solüsyonları mantarlar ve özellikle lipofilik bir etken olan *Mallessezia furfur* için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (12).

Tablo 2.1’de Türkiye’de 1998’den sonra yapılmış 3 farklı araştırmanın verileri sunulmuştur. Buna göre ülkemizde hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarında etkenlerin dağılımı ve görülme sıklıkları değerlendirildiğinde MRSA’un başı çektiği gram pozitif bakterilerin birinci sırada olduğu, bunu *Enterobacteriaceae* ailesinin ağırlıkta olduğu gram negatiflerin ve daha az sıklıkta kandidaların takip ettiği görülmektedir.

Tablo 2.1. Hastane Kökenli Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Etkenler

Mikroorganizma	Çolak,1998 (%)	İnan, 1999 (%)	Çiftçi, 2003 (%)
Gram pozitif	71	58.3	68.9
MRSA	30	28.3	27.8
MSSA	17	16.7	13.6
KNS	8	7.5	15.8
Enterokok	16	5.2	8.2
Gram negatif	28	34.1	27
Enterobacteriaceae	28	20.2	18.4
<i>Pseudomonas</i> spp.		4	3.5
<i>Acinetobacter</i> spp.		5.7	4.7
<i>Candida</i> spp.		7.5	4

Ulusoy S ve ark. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2005;9 :Ek 1 sy. 13 (4)

Kateter ilişkili enfeksiyonların patogeneğinde en önemli faktörler kateterin yapıldığı materyal, enfekte eden organizmanın intrensek virülans faktörleri ve konak savunma mekanizmalarıdır. Kateterin yapıldığı materyalle ilgili in vitro çalışmalar, polivinil klorid veya polietilenden yapılmış kateterlerin, teflon, silikon elastomer veya poliüretandan yapılmış kateterlere göre, mikroorganizmaların aderensine daha az dirençli olabileceğini göstermiştir. Fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin gibi intravenöz araçların yüzeyine adsorbe olan konak glikoproteinleri, yabancı materyale mikroorganizma aderensini arttıran bir tabaka oluşturur. Bir mikroorganizmanın aderens özellikleri de kateter ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir mekanizmadır (4).

Takılan kateter o bölgede bir travma oluşturmuş, deri bütünlüğünü bozmuştur. Kateter giriş yeri çevresinde trombüs oluşması diğer önemli bir faktördür. Bu bölgeye gelen makrofajlar ve aracılık ettiği immün yanıt sonucu o bölgede toplanan maddeler (fibronektin başta olmak üzere) bakteriler için uygun yapışma ortamı oluşturur. Sonrasında bakteriler tarafından oluşturulan glikokaliks yapıları bakterilerin antibiyotik, antikor, fagositoz etkilerinden korunmasını sağlar. Yapışmış ve biyofilm içindeki bakteriler serbest çoğalan (planktonik) bakterilere kıyasla daha yavaş üremekte ve daha farklı davranmaktadır. Son yıllarda bu bakteriler arasında özel iletişim olduğu (Quorum Sensing) ve bu iletişim sisteminin kateterle

ilişkili enfeksiyonlar yönünden önemli bir virulans sistemi olduğu belirlenmiştir. Bu iletişimi engelleyecek yaklaşımlar yeni koruyucu ve tedavi edici stratejilere zemin hazırlamaktadır (12).

2.2. Kateter İlişkili Enfeksiyonların Antibiyotiklerle Tedavisinde Karşılaşılan Direnç Sorunu

Hastane enfeksiyonlarından sorumlu mikroorganizmaların sıklığı ve dağılımı ülkelere, sağlık kuruluşlarına ve kliniklere göre farklılıklar gösterebilmektedir (13). Son yirmi yıl içerisinde, YBÜ'ndeki etken mikroorganizmalar ve bu etkenlerin duyarlılık durumlarında önemli değişimler olmuştur. Gram negatif basiller, 1960 ve 70'li yıllarda YBÜ'nde en önemli patojenler olarak bildirilirken, geniş spektrumlu sefalosporinler kullanılması ve hastalara uygulanan girişimlerin artması gibi nedenlerle, bunun gram-pozitif mikroorganizmalara doğru değiştiği gözlenmiştir. EPIC (Europe Prevalance Infection Committe) çalışmasında, YBÜ enfeksiyonlarında gram-pozitif ve negatif etkenlerin eşit sıklıkta izole edildiklerini, *S. aureus*'un (%30) ve *P.aeruginosa*'nın (%29) en sık izole edilen etkenler olduklarını ve bunları sırasıyla KNS (%19), Kandidalar (%17), *E.coli* (%13), *Enterococcus* spp (%12), *Acinetobacter* spp (%9), *Klebsiella* spp (%8), *Streptococcus* spp (%7), *Enterobacter* spp'nin (%7) izlediğini bildirmişlerdir (14).

Ülkemizde 2010'da Ankem Dergisinde yayınlanmış bir araştırma verilerine göre yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürlerinde üreyen bakterilerin dağılımı hastane enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalar yönünden eşit sıklıkta (%45 gram pozitif, %48 gram negatif bakteriler) bulunmuş iken hastane enfeksiyonu etkeni olmayanlarda bu oranlar sırasıyla %69, %30'dur (15). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğinin 2009 yılında yayınladığı (16) sonuçlarına göre de kan dolaşımı enfeksiyonlarında erişkinlerden biraz farklı olarak sıklık sırasına göre KNS (%42), *Klebsiella* spp (%17), *E.coli* (%9), *Enterococcus* spp (%5), *S.aureus* (%4) ve *Candida* spp (%4) izole edilmiştir.

Pek çok YBÜ'de sıklığı giderek artan *P.aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K.pneumoniae* gibi çok ilaca dirençli mikroorganizmalar tedavide, özellikle de ventilatör ilişkili pnömoni (VİP), KİKDE ve sepsis gibi ampirik tedavinin mutlaka gerektiği olgularda en önemli problemleri oluşturmaktadır (17). Amerika Ulusal Nozokomiyal İnfeksiyon Surveyans (NNIS) verilerine göre 1998-2003 yılları arasında YBÜ izolatu mikroorganizmalar arasında 3. kuşak

sefalosporinlere dirençli *K.pneumoniae* ve imipenem dirençli *P.aeruginosa* sıklığı yaklaşık %20, kinolon veya 3. kuşak sefalosporinlere dirençli *P.aeruginosa* ve 3. kuşak sefalosporinlere dirençli *Enterobacter* spp. yaklaşık %30 artmış, bu artış 2002-2003 yılları arasında imipenem dirençli *P.aeruginosa* için %47'ye ulaşmıştır (18). Kanada'da YBÜ izolatları arasında *P.aeruginosa*'da çok ilaca direnç %12.7 suşda saptanmıştır (19).

Avrupa'da elde edilen sonuçlar da hem *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve hem de *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.'da endişe verecek düzeyde direnç artışı olduğunu göstermektedir. 2005 yılında izole edilen invazif *P.aeruginosa* suşlarının %7.4'ünün 5 grup (piperasilin-tazobaktam, üçüncü kuşak sefalosporin, karbapenem, aminoglikozid, florokinolon) antibiyotiğe dirençli olduğu; *Acinetobacter* suşlarında karbapenem ve kolistin dışında kalan antibiyotiklere duyarlılığın %50'den az olduğu saptanmıştır (20).

Uluslararası nozokomiyal enfeksiyon kontrol konsorsiyumu (INICC) tarafından yapılan araştırma verilerine göre SVK ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında tespit edilen *S.aureus* izolatlarının %25.5'i, KNS'ın %78.3'ü metisilin-dirençli, *Klebsiella* spp'nin %75'i seftriaksona ve %69.5'u seftazidime dirençli, *E. coli* izolatlarının %31.9'u seftriaksona, %21.7'si seftazidime, *Enterobacter* spp'nin %68.4'ü seftriaksona, %55.6'sı seftazidime ve %10'u imipeneme; *Pseudomonas* sppnin %35.6'sı seftazidime ve %13.5'u imipeneme dirençli bulunmuştur. Hastaların hastanede kalış süreleri de ortalama 9 gün uzamış ve mortalitede %75.1 artış ortaya çıkmıştır (21).

Brezilya'da yapılan benzer bir çalışmaya göre de, 3 hastanede 3 yıllık izlem süresince KİKDE hızı 9.1/1000 kateter günü ve izole edilen mikroorganizmalar da oldukça dirençli suşlar olarak tespit edilmiştir. Buna göre, cihaz ilişkili tüm enfeksiyonlardan izole edilmiş aynı döneme ait *S.aureus* izolatlarının %95'i metisilin dirençli iken, *Enterobacteriaceae* izolatlarının %96.7'si seftriakson, %79.3'ü seftazidim ve %85.7'si piperasilin-tazobaktama dirençli bulunmuştur. Yine aynı çalışmada görülen ekstra ölüm hızı artışı %27.8'dir (22).

Ülkemizde 12 hastanede 13 YBÜ'de gerçekleştirilen nokta prevalans çalışmasında yoğun bakımda gelişen enfeksiyon etkeni *Enterobacteriaceae* üyelerinde 3. kuşak sefalosporin direnci yaklaşık %50, piperasilin-tazobaktam direnci %30 oranında; *P.aeruginosa* suşlarında seftazidim ve florokinolon direnci yaklaşık %50, piperasilin-tazobaktam %30 ve imipenem direnci %38 oranında saptanmıştır (23).

Özden ve arkadaşlarının (24) yaptığı bir çalışmada ise metisilin dirençli izolatlar *S.aureus*'da %69.8 ve KNS'da %84.8 olarak tespit edilmiştir. Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (25) ise metisiline dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının tüm *S.aureus* enfeksiyonları içindeki oranı 2003 yılında %92.3 iken, 2004 yılında %90.5 olarak saptanmıştır.

Londra'da Sir Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilinleri keşfetmesi ile antibiyotik alanında yeni bir çığır açılmış ancak bu ilaç ancak 1941 yılında stafilokok enfeksiyonu geçiren bir hastada kullanımı ile etkinliğini göstermiştir. 1950 yılından sonra ise penisiline dirençli stafilokok enfeksiyonları bildirilmiştir. 1959 yılında metisilin ve 1961 yılında da gram negatiflere de etkili ampicilin ve aminopenisilinler keşfedilmiştir. Sefalosporinler 1957 yılında dirençli stafilokok enfeksiyonlarına karşı kullanıma girmişlerdir. 1964 yılında parenteral 1. kuşak sefalosporinlerle başlayan yolculuğu daha az dirençli, daha geniş spektrumlu 2. kuşak, 3. kuşak, ve nihayet 4. kuşak sefalosporinlerin tedaviye girmesi izlemiştir. Buna rağmen yinede sefalosporinlere direnç hızla artmaya devam etmiştir. Ancak, etki spektrumundan gram pozitif bakterilerin neredeyse çıktığını düşündüğümüz beta laktam antibiyotiklere yeni eklenen seftobiprol gibi moleküllere bu bakterilerin intrafagositik asidik pH'da duyarlılık gösterebileceği yönünde bazı çalışmalar mevcuttur (26). Bunlardan yola çıkarak bu çalışmada meropenem, seftazidim ve sefazolin de çalışmaya dahil edilerek kombinasyonlardaki başarıyı ne ölçüde etkileyebilecekleri araştırılmıştır.

Vankomisine duyarlılığın azalmış olduğu MRSA izolatlarının tedavisinde seçenekler kısıtlıdır. Ancak 2009 yılında yayınlanan Kanada'dan bir çalışmada seftobiprol'ün MRSA, VISA ve vankomisin dirençli *S.aureus* (VRSA)'da farmakodinamik aktivitesi vankomisin ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Vankomisin MRSA ve VISA suşlarında bakteriyostatik etkili iken, seftobiprol tüm suşlar üzerinde bakterisidal etkinlik göstermiştir (27). Ayrıca 2008'de yapılan bir çalışmaya göre de seftobiprol MRSA izolatlarını vankomisine göre daha yüksek oranda eradike edebilmiştir (28).

Stafilokoklarda vankomisin ve linezolid'e direnç saptandığını bildiren ülkemizden bir yayına rastlanmamıştır. Ancak enterokoklar için yapılan taramalardan birisinde yoğun bakımlarda yatan hastaların %70'inde kolonizasyon belirlenirken, üreyen 126 enterokok suşunun 4 tanesi *E.faecium* olarak tiplendirilmiş ve bunlar vankomisine dirençli (VanA tipi) bulunmuş, VRE kolonizasyonu da %3.17 olarak tespit edilmiştir (29).

Kore’de 2010’da VISA suşlarının tigesiklin ve linezolid’e duyarlılığının araştırıldığı çalışmanın verileri tüm suşların bu antibiyotiklere duyarlı olduğunu göstermiştir (30). Tigesiklin ile ilgili yayınların pek çoğunda bildirildiği gibi gram pozitif bakterilerde çok başarılı olan bu antibiyotik çoklu ilaç direnci gösteren gram negatiflerde özellikle de *P.aeruginosa* izolatlarında aynı etkinliği gösterememektedir (31,32).

Avrupa ve Amerika’ya göre oldukça yüksek olan bu direnç oranları sonucunda ülkemizde, bazı doğu Avrupa ülkelerinde de olduğu gibi pek fazla tedavi alternatifinin söz konusu olmadığı gram negatif bakteri enfeksiyonları ile karşılaşabilmekteyiz (33).

2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması

Teknolojideki gelişmelerin modern tıp alanında önemli yansımalarından biri olan yabancı cisimler, hastaların hayat kalitelerini arttırarak tedavi sürecine olumlu katkılar sağlarlar. Bu olumlu katkıların yanında vücuda yabancı olan cisimlerin getirdiği yeni sorunlar son yıllarda tıpta en fazla çalışma yapılan alanlardan birisi olmuştur. Bunlardan belki de en merak edileni ve araştırılanı tıbbi araçların yüzeyine göç eden, yerleşen, giderek çoğalan, konak materyallerini de kendine barınak olarak kullanan mikroorganizmaların kendi oluşturdıkları maddeler ve konaktan aldıkları harçlar ile kurduğu şehirdir. Araştırmalar şehir içinde haberleşen, birbirleri ile alışveriş yapan, ortak düşmanları olan antibiyotiklere ve savunma sisteminin elemanlarına karşı birlikte savaşan, yabancı cisim orada durduğu sürece yerini terk etmeyen bu canlılar hakkında bilinenlerin bilinmeyenlerin yanında oldukça küçük kaldığını göstermektedir.

Biyofilm (slime) kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek’un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978’den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır. Bu teoriye göre; yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmı biyofilm tabakasını oluşturan matrikste büyürler ve bu sessiz bakteriler planktonik eşdeğerlerinden farklılık göstermektedirler. (34). Biyofilmlerin varlığı derin yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır (35).

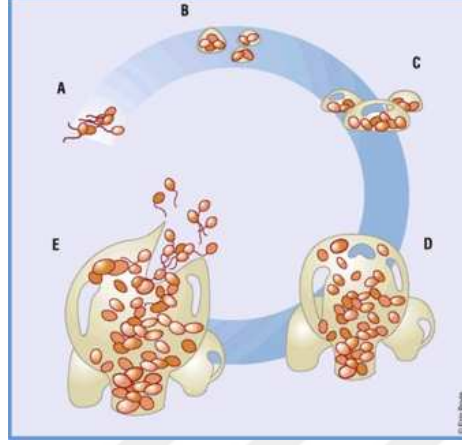
Biyofilmler ile ilgili çalışmalar 1970'lerin sonlarından beri yapılmaktadır. Biyofilmler, endokardit ve kistik fibrozdan otitis mediaya, yabancı cisim enfeksiyonlarından üriner sistem enfeksiyonlarına kadar birçok enfeksiyonun gelişiminden sorumludur.

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz (36). Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiğı gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağılı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır. Örneğın; *P.aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır (37). Bu da farklı mikroorganizmaların biyofilm meydana getirme hızının farklı olabileceğini düşündürmektedir

Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır :

1. *Mikroorganizmanın yüzeye tutunması*: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.
2. *Geri dönüşümsüz tutunma*: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Kistik fibrozis olgularında sık görülen *P.aeruginosa* biyofilmlerinde bu materyal aljinat yapıdadır. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.
3. *Kolonizasyon*: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.
4. *Kopma*: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluşuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (38).

Örneğin; *Proteus mirabilis* idrar sondaları ve kateterlerde oluşturdukları biyofilmler boyunca yayılarak konak hücrelerine invazyona yol açabilir. Şekil 2.2’de biyofilm oluşum aşamaları görülmektedir.



Şekil 2.2. Biyofilm Oluşum Basamakları

(http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n2/fig_tab/nrd1008_F1.html.)

(Erişim: 05.5.2010)

Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir (39-41). Biyofilm enfeksiyonları ilk dönemde genellikle asemptomatiktir. Konakçı direnci düştüğünde biyofilmden periyodik olarak kopup ayrılan planktonik (serbest formda) mikroorganizmalar akut enfeksiyona yol açabilir. Antibiyotiğin koruyucu dozları bu mikroorganizmaları kontrol ettiği halde biyofilmi etkilemez (38).

Biyofilm içindeki bakteriler, yüksek hücre yoğunluğu ve sınırlı besin nedeniyle yavaş gelişir (42). Bunun gibi birtakım çevresel faktörlerin etkisi ile genetik modülasyon sonucu ortaya çıkan ve “quorum sensing” (QS) olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir (43-46). Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmid transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir (47).

Biyofilmler, mikroorganizma türleri arasında farklılık göstermekle beraber karbonhidrattan zengin “glikokaliks” olarak da adlandırılırlar (48). Halen yapısı tam olarak tanımlanamamış olan biyofilmin karbonhidrat içeriğinin kendisine sağlamış olduğu birtakım özellikler göz

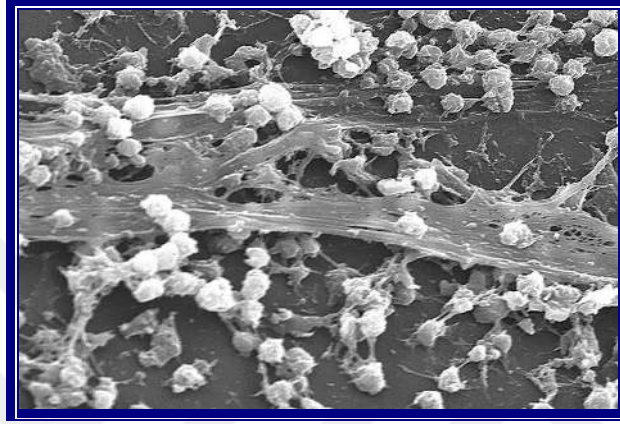
önüne alındığında yakın zamanda biyofilm yapısında var olduğu gösterilen siyalik asitin biyofilmin özelliğini sağlayan en fonksiyonel molekül olduğunu düşündürmektedir (49). Biyofilmin yapısı henüz kesin olarak tanımlanamamış olmakla birlikte, fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarının birçoğundan yapısındaki karbonhidratlar sorumlu gibi görünmektedir. Siyalik asit, organizmalarda, vertebralılarda ve tüm memelilerin dokularında bulunan bir aminoşekerdir. Siyalik asitin vücuttaki en önemli rolü, hücre yüzeyindeki negatif yükü oluşturmak ve hücreler ile hücreler arası matriks arasındaki ilişkileri sağlamaktır (50). Siyalik asidin hücre yüzeyindeki miktarı; hücrenin deformabilite, motilite ve adezivliği gibi özelliklerinde, dolaşan hücrelerin immun sistem tarafından tanınması ve kompleman tarafından yok edilmesi gibi immünolojik olaylarda maske görevi oluşturmada ve immun sistem hücrelerinin aktivasyonunda önemli bir belirleyicidir. Tüm bu özellikleri nedeniyle siyalik asitin, biyofilm fonksiyonlarında anahtar rolü olan karbonhidrat olabileceği düşünülmektedir. Hücre yüzeyinde glukokonjugat olarak bulunan siyalik asit, hücrenin yüzey elektrik yükünün sağlanması, bulunduğu hücredeki miktarına göre deformabilite, adherans ve motiliteyi düzenleme gibi özellikleri vardır (51). Siyalik asiti uzaklaştırmanın biyofilme ve biyofilm fonksiyonlarına olan etkisini incelemek amacıyla planlanan bir çalışma sonucunda nöraminidazın bakteri aderansına herhangi bir etkisi olmazken, biyofilm oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Yine nöraminidazın antibiyotik solüsyonları ile birlikte uygulanmasının da aynı şekilde biyofilm oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Bu anlamda biyofilm eradikasyonunu sağlamak için nöraminidazın, toksik antibiyotik dozlarına ulaşılmadan antibiyotik etkisinin sağlanmasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir (52).

Biyofilmler mevcut genetik yapı ile düzenlenebileceği gibi, ortamdaki diğer patojenlerden aktarılan genler aracılığı ile de mikroorganizmalar biyofilm oluşturabilme yeteneği kazanabilirler (53).

2.4. Biyofilmde Direnç Gelişimi ve Kombine Tedavi Yaklaşımları

Biyofilm tabakasına su ile temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde, kağıt makinelerinde ve dış ünitlerinde rastlanabilir. Bu ortamlarda biyofilm tabakası, bakterileri başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından ve toksinlerden korur. Bu cansız

yüzeylerin yanı sıra biyofilm canlı organizmada da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda oluşmaktadır. Biyofilmler insan vücudunda Şekil 2.3'te görüldüğü gibi kateterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilir (54). Yapılan çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2.3. Kateter Üzerinde Bakteriyel Biyofilm

(www.lib.uiowa.edu/hardin/md/cdc/staph/sem3.html. Erişim: 06.5.2010)

Bakteriler bir yüzeye tutunup biyofilm yapabildikleri zaman kendilerini fagositoz, antikor aracılı immun yanıt ve antibiyotiklerin öldürücü etkisinden koruyabilmektedirler. Biyofilmler, antimikrobiyal ajanlara dirençlilik göstermeleri, sürekli enfeksiyon kaynağı olabilmeleri, diğer patojen mikroorganizmaları barındırmaları ve direnç plazmidlerinin karşılıklı olarak geçişine yol açmaları nedeniyle oldukça önemlidirler. Bu durumda dışarıdan vücuda implante edilen araçlarda oluşan biyofilm ile çok daha zor tedavi edilebilen persistan enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (55).

Biyofilm enfeksiyonlarının artması ile birlikte biyofilm direncini aydınlatmaya yönelik olarak yapılan çalışmalar da ivme kazanmıştır. Biyofilm içinde mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. Biyofilmde yer alan mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre çok daha dirençlidir. Kistik fibrosis hastalarında yapılan pek çok çalışmada etken olan *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm ortamında MİK ve MBK değerlerinde planktonik hücrelerine göre 100-1000 kat artış olduğunu bildirmektedir. Bu nedenle de günümüzde tek antimikrobiyal ajan ile yapılan tedavilerin başarı oranları düşük

olduğundan kombinasyon yaklaşımları gündeme gelmektedir (56). Kateter yüzeylerinde biyofilm yapabilen MRSA suşları için de benzer tedavi direnci gözlenmektedir. Bu gibi enfeksiyonlarda biyofilm hücrelerinin duvar kalınlığındaki değişiklikler ve aktif replikasyonun biyofilmden zayıf oluşu, durağan fazdaki sesil hücreler nedeniyle vankomisine bile güçlü biyofilm üreten stafilokoklarda direnç gelişebileceğini bildiren yayınlar mevcuttur. Bu in vitro çalışmalarda bildirildiği gibi vankomisin, rifampisin gibi biyofilme iyi penetre olabilen antibiyotiklerle kombinasyonlarının tedavi başarısını artırabileceği düşünülmektedir (57).

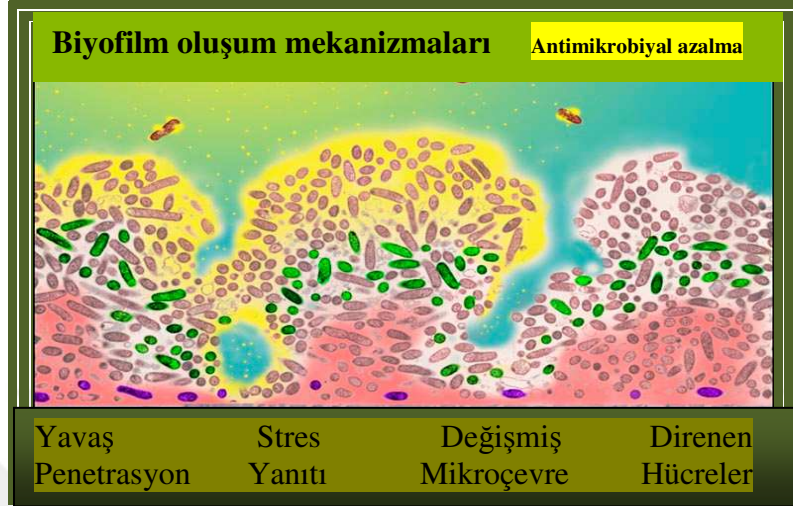
Tıbbi açıdan biyofilm oluşturan mikroorganizmalar içerisinde en fazla araştırılanlar *P. aeruginosa*, *S.epidermidis* ve *Candida spp.*'dir. Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlerinde, bilinen direnç mekanizmaları, örneğin; enzimatik inaktivasyon, atım pompaları, ilaç hedefinde mutasyon gibi mekanizmalar primer sorumlu faktörler olarak gözükmektedir. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir (58 ,59).

Biyofilm ortamı sadece antibiyotiklere karşı değil, dezenfektanlara karşı da direnç gelişmesinde rol oynamaktadır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler sıvı ortamda serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençlidir. Bu yolla oluşan direncin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte; glikokaliks bileşimi, hücre dışı enzimler, besin sınırlaması, dezenfektanın hücrelere ulaşmasında zorluk gibi çeşitli faktörlerin ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Bakteriler biyofilm tabakasından uzaklaştırılıp sıvı kültür ortamlarında serbestçe üretilirse, dirençli oldukları dezenfektanlara tekrar duyarlı hale gelirler. Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedir.

Ayrıca, endoskop ve bronkoskoplarda psödobiyofilm oluşumuyla ortaya çıkan *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium tuberculosis* ve hepatit C virüsü salgınları rapor edilmiştir (60, 61).

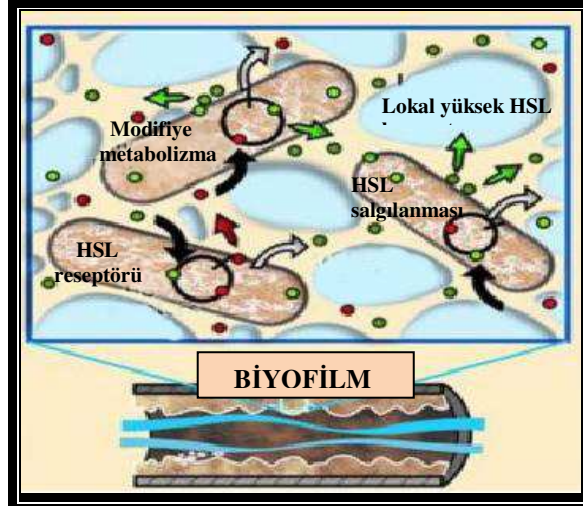
Biyofilm direncinde konvansiyonel antibiyotik direncinden farklı mekanizmaların etkili olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Biyofilm içine antibiyotiğin düşük orandaki penetrasyonu, burada besin maddelerinin sınırlı olması, yavaş üreme ve adaptif stres yanıtının oluşu, bakterinin çok aşamalı savunmasını oluşturmaktadır (Şekil 2.4). Biyofilmin oluşturduğu direnç, biyofilm popülasyonu içindeki fenotipik varyantların ortaya çıkması,

genel stres cevabının uyarılması, atım pompalarının ve QS sistemlerinin etkin hale gelmesini kapsamaktadır. Bu konunun genetik ve biyokimyasal yönleri ile ilgili pek çok çalışma vardır (55). Her bir gen ve gen ürünü bu dirence katkı yapabilecek özellikler kazanabilmektedir.



Şekil 2.4. Biyofilme Antibiyotik Direncini Oluşturan Mekanizmalar
(<http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/> Erişim: 05.5.2010)

Quorum sensing sisteminin bakteriye getirdiği pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçabilir. Quorum sensing sistemi içinde en önemli rolü sinyal molekülleri üstlenir. Bu moleküllere aynı zamanda “autoinducer” da denilmektedir. Bakterilerdeki sinyal molekülleri Şekil 2.5’te örneği görüldüğü gibi gram negatif bakterilerde asil homoserin lakton (AHL), siklik dipeptidler, gram-pozitif bakterilerde küçük peptidler, hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde “autoinducer-2”dir (62). *P. aeruginosa*’da AHL’ye ek olarak *Pseudomonas* kinolon sinyal molekülü (PQS) bulunur. Bu molekül yapısal olarak kinolonlara benzemekte ve AHL’ye bağlı QS sistemini modüle etmektedir (63). *P. aeruginosa*’da AHL ailesi üyelerinin yer aldığı las ve rhl olmak üzere iki QS sistemi bulunmaktadır (64). Her iki sistemin de kistik fibrozis olgularının balgam örneklerinde aktif oldukları saptanmıştır. Bu olgularda görülen *P.aeruginosa* izolatlarının ortak özellikleri sıklıkla mukoid fenotipte olmaları, aşırı miktarda aljinat sentezlemeleri ve oluşturdukları enfeksiyonların antibiyotik tedavilerine yeterli yanıt vermemesi şeklinde sıralanabilir. Biyofilm içinde üreme sayesinde *P.aeruginosa* hem antibiyotiklerin etkisinden hem de akciğerlerdeki immün yanıtı korunmaktadır (65).



Şekil 2.5. Biyofilimde QS Sistemi İçinde Sinyal Moleküllerinin Düzenlenişi

(<http://www.cs.montana.edu/ross/personal/intro-biofilms-s4.htm>)

(Erişim: 05.5.2010)

Aynı tür veya farklı türler arasında sinyal molekülleri ile etkileşim olabildiği gibi farklı cinsler arasında da pozitif veya negatif yönde etkileşim olduğu gözlenmiştir (66). Kistik fibrozisli hastalarda hastalığın erken dönemlerinde akciğerlerde *S.aureus* kolonize olmakta, ileri dönemde *S.aureus* kolonizasyonu yerini *P.aeruginosa*'ya bırakmaktadır. *S.aureus* kültürlerine eklenen *P.aeruginosa*'nın sinyal molekülü *S.aureus*'daki efektör molekül olan RNAlII'ün ekspresyonunu inhibe etmekte ve böylece virülans faktörlerinin oluşması engellenmektedir. Buna göre kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinden *S. aureus*'un eradikasyonunun bir yerde *P.aeruginosa*'ya bağlı olduğu söylenebilir (67).

Farklı gram negatif bakterilerin aynı aileye ait sinyal molekülleri sentezlediği bilinmektedir. Bunun bir göstergesi de kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde enfeksiyona yol açan ciddi mortalite nedenlerinden olan *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia*'nın aynı sinyal moleküllerinin kullanıldığı "quorum sensing" sistemine sahip olmaları nedeniyle birbirlerinin virülans faktörlerinin sentezine yardımcı olmasıdır (68). Dikkate değer bir diğer konu da biyofilm içindeki bakteri popülasyonunun kronik olarak antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarıyla karşı karşıya kalmasıdır. Bu durum daha dirençli bir popülasyonun seleksiyonunu kolaylaştırmakta ve bu enfeksiyonların tedavisini uzun sürede güçleştirmektedir. Antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarının koagülaz-negatif stafilokoklarda icaADBC operonuna olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kinupristin/dalfopristin ve tetrasiklin sub-MİK konsantrasyonlarının bu genin etkisini

artırdığı, dolayısıyla daha fazla adezin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (69). Bunun aksine florokinolonların subinhibitör konsantrasyonlarının ise *S. maltophilia*'nın plastik yüzeylere olan aderensi büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (70). Başka bir çalışmada da linezolid ve vankomisin stafilokokların oluşturduğu biyofilmlerdeki bakteri miktarını %90'a varan oranlarda azalttığı, ancak bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında büyük ölçüde glikokalikse bağlandıkları için biyofilm bakterilerini tamamen öldüremedikleri saptanmıştır (71).

Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimleri sonucunda genetik yapılarında değişiklikler gözükmemektedir ve biyofilmler ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluşturur. Direnç plazmidlerinin aktarılması sayesinde genetik yapısı değişen hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç geliştirmiş olur (72).

Biyofilmlere klinik açıdan bakıldığında özellikle kalıcı tıbbi araçların varlığında ve immüno Kompromize hastalarda gelişen infeksiyonlarda önemli rolleri olduğu, tedavi maliyetleri ve mortalitelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Diğer yandan biyofilm fenotipinin özellikle antibiyotik direnci açısından planktonik fenotipten çok farklı olması, hem mikrobiyologlar hem de tedaviyi uygulayan klinisyenler açısından ciddi bir problem oluşturmaktadır.

Son 10 yılda biyofilm yapısı ve biyofilm fenotipi ile ilgili çalışmalar giderek ivme kazanmıştır ve biyofilm oluşumunun önlenmesi ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde yakın zamanda yeni ve etkin stratejilerin geliştirilmesi ümidi devam etmektedir. Bunların başında da kombinasyonların tedavi başarısını artırabileceği görüşü bulunmaktadır. Farklı kombinasyonların biyofilmdeki etkinliklerini araştıran çalışmalar sürmektedir. İdeal kombinasyonlar ile tedavi başarısının artacağı düşünülmektedir. Örneğin kistik fibrosis hastalarında çok ilaca dirençli (MDR) *P.aeruginosa* suşlarında çeşitli kombinasyonlar araştırılmıştır. Meropenemin, siprofloksasin ve amikasin ile kombine edildiğinde en başarılı sonucu veren tedavi seçeneği olacağı bildirilmiştir (73, 74).

Yapılan araştırmalara baktığımız zaman *P.aeruginosa* için monoterapiler (yüksek doz tobramisin, meropenem gibi) kombinasyon tedavisi kadar etkili bulunmuş olmakla birlikte, örneğin aminoglikozid+ geniş spektrumlu beta laktam veya florokinolon+geniş spektrumlu beta laktam kombinasyonunun sinerji göstermeleri nedeniyle daha etkili olacağını bildiren

yayınlar mevcuttur (56, 73). Uygun olmayan veya yetersiz tedavilerin kullanılması mortaliteyi önemli ölçüde artırmaktadır (75, 76).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 12.02.2009 tarihinde KA09/08 numaralı proje numarası ile onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi'nde 2006-2009 yılları arasında çeşitli servislerde ve yoğun bakımlarda yatarak tedavi gören hastaların kateterlerinde üremiş 15 metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA), 15 metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) ve 15 *P.aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Klinik İzolatların Tiplendirilmesi

3.2.1. MRSA ve MRKNS

Kateter kültürlerinde üreyen kolonilerden gram boyası yapılarak gram pozitif kok olanlara katalaz testi yapılmıştır. Katalaz pozitif olanlara tüpte koagülaz testi uygulanmıştır. Katalaz ve koagülaz pozitif olan bakteriler *S. aureus* olarak isimlendirilmiştir. Koagülaz negatif olan izolatlar da koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak tiplendirilmiştir.

Metisilin Direnci:

Koagülaz negatif olan suşlar ve *S. aureus* metisilin direnci araştırılmak üzere sefoksitin ile disk difüzyon testine alınmıştır. McFarland 0.5 standardına uygun inokulum hazırlanarak Mueller Hinton II Agar'a (BBL, Fransa) ekim yapılmıştır. Onbeş dakika sonra Mueller Hinton II Agar (MHA) yüzeyinin kuruması beklenerek 30 µg'lık sefoksitin diski (Oxoid, İngiltere) yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmede Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (77) tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre 21 mm ve altındaki zon çapları dirençli, 22 mm ve üzerindeki zon çapları duyarlı olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. *P.aeruginosa* suşları

Kateter kültürlerinde üreyen kolonilerden gram boyası yapılarak, gram negatif basillerin Mueller Hinton besiyerine ve kanlı agara ekimleri yapılmıştır. Bu besiyerlerinde piyosiyane bağlı pigment oluşturma özelliklerine, oksidaz testinde pozitif sonuç vermelerine, laktöz negatif oluşlarına, MIL besiyerinde hareket özelliklerine ve indol-lizin negatifliklerine ve O-F

besiyerlerinde oksidatif-nonfermantatif oluşlarına bakılarak bu özellikleri ile *P.aeruginosa* olarak tiplendirilmiştir.

3.3. Antibiyotikler ve Sulandırılmaları

Çalışmada kullanılan antibiyotikler; vankomisin (Sigma, V2002), siprofloksasin (Fako, 3585), rifampisin (Sigma, R3501), gentamisin (Sigma, G3632), seftazidim (Sigma, C3809), sefazolin (Sigma, C5020), piperasilin (Sigma, P8396) ve amikasin (Sigma, A1774) üretici firmalarından satın alınmıştır. Linezolid (Pfizer, Amerika), meropenem (Astra Zeneca, İngiltere) ve tigesiklin (Wyeth Research, Pearl River, Amerika) üretici firmalarından ücretsiz temin edilmiştir.

MRSA ve MRKNS suşları için vankomisin, linezolid, meropenem, rifampisin, gentamisin, siprofloksasin, tigesiklin, sefazolin, seftazidim ile duyarlılık çalışması yapılmıştır. *P.aeruginosa* suşları için de gentamisin, siprofloksasin, meropenem, piperasilin, seftazidim, amikasin, tigesiklin ile duyarlılık çalışması yapılmıştır.

3.3.1. Antibiyotiklerin Hazırlanması

Tablo 3.1. Antibiyotik Tartım Miktarları ve Stok Konsantrasyonları

	Tartılan miktar (gr)	Stoktaki antibiyotik konsantrasyonu mg/L
Vankomisin	0.0512	5120
Linezolid	0.0256	2560
Meropenem	0.0512	5120
Tigesiklin	0.00128	1280*
Rifampisin	0.0256	2560
Gentamisin	0.0512	5120
Siprofloksasin	0.0256	2560
Seftazidim	0.0256	2560
Sefazolin	0.0204	2048
Piperasilin	0.0204	2048
Amikasin	0.0256	2560

*Tigesiklin her çalışmada günlük hazırlanmıştır.

3.3.2. Antibiyotik Sulandırılmaları

Rifampisin, siprofloksasin, linezolid, amikasin için antibiyotik dilüsyonları hazırlanırken stok 1/20 oranında sulandırılmıştır. Böylece 128 mg/L antibiyotik elde edilmiştir. İlk kuyucuğa 100 µl eklenerek, seri dilüsyonu yapılmış ve üzerine bakteri süspansiyonu eklenince son konsantrasyonu 32 mg/L olmuştur.

Vankomisin, Gentamisin ve Meropenem için antibiyotik dilüsyonları stoktan 1/20 sulandırılmıştır. Böylece 256 mg/L elde edilmiştir. İlk kuyucuğa 100 µl eklenerek, seri dilüsyonu yapılmış ve üzerine bakteri süspansiyonu eklenince ilk kuyucukta son konsantrasyonu 64 mg/L olmuştur.

Piperasilin ve sefazolin için antibiyotik dilüsyonları hazırlanırken stok 2048 mg/L, ilk kuyucuğa 100'er µl eklenip seri dilüsyonu yapılmıştır ve üzerine bakteri süspansiyonu eklenince ilk kuyucukta son konsantrasyonu 512 mg/L olmuştur.

P.aeruginosa izolatları için seftazidim stoktan 2,5 kat sulandırılmıştır. Böylece 1024 mg/L elde edildi. İlk kuyucuğa 100 µl eklenerek, seri dilüsyonu yapılmıştır ve üzerine bakteri süspansiyonu eklenince son konsantrasyonu 256 mg/L olmuştur. Stafilokoklar için seftazidim hazırlanırken son konsantrasyonu 512 mg/L olarak başlatılmıştır.

Tigesiklin her çalışmada günlük olarak hazırlanıp (128 mg/L) kullanılmıştır ve ilk kuyucuğa 100 µl eklenerek, seri dilüsyonu yapılmış ve üzerine bakteri süspansiyonu eklenince son konsantrasyonu 32 mg/L olmuştur.

3.4. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Seçilen antibiyotikler ile önce CLSI'nın önerileri doğrultusunda standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile planktonik hücrelerde duyarlılık araştırılmış, böylece minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) belirlenmiştir. Daha sonra her bir suş ile biyofilm oluşturulup sesil hücrelerde aynı antibiyotikler ile yine MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. Ardından ikili ve üçlü antibiyotik kombinasyonları oluşturulup çoklu kombinasyonlu bakterisidal test (ÇKBT) yöntemi ile hem planktonik hücrelerde hem de biyofilmde etkinlikleri belirlenmiştir (84).

3.4.1. Planktonik Hücrelerde Minimal İnhibitör Konsantrasyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonların Belirlenmesi

a) Antibiyotik dilüsyonları hazırlanmıştır.

-Vankomisin, Gentamisin ve Meropenem için ilk kuyucukta 64 mg/L olacak şekilde 5120 mg/L stoktan sulandırım yapılmıştır.

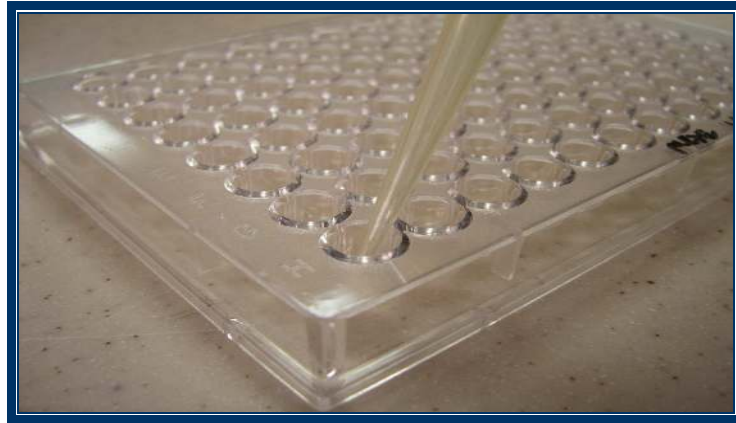
-Rifampisin, siprofloksasin, amikasin ve linezolid için ilk kuyucukta 32 mg/L olacak şekilde 2560 mg/L stoktan sulandırım yapılmıştır.

-Seftazidim pseudomonaslar için ilk kuyucukta 256 mg/L, stafilokoklar için 512 mg/L olacak şekilde 2560mg/L stoktan sulandırım yapılmıştır.

-Tigesiklin için ilk kuyucukta 32 mg/L olacak şekilde 1280 mg/L stoktan sulandırım yapılmıştır.

-Piperasilin ve sefazolin için ilk kuyucukta 512 mg/L olacak şekilde 2048 mg/L stoktan sulandırım yapılmıştır.

Deneylerde % 2 oranında NaCl içeren katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (BBL, Fransa) kullanılmıştır. Doksan altı kuyucuklu steril U tabanlı polistren plaklara (Nunc, Danimarka) 100'er µl Mueller Hinton Broth (MHB) dağıtılmıştır (Şekil 3.1). Ardından hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından plakların ilk sütunundaki kuyucuklara 100'er µl eklenmiştir. Seri dilüsyonları yapılmış ve 12. sütun üreme kontrol olarak bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Doksan Altı Kuyucuklu Steril U Tabanlı Polistren Plaklar

b) Bakterilerin 24 saatlik kültüründeki kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp, son inokülüm konsantrasyonu 5×10^5

CFU/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırılmıştır ve 100'er µl tüm kuyucuklara dağıtılmıştır.

c) Tüm plaklar etüvde 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek ertesi gün sonuçları değerlendirilmiştir. Plaklar hem gözle değerlendirilmiş hem de optik okuyucuda (ELx800, Universal Microplate Reader, Bio-Tek) 530 nm dalga boyunda okutulmuştur. Her iki sonuç birlikte değerlendirilerek, üremenin inhibe olduğu en son kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak yorumlanmıştır.

d) Hiç üreme görülmeyen kuyucuklardan 10'ar µl alınarak Triptik soy agar (BD, Fransa) yüzeyine damla ekimi yapılmıştır. Plaklar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek, üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MBK olarak yorumlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Triptik Soy Agarda Planktonik Hücrelerin MBK'larının Belirlenmesi

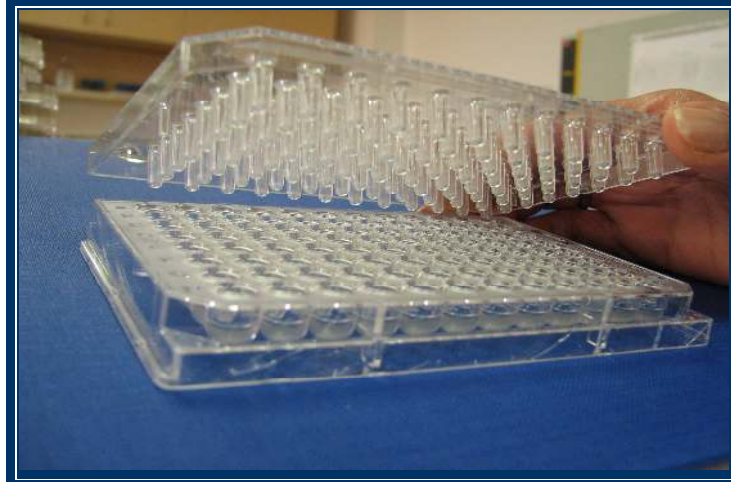
e) Tüm testler 2 kez çalışılmıştır.

f) Tüm testlerde *S.aureus* ATCC 25923 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

3.4.2. Biyofilmde Minimal İnhibitör Konsantrasyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonların Belirlenmesi

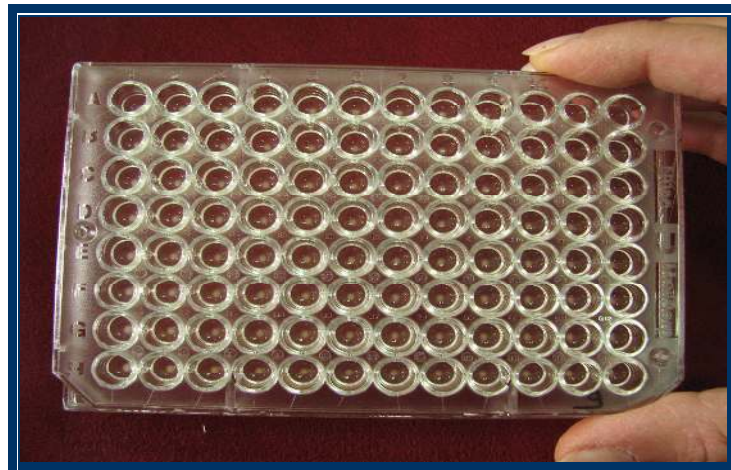
a) Biyofilm deneyleri iğneli kapaklı polistren plaklarda (Şekil 3.3) çalışılmıştır (Nunc, Danimarka). Tüm suşların taze pasajları kullanılarak MHB-II (BBL, Fransa) ile 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyon hazırlanmıştır. Plaklara 100'er µl dağıtılıp,

üzerine polistren yapıda iğneli kapaklar kapatılarak 18-24 saat 37°C’de çalkalanarak inkübe edilmiştir.



Şekil 3.3. Biyofilm Oluşturulan İğneli Kapaklı Polistren Plaklar

- b) Sesil hücreler ile çalışmada antibiyotik dilüsyonları planktonikten farklı olarak 2 dilüsyon üstünden başlayacak şekilde hazırlanmıştır. Yeni plaklara önce 100'er µl MHB-II dağıtılıp, 1. sıra kuyucuklara 100'er µl antibiyotik eklenerek seri dilüsyon yapılmıştır. Daha sonra önceden biyofilmin oluşturulduğu iğneli kapaklar bu yeni plaklara kapatılmıştır. Plaklar 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün optik okuyucuda 530 nm dalga boyunda ve gözle okunarak üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon biyofilm inhibitör konsantrasyonlar (BİK) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kuyucuklarda Üremenin Gözlenmesi

- c) Biyofilm Bakterisidal Konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla steril 96 kuyucuklu U tabanlı yeni plaklara MHB-II besiyeri 100'er µl dağıtılıp, biyofilm inhibitör konsantrasyonları belirlenen iğneli kapak transfer edilmiştir. Sonikatörde 5 dakika kuvvetle çalkalanıp tekrar 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün optik okuyucuda 530 nm dalga boyunda ve gözle okunarak üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon biyofilm bakterisidal konsantrasyonlar (BBK) olarak belirlenmiştir.
- d) Tüm testlerde *S.aureus* ATCC 25923 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 kalite kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

3.5. Çoklu Kombinasyonlu Bakterisidal Test (ÇKBT)

(Multiple-Combination Bactericidal Testing)

3.5.1. Planktonik Hücrelerde ÇKBT

MRSA ve MRKNS izolatları için 2 farklı çalışma düzeneği oluşturulmuştur. Bu izolatların dirençli olduğu kabul edilen meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren 20 ikili, 44 üçlü kombinasyon ve diğer antibiyotikler ile de 15 ikili ve 15 üçlü antibiyotik kombinasyonu seçilmiştir. Böylece toplam 94 farklı kombinasyon hazırlanmıştır. (Tablo 3.2)

P.aeruginosa için 21 ikili ve 35 üçlü kombinasyon oluşturulmuştur. Önce mikropalak üzerinde tüm kombinasyonların yerleştirildiği bir şablon hazırlanmıştır. (Tablo 3.3)

Tablo 3.2. MRSA ve MRKNS İçin Antibiyotik Kombinasyon Şablonu

ÇKBT KOMBİNASYONLARI												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LV	LM	LG	LC	LT	LR	LS1	LS2	TRS1	RS2	RS1	TRS2
B	RS1S2	LVS1	LVS2	LMG	LMC	LMT	LMR	LMS1	LMS2	LGC	LGT	LGR
C	LGS1	LGS2	LCT	LCR	LCS1	LCS2	LTR	LTS1	LTS2	LRS1	LRS2	LS1S2
D	VM	VG	VC	VT	VR	VS1	VS2	VMG	VMC	VMT	VMR	VMS1
E	VMS2	VGC	VGT	VGR	VGS1	VGS2	VCT	VCR	VCS1	VCS2	VTR	VTs1
F	VTS2	VRS1	VRS2	VS1S2	MG	MC	MT	MR	MS1	MS2	MGC	MGT
G	MGR	MGS1	MGS2	GC	GT	GR	GS1	GS2	GCT	GCR	GCS1	GCS2
H	CT	CR	CS1	CS2	CTR	CTS1	CTS2	TR	TS1	TS2	üreme/sterilite kontrol	

Tablo 3.3. *P.aeruginosa* için Antibiyotik Kombinasyon Şablonu

ÇKBT KOMBİNASYONLARI												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	GM	GP	GS2	GA	GT	GCM	GCP	GCS2	GCA	GCT	GMP
B	GMS2	GMA	GMT	GPS2	GPA	GPT	GS2A	GS2T	GAT	CM	CP	CS2
C	CA	CT	CMP	CMS2	CMA	CMT	CPS2	CPA	CPT	CS2A	CS2T	CAT
D	MP	MS2	MA	MT	MPS2	MPA	MPT	MS2A	MS2T	MAT	PS2	PA
E	PT	PS2A	PS2T	PAT	S2A	S2T	S2AT	AT	üreme kontrol	sterilite kontrol		
F												
G												
H												

Tablo 3.4. Çoklu Kombinasyonlu Bakterisidal Test için
Kullanılan Antibiyotik Sınır Değerleri

Antibiyotikler	Sınır değerleri (mg/L)	Referans
	Dirençli	
Linezolid	8	CLSI
Vankomisin	32	CLSI
Meropenem	16	CLSI
Gentamisin	16	CLSI
Siprofloksasin	4	CLSI
Tigesiklin	0.5/8	CLSI
Rifampisin	4	CLSI
Sefazolin	32	CLSI
Seftazidim	32	CLSI
Piperasilin	128	CLSI
Amikasin	64	CLSI

Stok antibiyotik solüsyonlarından her antibiyotik için CLSI'nın önerdiği (Tablo 3.4) direnç sınır değerinin 10 kat yüksek konsantrasyonunda hazırlanan antibiyotikler önceden planlanan şablona uygun kuyucuklarına 10'ar µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Üçlü kombinasyonlarda her bir antibiyotikten 10 µl koyulmuştur. İkili kombinasyonlarda ise yine her bir antibiyotik 10'ar µl koyulmuş, 10 µl de % 2 NaCl içeren MHB II eklenmiştir.

Bakteri süspansiyonu ve plakların hazırlanması

Bakterilerin taze pasajlarından önce 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanıp son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde, 1/100 oranında sulandırılmıştır. Antibiyotikler dağıtıldıktan sonra tüm kuyucuklara hazırlanan bu bakteri süspansiyonlarından plaklardaki tüm kuyucuklara 70'er µl ilave edilmiştir. Böylece tüm kuyucuklarda toplam hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır.

Mikroplaklar 37° C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra gözle ve optik okuyucuda 530 nm dalga boyunda üreme inhibisyonu değerlendirilmiştir. Üreme olmayanlardan 10'ar µl alınarak Triptik soy agar yüzeyine damla ekimi yapılmıştır. 37°C'de 18-24 saat tekrar inkübe edilmiştir. Ertesi gün üreme olmayan kuyucuklarda bakterisidal etki belirlenmiştir.

3.5.2. Biyofilmde ÇKBT

1. Biyofilm deneyleri yine iğneli kapaklı polistren plaklarda çalışılmıştır. (Nunc, Danimarka) Tüm suşların taze pasajları kullanılarak MHB-II ile 0.5 McFarland ayarlanmıştır. Plaklara 100'er µl dağıtılıp, üzerine iğneli kapaklar kapatılarak 18-24 saat 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.

2. Antibiyotiklerin ikili ve üçlü olacak şekilde kombinasyonları yine aynı planktonik hücreler için yapıldığı gibi hazırlanmıştır. Yeni bir U tabanlı mikroplağa antibiyotik kombinasyonları şablondaki gibi dağıtılıp üzerine 70'er µl MHB II eklenerek, biyofilm oluşturulmuş iğneli kapaklar, antibiyotik kombinasyonlarını içeren bu yeni mikroplağa aktarılmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Üremenin inhibisyonu biyofilmde gözle ve optik okuyucuda 530 nm. dalga boyunda okutularak değerlendirilmiştir.

3. Biyofilmde bakterisidal konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla steril 96 kuyucuklu U tabanlı yeni plaklara MHB-II besiyeri 100'er µl dağıtılıp, iğneli kapak bu plağa transfer edilmiştir. Sonikatörde 5 dakika kuvvetle çalkalanıp 37° C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

Ertesi gün optik okuyucuda 530 nm dalga boyunda ve gözle okunarak üremenin görülmediği kuyucukta bakterisidal etki varlığı belirlenmiştir.

3.6. Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik inceleme için biyofilm oluşturan bir *P.aeruginosa* izolatı seçilmiştir. U tabanlı bir mikropalak kuyucuğunda MHB-II ile hazırlanan süspansiyonun 1 gecelik inkübasyonu ile biyofilm oluşturulmuştur ve sonrasında 1200 rpm.de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülen bakteriler %2'lik agar içerisine gömülmüştür. Bakteri içeren agar donduktan sonra 1 mm³'lük parçalara ayrılmıştır. Yüzde birlik osmium tetraoksit (OsO₄) ile tekrar fikse edilen örnekler, farklı derecelerde alkol solüsyonları (50, 60, 70, 80, 90, 96 ve %100 etanol) ile dehidrate edilmiştir. Propilen oksitten geçirildikten sonra, örnekler Araldyte CY 212, DDSA (2-dodesenil süksinik anhidrit), BDMA (benzildimetil amin) ve dibutilfitalat içine gömülmüştür. Yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile negatif boyandıktan sonra LEO 906E transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile 60.000 kez büyütülerek incelenmiştir. LEO 906E markalı makine ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Veri seti iki oran z testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar gözlem sayısı(n) ve oran(%) olarak ifade edilmiştir, p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler MINITAB 15.0 istatistik yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara Hastanesi'nde farklı servislerde tedavi gören hastaların çeşitli kateter kültürlerinde üremiş olan 15 *S.aureus*, 15 KNS ve 15 *P.aeruginosa* izolatı ile antibiyotik duyarlılık çalışmaları önce tek antibiyotik ile sonra ikili ve üçlü kombinasyonlar oluşturularak çalışılmıştır. Çalışmada seçilen antibiyotikler için duyarlılık sınırları CLSI (77) ve EUCAST'in (91) önerdiği şekilde Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. MRSA/MRKNS ve *P.aeruginosa* için Antibiyotik MİK Sınır Değerleri (mg/L)

	MRSA/MRKNS Duyarlı / Orta duyarlı / Dirençli			<i>P.aeruginosa</i> Duyarlı / Dirençli	
Meropenem	≤4	8	≥16	≤4	≥16
Gentamisin	≤4	8	≥16	≤4	≥16
Siprofloksasin	≤1	2	≥4	≤4	≥16
Vankomisin	≤4	8-16	≥32		
Rifampisin	≤1	2	≥4		
Linezolid	<4				
Tigesiklin	<0.5			≤2	≥8 *
Sefazolin	≤8		≥32		
Seftazidim	≤8		≥32	≤8	≥32
Amikasin				≤16	≥64
Piperasilin				≤64	≥128

*EUCAST kriterlerine göre

Tablo 4.2. Kalite Kontrol Suşları için Kabul Edilebilir MİK Sınırları (mg/L)

	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Meropenem	0.03-0.125	0.25-1
Gentamisin	0.12-1	0.5-2
Siprofloksasin	0.12-0.5	0.25-1
Vankomisin	0.5-2	-
Rifampisin	0.004-0.03	16-64
Linezolid	1-4	-
Tigesiklin	0.03-0.25	-
Sefazolin	0.25-1	-
Seftazidim	4-16	1-4
Amikasin	1-4	1-4
Piperasilin	1-4	1-8

4.1. MRSA ve MRKNS İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Her bir izolat için önce planktonik sonra biyofilm yapısında duyarlılıklar belirlenmiştir. Tablo 4.3 ve 4.4’de sırası ile MRSA ve MRKNS izolatlarında planktonik form ve biyofilmde MİK ve MBK değerleri birlikte sunulmuştur.

MRSA ve MRKNS izolatlarının meropenem, sefazolin ve seftazidim’e duyarlılıkları diğer antibiyotik sonuçları ile birlikte aynı tablo ve grafiklerde gösterilmiştir. Bu antibiyotiklere ait bulgular ayrı olarak tartışılmıştır.

Tablo 4.3’te MRSA izolatları bugularında görüldüğü gibi tüm antimikrobiyallerin biyofilm ortamında duyarlılıkları azalmıştır. Gentamisinde planktonik hücrede %26.6 oranında duyarlılık bulunmuşken biyofilm hücrelerinde duyarlılık oranları %46.6 saptanmış, ancak anlamlı kabul edilmemiştir. Gentamisin için planktonik ve biyofilm hücrelerinde MİK ve MBK değerleri incelendiğinde biyofilmde daha duyarlı gibi görünen 3 suşun MİK değerlerinin planktoniğe göre 1 kat azaldığı, MBK değerlerinin ise 2-4 kat azaldığı gözlenmiştir. MRSA izolatlarında biyofilm ortamda en yüksek duyarlılık vankomisin (%86) ve tigesiklin (%86) ile elde edilmiştir.

Tablo 4.4’te ise MRKNS izolatlarının bulguları sunulmuştur. Suşlarının vankomisine hem planktonik hücrelerinde hem de biyofilm ortamında yüksek duyarlılık (%100-%93.3) göstermesi dikkat çekici bulgu olmuştur. Ayrıca rifampisin (%66.6-%66.6) ve siprofloksasinin (%26.6-%26.6) planktonik ve biyofilm ortamında eşit duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer tüm antibiyotiklerde planktonik hücredeki MBK değerleri çoğunlukla biyofilmlere göre daha düşük gözlenirken, tigesiklin’de ise MBK değerlerinin biyofilmde 2-4 kat daha düşük olduğu dikkati çekmiştir.

Tablo 4.3. MRSA İzolatlarında Planktonik ve Biyofilme Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)

SUS NO	GENTAMİSİN				SİPROFLOKSASİN				VANKOMİSİN				RİFAMPİSİN				LİNEZOLİD				TİGESİKİLİN				MEROPENEM				SEFAZOLİN				SEFTAZİDİM			
	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
1	32	>512	512	>512	>32	>512	256	256	1	32	8	64	>32	>512	>512	>512	0.25	8	1	128	0.5	8	1	4	64	>512	128	256	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
2	8	>512	8	>512	32	>512	512	>512	1	128	4	128	>32	>512	>512	>512	0.25	2	8	128	0.125	8	0.5	8	64	>512	128	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
3	0.06	8	8	64	32	>512	256	>512	1	8	8	128	>32	>512	>512	>512	0.125	32	16	128	0.125	8	0.125	4	64	>512	128	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
4	8	>512	8	64	32	>512	512	512	1	32	4	256	>32	>512	>512	>512	1	32	64	128	0.06	8	0.25	2	64	>512	128	512	>512	>512	2048	>2048	512	>512	1024	>1024
5	16	>512	8	128	32	>512	512	512	1	16	4	256	>32	>512	>512	>512	0.5	8	64	128	0.125	8	0.25	2	64	>512	128	256	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
6	8	128	8	128	32	>512	512	>512	1	32	4	256	>32	>512	>512	>512	0.25	4	32	64	0.125	8	0.125	4	64	>512	128	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
7	16	>512	8	128	32	>512	512	>512	1	512	4	256	>32	>512	>512	>512	1	16	64	128	0.125	4	0.125	2	64	>512	128	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
8	16	>512	8	64	16	>512	64	512	1	32	16	256	>32	>512	>512	>512	0.25	8	4	128	0.125	8	0.125	4	64	256	128	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
9	16	>512	512	>512	32	>512	128	>512	0.5	8	4	64	>32	>512	>512	>512	1	8	4	128	0.25	8	16	4	64	512	128	512	512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
10	16	>512	512	>512	32	>512	512	>512	1	32	2	128	>32	>512	>512	>512	0.25	8	128	128	0.125	8	0.5	4	64	512	128	512	512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
11	16	>512	512	>512	32	>512	512	512	1	32	2	128	>32	>512	>512	>512	0.25	8	128	128	0.125	8	0.25	4	32	512	64	512	>512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
12	16	>512	512	>512	32	>512	64	512	1	16	16	128	>32	>512	>512	>512	0.5	8	128	128	0.125	8	0.25	4	64	>512	128	512	512	>512	1024	2048	>512	>512	1024	>1024
13	16	>512	512	>512	32	>512	128	>512	1	>512	2	128	>32	>512	>512	>512	0.25	32	128	>128	0.06	8	0.25	4	64	>512	128	512	512	>512	1024	2048	>512	>512	1024	>1024
14	16	>512	512	>512	32	>512	128	>512	1	16	2	128	>32	>512	>512	>512	0.25	16	4	128	0.06	8	0.5	4	64	512	128	512	512	>512	1024	2048	>512	>512	1024	>1024
15	16	>512	512	>512	32	>512	128	>512	0.5	32	2	128	>32	>512	>512	>512	0.25	8	32	128	0.06	16	0.5	2	64	>512	128	512	512	>512	2048	>2048	>512	>512	1024	>1024
Duyarlılık %	26.6				0				100				0				100				100															

P: Planktonik

B: Biyofilm

Tablo 4.4. MRKNS İzolatlarında Planktonik Hücreler ve Biyofilmden Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)

SUŞ NO	GENTAMİSİN				SİPROFLOKSASİN				VANKOMİSİN				RİFAMPİSİN				LİNEZOLİD				TİGESİKLİN				MEROPENEM				SEFAZOLİN				SEFTAZİDİM															
	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK												
1	32	>64	256	>512	32	512	256	512	1	64	16	256	>32	>512	>512	>512	0.25	2	8	128	0.06	8	128	16	16	>64	64	>512	128	512	512	1024	512	>512	512	>1024												
2	32	>64	512	>512	32	512	256	512	1	64	16	>256	>32	>512	>512	>512	0.125	2	2	64	0.06	4	1	16	16	>64	64	128	64	>512	512	512	512	>512	512	>1024												
3	0.06	4	64	64	8	256	16	>512	1	>512	8	>256	32	>512	>512	>512	0.125	2	2	64	0.03	8	2	16	4	>64	32	128	4	512	16	64	128	>512	128	>1024												
4	8	64	512	512	32	512	64	>512	1	64	4	128	0.03	16	0.5	0.5	0.25	8	1	32	0.25	8	0.25	8	8	>64	64	256	512	>512	1024	2048	512	>512	>1024	>1024												
5	32	>64	512	>512	0.125	4	2	16	1	128	4	128	0.03	32	0.5	0.5	0.5	4	2	16	0.125	8	0.5	8	4	>64	32	256	4	128	128	256	256	>512	128	>1024												
6	0.06	4	16	16	16	256	256	>512	1	64	8	256	0.03	8	0.5	0.5	0.25	4	2	64	0.03	8	0.5	32	4	16	32	256	32	>512	256	512	256	>512	256	>1024												
7	32	>64	512	>512	32	512	256	>512	1	512	16	>256	0.25	4	0.5	0.5	0.25	8	4	64	0.03	4	0.5	32	32	>64	64	512	32	512	64	256	512	>512	256	>1024												
8	2	>64	32	256	32	>512	256	>512	0.5	32	4	256	32	>512	>512	>512	0.25	4	4	64	0.25	8	0.5	16	64	>64	128	>512	512	>512	1024	2048	>512	>512	1024	>1024												
9	2	>64	64	128	32	>512	128	512	1	64	16	128	>32	>512	32	32	0.25	16	128	128	0.06	4	128	8	32	>64	128	512	128	256	16	1024	256	>512	512	1024												
10	1	64	64	128	4	256	512	>512	1	>512	8	256	0.03	1	0.03	0.125	0.125	8	2	128	0.03	2	0.25	8	2	32	0.5	64	4	512	64	64	16	>512	16	32												
11	32	64	64	128	32	512	512	>512	2	512	4	256	0.03	4	0.03	0.25	0.125	8	4	64	0.06	8	0.125	8	16	32	32	128	4	>512	16	64	16	>512	16	64												
12	8	>64	32	256	0.06	8	0.5	8	1	64	64	>256	0.03	0.5	0.03	0.25	0.125	8	4	64	0.125	8	16	8	2	32	32	128	16	>512	128	1024	32	>512	8	16												
13	32	>64	256	512	0.03	16	0.5	64	1	256	8	256	0.03	2	0.03	0.25	0.25	8	2	64	0.06	8	0.5	16	64	>64	256	>512	512	>512	2048	>2048	512	>512	1024	>1024												
14	32	64	512	512	0.06	0.5	0.5	16	0.125	>512	2	256	0.03	0.5	0.03	0.25	0.25	4	1	32	0.03	8	0.125	0.5	8	16	1	64	<0.5	512	8	16	16	32	1	32												
15	0.06	16	0.5	8	4	128	16	512	1	32	8	128	0.03	0.5	0.03	0.125	0.06	2	1	64	0.03	8	0.125	8	4	32	32	>512	2	256	256	2048	64	256	128	1024												
Duyarlılık %	53.3				26.6				100				93.3				66.60				66.60				100				60				100				66.6											

P: Planktonik

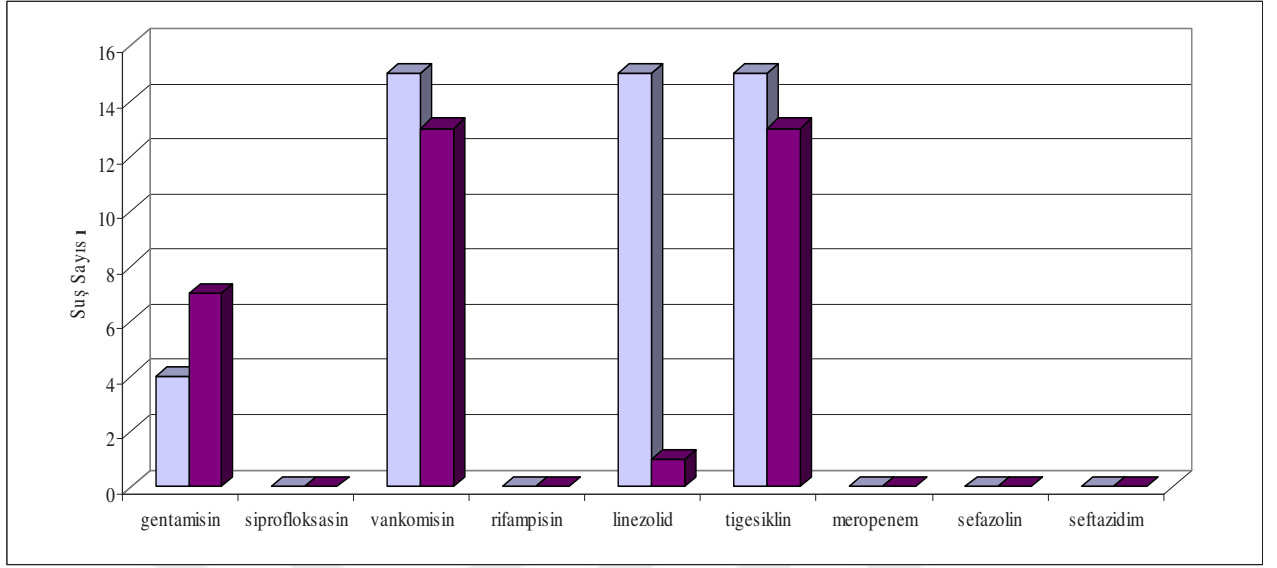
B: Biyofilm

Grafik 4.1’de ve açıklama tablosunda gösterildiği gibi planktonik formda MRSA izolatlarının tamamı vankomisin, tigesiklin ve linezolid’e duyarlı bulunmuştur. Ancak biyofilmde vankomisin ve tigesiklin’e izolatların % 86.6’sı duyarlı iken, linezolid’e %6.6’sı duyarlıdır. Linezolid’de biyofilm hücrelerine etkinliğin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0.001$). MRSA izolatları siprofloksasin ve rifampisin’e hem planktonik formda hem de biyofilmde %100 dirençli tespit edilmiştir.

Grafik 4.2 ve açıklama tablosunda gösterildiği gibi MRKNS izolatlarında elde edilen sonuçlara göre, planktonik formda suşların tamamı vankomisin, tigesiklin ve linezolid’e duyarlı iken gentamisin’e %53.3, siprofloksasin’e %26.6 ve rifampisin’e %66.6’sı duyarlı bulunmuştur. Biyofilm ortamında siprofloksasin ve rifampisin’e suşların duyarlılığı aynı bulunurken gentamisin, linezolid ve tigesiklin’de duyarlılıklarda azalma ($p<0.01$) gözlenmiştir. Vankomisin’de duyarlılık biyofilmde %93.3’e inmiştir ve azalma anlamlı bulunmamıştır. Siprofloksasin ise biyofilm ortamında da planktonik hücrelerle aynı duyarlılığı göstermiştir (%26.6-%26.6).

Meropenem, sefazolin ve seftazidimin MRSA izolatları üzerindeki MİK ve MBK değerleri incelendiğinde biyofilm ortamında bu değerlerde belirgin artış görülmemiştir.

MRKNS izolatlarında seftazidim’de biyofilm MİK ile planktonik MİK değerleri karşılaştırıldığında, iki suшта MİK değeri biyofilmde daha düşük bulunmuştur. Üç suшта da MBK değerleri düşmüştür. Meropenem ve sefazolin’de ise MİK ve MBK değerleri artış göstermemiştir. Her ne kadar metisilin dirençli stafilokoklar bu antimikrobiyallere dirençli kabul edilseler de biz çalışmamızda kombinasyonların etkinliğini araştırmayı amaçladığımız için karşılaştırma yapabilmek için grafik 4.2’de bu suşlardan MİK değerleri sınır değerin altında olanlar duyarlı suş olarak gösterilmişlerdir.



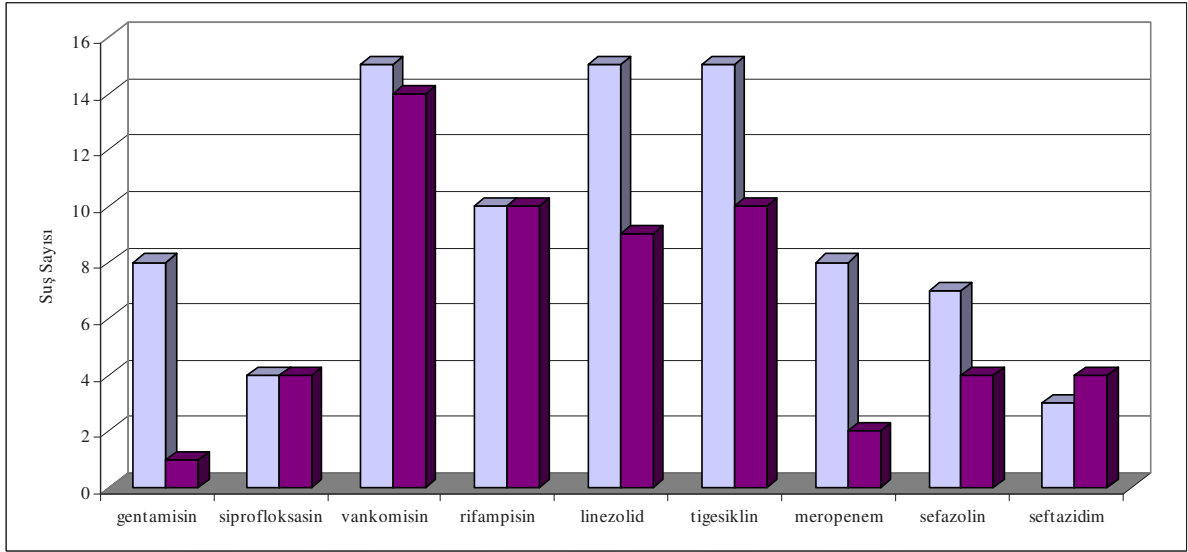
Grafik 4.1. MRSA İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Planktonik: 

Biyofilm: 

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	
	P (%)	B (%)
gentamisin	4 (26.6)	7 (46.6)
siprofloksasin	0	0
vankomisin	15 (100)	13 (86.6)
rifampisin	0	0
linezolid	15 (100)	1 (6.6)
tigesiklin	15 (100)	13 (86.6)

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	
	P(%)	B(%)
meropenem	0	0
sefazolin	0	0
seftazidim	0	0



Grafik 4.2. MRKNS İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Planktonik: 

Biyofilm: 

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	
	P (%)	B (%)
gentamisin	8 (53.3)	1 (6.6)
siprofloksasin	4 (26.6)	4 (26.6)
vankomisin	15 (100)	14 (93.3)
rifampisin	10 (66.6)	10 (66.6)
linezolid	15 (100)	9 (60)
tigesiklin	15 (100)	10 (66.6)

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	
	P (%)	B (%)
meropenem	8 (53.3)	2 (13.3)
sefazolin	7 (46.6)	4 (26.6)
seftazidim	3 (20)	4 (26.6)

MRSA ve MRKNS izolatlarının ikili kombinasyonlara duyarlı olan suş sayıları tablo 4.5'te sunulmuştur. Buna göre MRSA izolatlarında planktonik hücreler gentamisin+siprofloksasin, gentamisin+rifampisin ile siprofloksasin+rifampisin kombinasyonları haricinde diğer kombinasyonlara %90'ın üzerinde duyarlı bulunmuştur. Siprofloksasin+rifampisin kombinasyonuna tüm suşlar dirençlidir. Siprofloksasin ve rifampisin tek başlarına uygulandığında, bu antimikrobiyallere dirençli bulunan MRSA suşlarında, bu ikilinin kombinasyonunda da tamamen direnç gözlenmiştir. Biyofilm ortamında ise tüm kombinasyonlarda istatistiksel olarak duyarlılıklarda belirgin anlamlı düşüş görülmüştür ($p<0.001$). Biyofilm ortamında en iyi aktivite vankomisin ile olan ikili kombinasyonlarda görülmüştür.

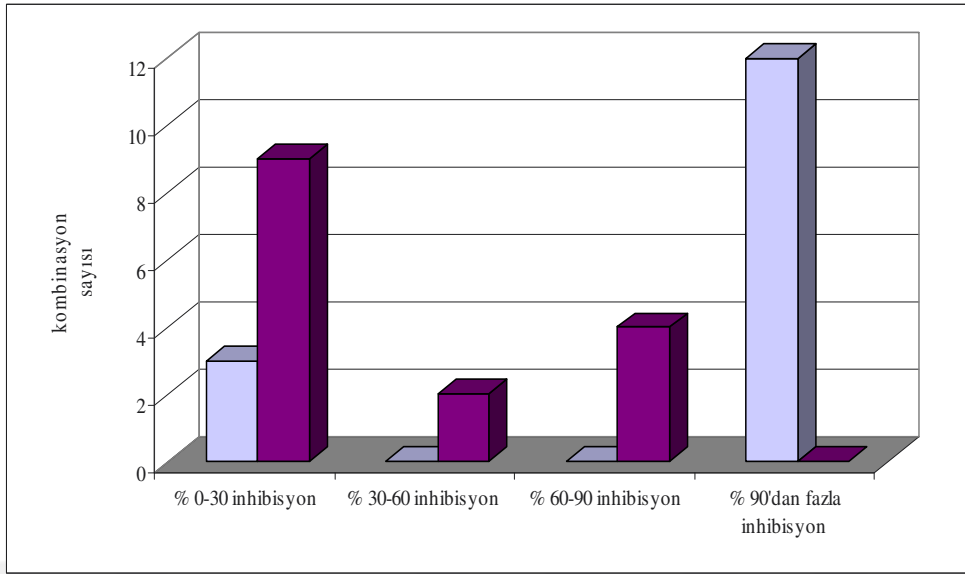
MRKNS izolatlarında da planktonik hücrelerde ikili kombinasyonlara suşların %47-100'ü duyarlı bulunmuştur. Yine bu suşlarla da biyofilm ortamında tüm duyarlılıklarda azalma görülmüştür ($p<0.01$). Gerek planktonik hücrelere gerekse sesil hücrelere en etkin kombinasyonun vankomisin+rifampisin kombinasyonu olduğu izlenmiştir.

Grafik 4.3'te görüldüğü gibi kombinasyonlar suşların %0-30, %30-60, % 60-90 ve % 90 ve üzerini inhibe edenler olarak gruplandırıldığında, MRSA izolatlarının planktonik hücrelerde %90'dan fazlasını inhibe eden 12 kombinasyon var iken, biyofilmde hiçbir kombinasyon bu etkinliği gösterememiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($p<0.001$). Buna karşın biyofilmde ikili kombinasyonların çoğu suşların %0-30'unu inhibe etmiştir.

MRKNS izolatlarında da planktonik hücrelerinde, suşların %90'ından fazlasını inhibe eden kombinasyon sayısı biyofilmden fazladır ($p<0.01$) (grafik 4.4). Ancak bunlarda MRSA'lardan farklı olarak biyofilm ortamında suşların %30-90'ını inhibe eden kombinasyon sayıları daha yüksek bulunmuştur.

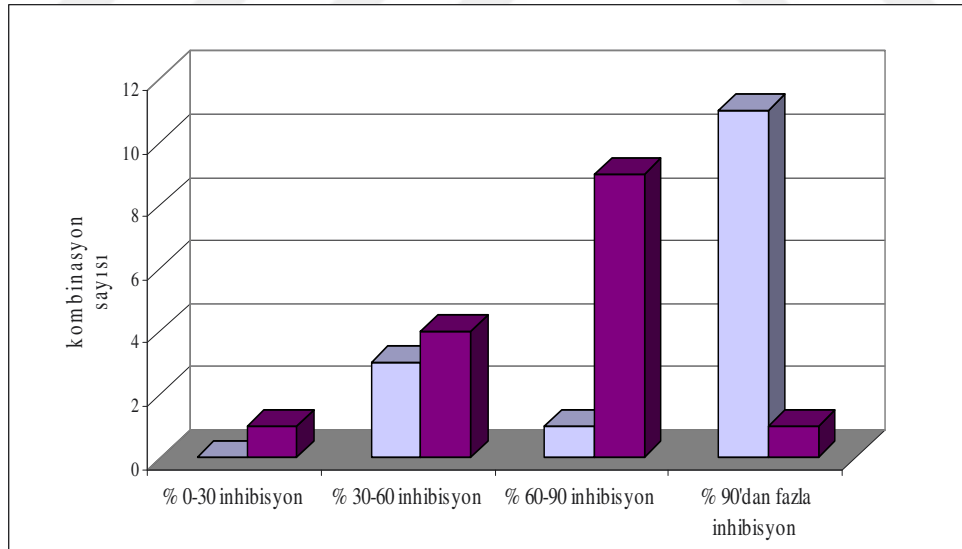
Tablo 4.5. ÇKBT ile İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri

İkili Kombinasyonlar	MRSA		MRKNS	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
LV	15 (100)	11 (73)	15 (100)	11 (73)
LG	14 (93)	2 (13)	15 (100)	10 (67)
LC	15 (100)	3 (20)	14 (93)	11 (73)
LT	15 (100)	2 (13)	15 (100)	10 (67)
LR	15 (100)	2 (13)	15 (100)	8 (53)
VG	15 (100)	9 (60)	13 (87)	11 (73)
VC	14 (93)	12 (80)	15 (100)	13 (87)
VT	15 (100)	7 (47)	15 (100)	13 (87)
VR	15 (100)	13 (87)	15 (100)	14 (93)
GC	2 (13)	0	7 (47)	5 (33)
GT	14 (93)	5 (33)	14 (93)	12 (80)
GR	2 (13)	1 (7)	8 (53)	7 (47)
CT	14 (93)	0	14 (93)	3 (20)
CR	0	0	8 (53)	5 (33)
TR	15 (100)	2 (13)	15 (100)	9 (60)



Grafik 4.3. MRSA İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:  Biyofilm: 



Grafik 4.4. MRKNS İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:  Biyofilm: 

Tablo 4.6’da MRSA ve MRKNS izolatlarının meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili kombinasyonlara duyarlı olan izolat sayıları ve yüzdeleri verilmiştir. Buna göre MRSA izolatlarında bu antibiyotiklerin linezolid, tigesiklin ve vankomisin içeren kombinasyonlarına yüksek oranda duyarlılık gözlenmiştir. Biyofilm ortamında ise vankomisin içeren kombinasyonların etkinliği yüksek bulunmuştur.

MRKNS izolatlarında ise linezolid, vankomisin ve tigesiklin içeren kombinasyonların planktonik ve biyofilm ortamında yüksek etkinlikte olduğu gösterilmiştir. Yine bu antibiyotiklerden meropenemin sefazolin ve seftazidim ile kombinasyonları hem planktonik hem biyofilimde MRSA izolatlarından farklı olarak daha yüksek etkinlikte saptanmıştır. İlginç olarak vankomisin+sefazolin, vankomisin+seftazidim, meropenem+tigesiklin ve tigesiklin+sefazolin kombinasyonları hem planktonik hem de biyofilimde MRKNS suşlarının %90’ından fazlasını inhibe etmiştir.

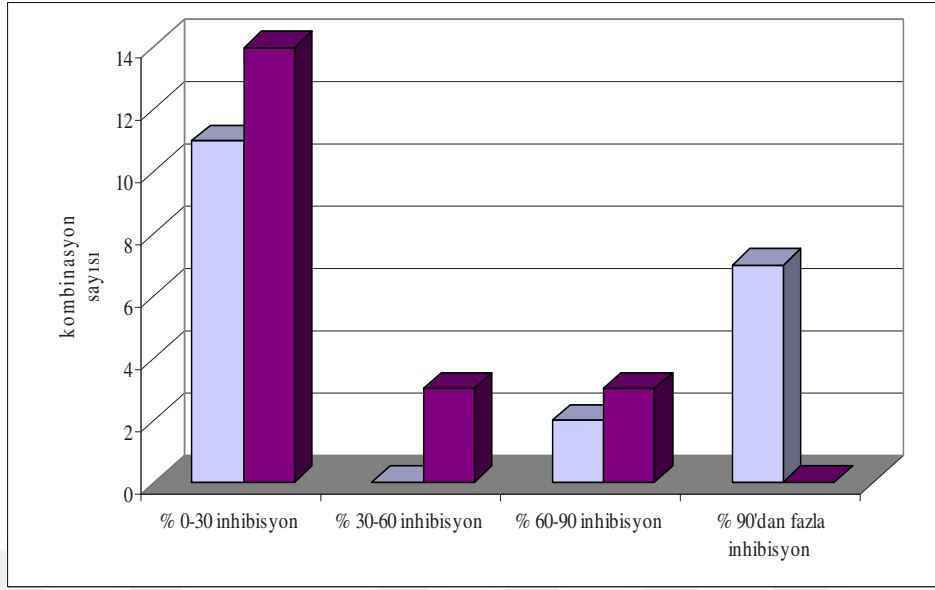
MRKNS izolatlarında ise grafik 4.6’da görüldüğü gibi suşların %90’ından fazlasını inhibe eden 7 kombinasyon (LS1,LS2,VM,VS1,VS2,MT,TS1) görülmekte olup, biyofilm ortamında da 4 kombinasyon (VS1,VS2,MT,TS1) bu etkinliğe ulaşabilmiştir.

Grafik 4.5’te MRSA izolatlarının meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili kombinasyonlara duyarlılıkları gösterilmiştir. MRSA izolatlarında ikili kombinasyonlarda izolatların % 90’ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p<0.001$) bulunmuştur.

Grafik 4.6’da MRKNS izolatlarının meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili kombinasyonlara duyarlılıkları gösterilmiştir. MRKNS izolatlarında ikili kombinasyonlarda izolatların % 90’ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.6. ÇKBT ile Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri

İkili Kombinasyonlar	MRSA		MRKNS	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
LM	15 (100)	3 (20)	13 (87)	13 (87)
LS1	15 (100)	5 (33)	15 (100)	13 (87)
LS2	15 (100)	5 (33)	15 (100)	11 (73)
RS2	0	0	8 (53)	6 (40)
RS1	0	0	9 (60)	7 (47)
VM	14 (93)	12 (80)	14 (93)	11 (73)
VS1	12 (80)	10 (67)	15 (100)	15 (100)
VS2	13 (87)	10 (67)	15 (100)	14 (93)
MG	2 (13)	1 (7)	10 (67)	11 (73)
MC	0	0	11 (73)	9 (60)
MT	14 (93)	7 (47)	15 (100)	15 (100)
MR	0	0	13 (87)	9 (60)
MS1	0	0	13 (87)	9 (60)
MS2	0	0	10 (67)	6 (40)
GS1	2 (13)	0	10 (67)	8 (53)
GS2	2 (13)	0	6 (40)	5 (33)
CS1	0	0	10 (67)	8 (53)
CS2	0	0	5 (33)	4 (27)
TS1	15 (100)	2 (13)	15 (100)	14 (93)
TS2	15 (100)	1 (7)	13 (87)	12 (80)

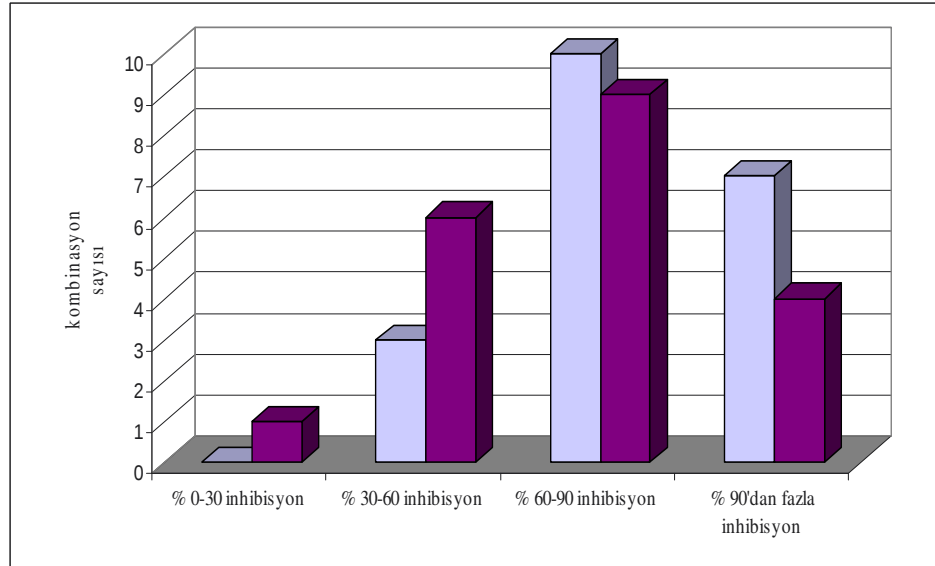


Grafik 4.5. MRSA İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren İkili Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:



Biyofilm:



Grafik 4.6. MRKNS İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren İkili Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:



Biyofilm:



Tablo 4.7’de üçlü antibiyotik kombinasyonlarının MRSA ve MRKNS’de etkinliği sunulmuştur. Üçlü kombinasyonlarda MRSA izolatlarında gentamisin+siprofloksasin+rifampisin kombinasyonunun bu antimikrobiallerin ikili kombinasyonlarında gözlemlendiği şekilde planktonik ve biyofilmde etkinlikleri düşük bulunmuştur. Diğer tüm kombinasyonların etkinliği planktonikte %73’ün üzerinde bulunmuştur. Ancak biyofilmde vankomisin hariç tüm kombinasyonların etkinliğinde düşüş gözlenmiş, vankomisin+siprofloksasin+rifampisin kombinasyonunda ise biyofilm ortamında planktonik hücrelere göre anlamlı olduğu düşünülmeyen hafif bir artış izlenmiştir.

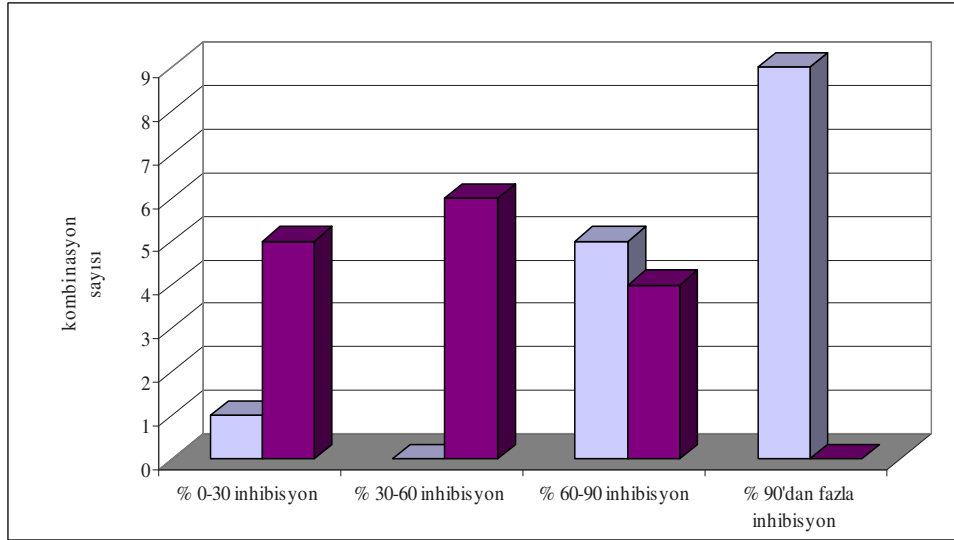
Üçlü kombinasyonların MRKNS izolatlarına etkinliği incelendiğinde planktonik ile biyofilm hücreleri üzerinde belirgin bir aktivite azalması görülmemiştir. Vankomisin+gentamisin+siprofloksasin, vankomisin+siprofloksasin+tigesiklin ve vankomisin+siprofloksasin+rifampisin kombinasyonlarında biyofilm hücrelerine etkinlikte anlamlı olmayan hafif bir artış gözlenmiştir.

Üçlü kombinasyonların MRSA üzerindeki etkinliği grafik 4.7’de sunulmuştur. MRSA izolatlarında üçlü kombinasyonlarda izolatların % 90’ından fazlasını inhibe etme yönünden, planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasındaki fark istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). MRSA izolatlarında hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinin %90’ından fazlasını inhibe eden ikili kombinasyonlar ile üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Grafik 4.8’de görüldüğü gibi üçlü kombinasyonların MRKNS izolatları üzerindeki etkinliğine bakıldığında hem planktonik hem de biyofilmde suşların %60-90’ını inhibe eden oran yüksek bulunmuştur. Üçlü kombinasyonlarda izolatların % 90’ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p>0.01$) bulunmamıştır. MRKNS izolatlarında planktonik hücrelerin %90’ından fazlasını inhibe eden ikili kombinasyonlar ile üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel yönden üçlü kombinasyonlar lehine anlamlı fark ($p<0.01$) bulunmuştur. Ancak biyofilm hücrelerinde aynı analiz yapıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

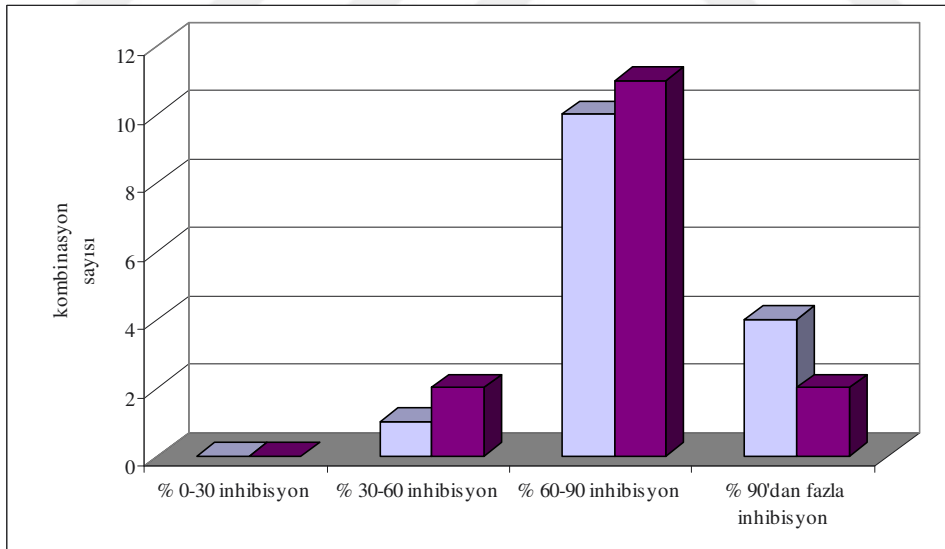
Tablo 4.7. ÇKBT ile Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri

Üçlü Kombinasyonlar	MRSA		MRKNS	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
LGC	13 (87)	6 (40)	11 (73)	11 (73)
LGT	14 (93)	4 (27)	13 (87)	9 (60)
LGR	15 (100)	1 (7)	13 (87)	8 (53)
LCT	15 (100)	5 (33)	10 (67)	9 (60)
LCR	11 (73)	5 (33)	11 (73)	9 (60)
LTR	15 (100)	6 (40)	14 (93)	11 (73)
VGC	14 (93)	12 (80)	10 (67)	13 (87)
VGT	14 (93)	8 (53)	12 (80)	12 (80)
VGR	12 (80)	11 (73)	14 (93)	12 (80)
VCT	15 (100)	10 (67)	12 (80)	14 (93)
VCR	11 (73)	12 (80)	10 (67)	14 (93)
VTR	14 (93)	8 (53)	14 (93)	13 (87)
GCT	14 (93)	3 (20)	13 (87)	12 (80)
GCR	3 (20)	0	8 (53)	7 (47)
CTR	12 (80)	3 (20)	15 (100)	10 (67)



Grafik 4.7. MRSA İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:  Biyofilm: 



Grafik 4.8. MRKNS İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:  Biyofilm: 

Tablo 4.8’de meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren kombinasyonların değerlendirilmesinde MRSA izolatlarında bu antimikrobiyaller vankomisin ve linezolid ile kombine edildiğinde etkinlikleri planktonik formda iyi bulunmuş, ancak biyofilm ortamında yine etkinlik azalması olmuştur. Sadece vankomisin+rifampisin+seftazidim kombinasyonunda biyofilm ortamında etkinlikte belirgin olmayan hafif artış görülmüştür. Meropenem, gentamisin, sefazolin ve seftazidimin ikili kombinasyonlardaki belirgin azalmış aktivitesi bunların kendi aralarındaki üçlü kombinasyonlarında da gözlenmiştir.

MRKNS izolatlarında üçlü kombinasyonlar genel olarak hem planktonik hem biyofilmde MRSA izolatlarından daha etkin bulunmuştur.

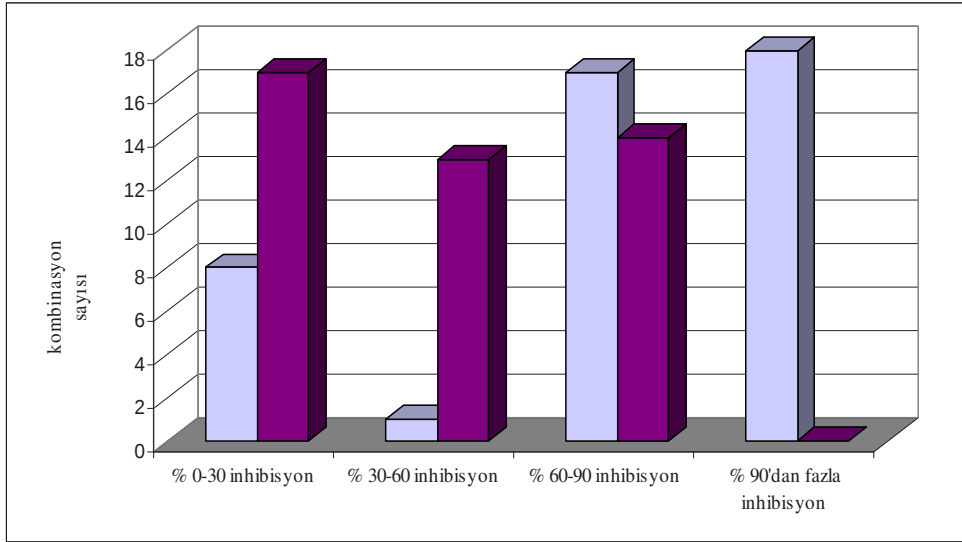
Grafik 4.9’da gösterildiği gibi, MRSA izolatlarında meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren üçlü kombinasyonlarda izolatların %90’ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p<0.001$) bulunmuştur. MRSA izolatlarında hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde izolatların %90’ından fazlasını inhibe eden meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili ve üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

MRKNS izolatlarında, üçlü kombinasyonlarda (meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren) izolatların % 90’ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır (grafik 4.10).

MRKNS izolatlarında hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde izolatların %90’ından fazlasını inhibe eden meropenem, sefazolin ve seftazidim içeren ikili ve üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.8. ÇKBT ile Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan MRSA ve MRKNS İzolat Sayısı ve Yüzdeleri

Üçlü Kombinasyonlar	MRSA		MRKNS	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
TRS1	0	4 (27)	10 (67)	12 (80)
TRS2	15 (100)	0	15 (100)	9 (60)
RS1S2	0	0	11 (73)	7 (47)
LVS1	14 (93)	10 (67)	11 (73)	14 (93)
LVS2	13 (87)	11 (73)	10 (67)	12 (80)
LMG	13 (87)	5 (33)	11 (73)	13 (87)
LMC	12 (80)	5 (33)	9 (60)	15 (100)
LMT	15 (100)	6 (40)	11 (73)	14 (93)
LMR	14 (93)	5 (33)	14 (93)	12 (80)
LMS1	11 (73)	7 (47)	13 (87)	14 (93)
LMS2	13 (87)	7 (47)	11 (73)	13 (87)
LGS1	13 (87)	4 (27)	12 (80)	13 (87)
LGS2	14 (93)	4 (27)	9 (60)	11 (73)
LCS1	13 (87)	6 (40)	14 (93)	14 (93)
LCS2	11 (73)	6 (40)	12 (80)	11 (73)
LTS1	15 (100)	8 (53)	15 (100)	14 (93)
LTS2	14 (93)	6 (40)	14 (93)	12 (80)
LRS1	14 (93)	6 (40)	12 (80)	10 (67)
LRS2	14 (93)	3 (20)	14 (93)	13 (87)
LS1S2	14 (93)	1 (7)	15 (100)	13 (87)
VMG	12 (80)	9 (60)	12 (80)	14 (93)
VMC	9 (60)	11 (73)	11 (73)	15 (100)
VMT	13 (87)	10 (67)	13 (87)	15 (100)
VMR	11 (73)	9 (60)	13 (87)	14 (93)
VMS1	15 (100)	6 (40)	14 (93)	13 (87)
VMS2	10 (67)	12 (80)	13 (87)	13 (87)
VGS1	15 (100)	11 (73)	14 (93)	13 (87)
VGS2	12 (80)	9 (60)	11 (73)	13 (87)
VCS1	14 (93)	10 (67)	14 (93)	15 (100)
VCS2	10 (67)	11 (73)	12 (80)	15 (100)
VTs1	15 (100)	4 (27)	14 (93)	13 (87)
VTs2	14 (93)	11 (73)	13 (87)	12 (80)
VRS1	15 (100)	11 (73)	14 (93)	13 (87)
VRS2	8 (53)	10 (67)	14 (93)	14 (93)
VS1S2	14 (93)	0	12 (80)	8 (53)
MGC	2 (13)	0	9 (60)	13 (87)
MGT	14 (93)	1 (7)	15 (100)	14 (93)
MGR	2 (13)	0	10 (67)	7 (47)
MGS1	2 (13)	0	14 (93)	12 (80)
MGS2	2 (13)	0	8 (53)	7 (47)
GCS1	2 (13)	0	10 (67)	12 (80)
GCS2	2 (13)	0	6 (40)	6 (40)
CTS1	11 (73)	7 (47)	13 (87)	14 (93)
CTS2	10 (67)	4 (27)	8 (53)	11 (73)

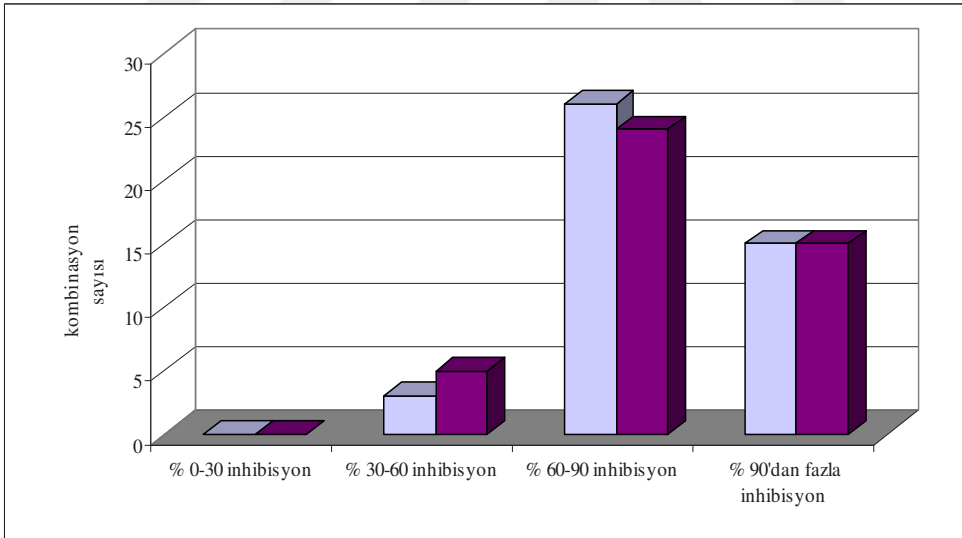


Grafik 4.9. MRSA İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliği

Planktonik:



Biyofilm:



Grafik 4.10. MRKNS İzolatlarında Meropenem, Sefazolin ve Seftazidim İçeren Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarının Etkinliği

Planktonik:



Biyofilm:

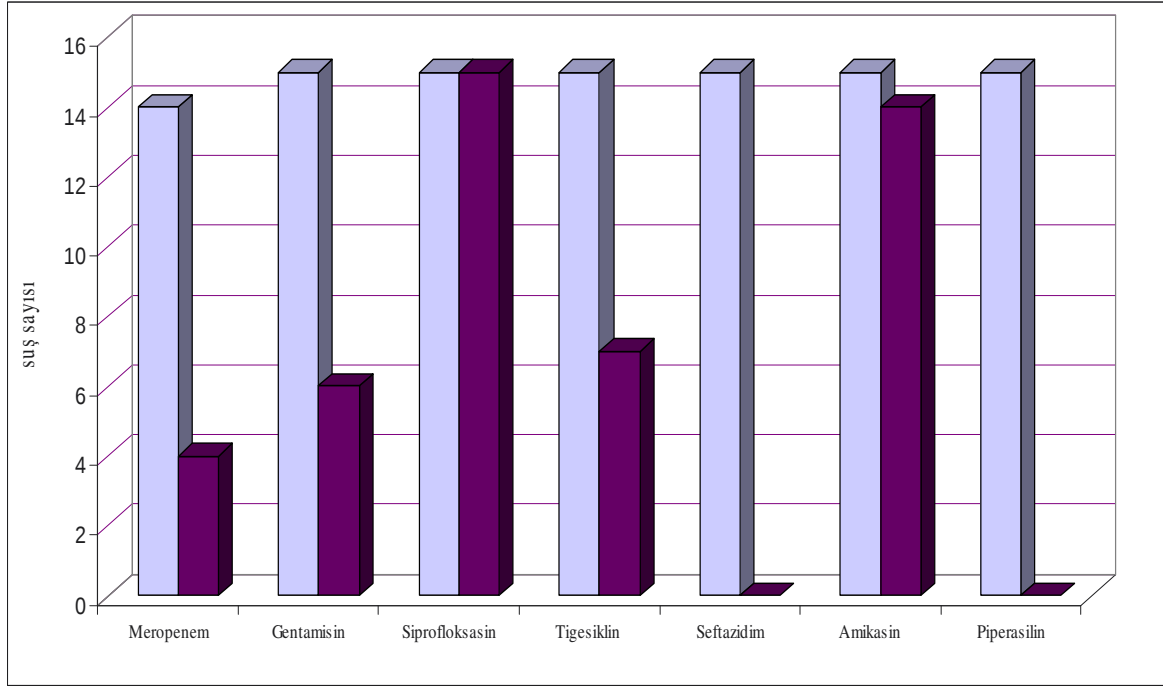


4.2. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Grafik 4.11’de ve açıklamalı tablosunda gösterildiği gibi planktonik hücrelerinin tamamı meropenem dışındaki antibiyotiklere %100 duyarlı bulunmuş, meropeneme %93.3 duyarlılık gözlenmiştir.

Biyofilmdeki sesil hücrelerde ise siprofloksasin’e yine %100 oranında duyarlılık saptanırken, amikasinde %93.3 duyarlılık gözlenmiş, tigesiklin dahil diğer antimikrobiyallerde ise sesil hücrelerin duyarlılığının belirgin olarak azaldığı ($p<0.01$) hatta seftazidim ve piperasilinde suşların tamamının dirençli olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.9’da sunulan sonuçlara arasında MBK değerlerine baktığımızda siprofloksasin’de biyofilm ortamında MİK değerlerinde artma olmasına rağmen 5 suşun MBK değerlerinde azalma gözlenmiştir. Diğer antimikrobiyallerde biyofilm ortamında suşların MİK ve MBK değerlerinde artış olmuştur.



Grafik 4.11. *P. aeruginosa* İzolatlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Planktonik: 

Biyofilm: 

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	
	P (%)	B (%)
Meropenem	14 (93.3)	4 (13.3)
Gentamisin	15 (100)	6 (40)
Siprofloksasin	15 (100)	15 (100)
Tigesiklin	15 (100)	7 (46.6)
Seftazidim	15 (100)	0
Amikasin	15 (100)	14 (93.3)
Piperasilin	15 (100)	0

Tablo 4.9. *P.aeruginosa* İzolatlarında Planktonik ve Biyofilimde Antibiyotiklerin Minimal İnhibitör ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (mg/L)

SUŞ NO	MEROPENEM				GENTAMİSİN				SİPROFLOKSASİN				TİGESİKLİN				SEFTAZİDİM				AMİKASİN				PİPERASİLİN			
	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK	P MİK	P MBK	B MİK	B MBK
1	0.5	32	64	64	0.5	>64	32	64	0.06	>32	0.25	1	4	>32	8	128	4	256	1024	>1024	4	512	16	512	16	>1024	2048	>2048
2	0.125	>64	16	64	0.5	>64	16	32	0.25	1	0.25	2	4	>32	8	128	2	256	1024	>1024	2	512	32	512	8	>1024	2048	>2048
3	0.125	4	16	>64	0.5	16	8	32	0.125	2	0.5	4	4	>32	8	128	4	>256	1024	>1024	4	>512	32	256	16	>1024	>2048	>2048
4	0.125	32	16	>64	0.25	64	8	32	0.125	2	0.5	2	4	>32	8	128	8	>256	1024	>1024	4	>512	32	128	16	>1024	>2048	>2048
5	0.25	8	4	>64	0.5	8	16	64	0.25	4	0.5	2	4	>32	16	256	4	256	1024	>1024	4	512	32	128	16	>1024	>2048	>2048
6	0.125	32	16	64	0.25	>64	16	32	0.06	32	0.25	2	4	>32	8	128	4	256	1024	>1024	4	512	32	256	8	>1024	256	>2048
7	0.25	64	8	>64	0.5	>64	16	32	0.125	1	0.25	4	4	>32	8	128	4	256	1024	>1024	2	256	16	256	8	>1024	>2048	>2048
8	0.125	>64	4	64	0.5	16	16	64	0.06	0.5	0.25	2	4	>32	8	256	8	256	1024	>1024	2	16	16	256	32	1024	>2048	>2048
9	1	32	16	>64	0.5	32	16	256	0.25	0.25	0.25	2	4	>32	16	256	4	128	>1024	>1024	4	512	64	512	16	1024	2048	>2048
10	1	8	16	>64	0.5	>64	16	32	0.125	2	0.25	2	4	>32	16	128	2	256	>1024	>1024	4	256	32	256	8	512	>2048	>2048
11	16	32	16	>64	1	>64	16	64	2	>32	0.5	4	4	>32	16	128	4	>256	>1024	>1024	4	512	8	128	8	512	2048	>2048
12	1	>64	16	64	0.25	64	4	32	0.125	8	0.25	2	4	>32	16	128	4	256	1024	>1024	4	256	32	256	16	512	>2048	>2048
13	0.125	32	16	>64	0.25	32	8	32	0.06	0.25	0.5	2	2	>32	16	128	2	>256	>1024	>1024	2	256	16	256	8	1024	>2048	>2048
14	0.5	32	8	>64	0.5	8	8	64	0.125	1	0.25	4	4	>32	32	128	2	256	>1024	>1024	2	>512	16	256	8	512	>2048	>2048
15	1	>64	16	>64	0.5	64	8	32	0.125	2	0.5	1	4	>32	16	64	2	256	1024	>1024	2	512	16	512	16	512	>2048	>2048
Duyarlılık %	93.3	13.3			100	40			100	100			100	46.6			100	0			100	93.3			100	0		

P: Planktonik

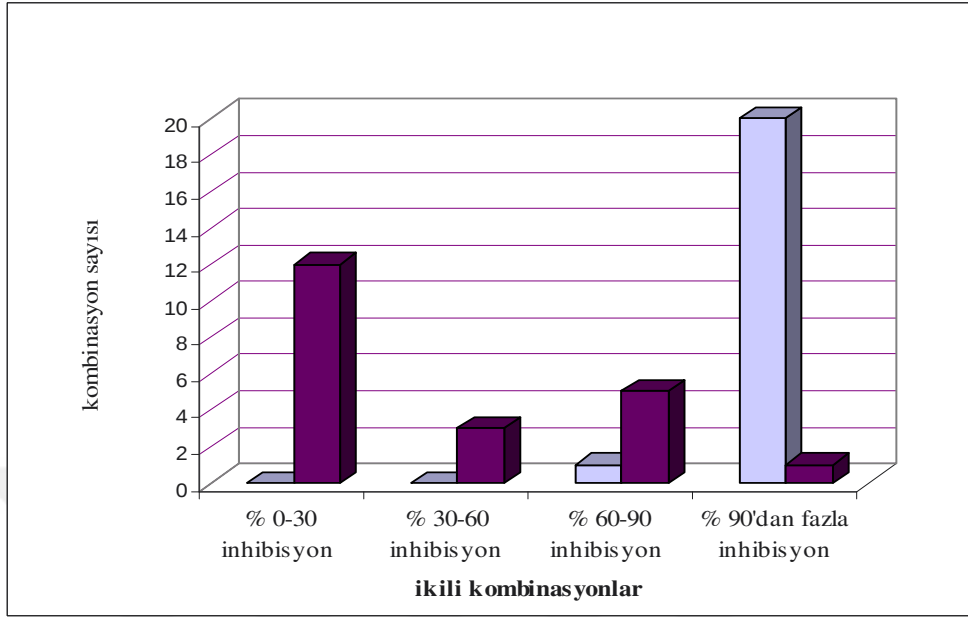
B: Biyofilm

P. aeruginosa planktonik hücrelerinde ikili kombinasyonların çok güçlü aktivitesi gözlenmiştir (tablo 4.10). Biyofilmde ise tekli antibiyotiklerde izlendiği gibi aktivite belirgin olarak düşmüştür. Siprofloksasin +seftazidim kombinasyonunda ise hem planktonik hem biyofilm formunda suşların tamamı inhibe olmuştur. Gentamisin+siprofloksasin, gentamisin+tigesiklin, piperasilin+tigesiklin, seftazidim+amikasin kombinasyonları ise planktonik ortamda %100 etkin iken biyofilm ortamında etkinlik % 0'a inmiştir.

İkili kombinasyonlarda izolatların % 90'ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p<0.001$) bulunmuştur (grafik 4.12).

Tablo 4.10. ÇKBT ile İkili Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan *P.aeruginosa* İzolat Sayısı ve Yüzdeleri

İkili Kombinasyonlar	<i>P.aeruginosa</i>	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
GC	15 (100)	0
GM	15 (100)	9 (60)
GP	15 (100)	1 (7)
GS2	15 (100)	1 (7)
GA	15 (100)	1 (7)
GT	15 (100)	0
CM	15 (100)	11 (73)
CP	15 (100)	1 (7)
CS2	15 (100)	15 (100)
CA	14 (93)	1 (7)
CT	15 (100)	1 (7)
MP	15 (100)	7 (47)
MS2	15 (100)	7 (47)
MA	15 (100)	13 (87)
MT	15 (100)	11 (73)
PS2	9 (60)	0
PA	15 (100)	2 (13)
PT	15 (100)	0
S2A	15 (100)	10 (67)
S2T	15 (100)	0
AT	15 (100)	8 (53)



Grafik 4.12. *P.aeruginosa* İzolatlarında İkili Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik:  Biyofilm: 

Üçlü kombinasyonlarda da ikililerde olduğu gibi %87'nin üzerinde etkinlik saptanırken biyofilmde bu etkinlik belirgin azalmıştır (tablo 4.11). Biyofilmde ilginç olarak meropenemin tek başına aktivitesi pseudomonaslarda çok düşük (%13) olmasına rağmen, meropenem içeren üçlü kombinasyonlarda %80'in üzerinde duyarlılık tespit edilmiştir.

Gentamisin ve siprofloksasinin diğer antibiyotiklerle üçlü kombinasyonlarında etkinlik biyofilmde çok düşük olduğu halde gentamisin+siprofloksasin+meropenem kombine edildiğinde duyarlılık %80'lere ulaşmıştır.

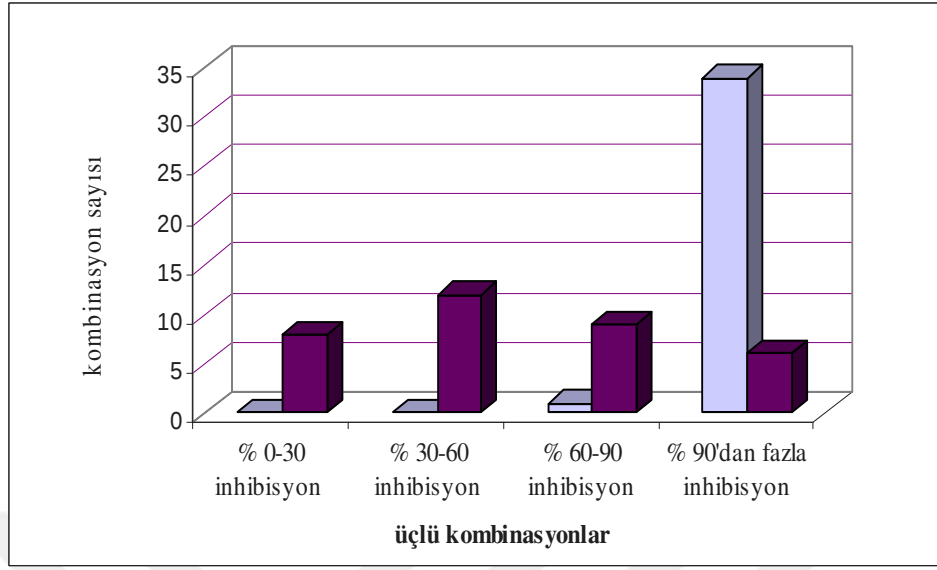
Siprofloksasinin tek başına biyofilm ortamında %100 etkinliğine rağmen, ikili kombinasyonlarda ve meropenemsiz üçlü kombinasyonlarda etkinliği belirgin olarak düşmüştür.

Grafik 4.13'te sunulduğu şekilde üçlü kombinasyonlarda izolatların % 90'ından fazlasını inhibe etme yönünden planktonik ile biyofilm hücrelerine etkinlik arasında istatistiksel yönden anlamlı fark ($p<0.001$) bulunmuştur.

P.aeruginosa izolatlarında hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinde izolatların %90'ından fazlasını inhibe eden ikili ve üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4.11. ÇKBT ile Üçlü Antibiyotik Kombinasyonlarına Duyarlı Olan *P.aeruginosa* İzolat Sayısı

Üçlü Kombinasyonlar	<i>P.aeruginosa</i>	
	Planktonik s (%)	Biyofilm s (%)
GCM	15 (100)	12 (80)
GCP	15 (100)	2 (13)
GCS2	15 (100)	1 (7)
GCA	15 (100)	2 (13)
GCT	15 (100)	1 (7)
GMP	15 (100)	5 (33)
GMS2	15 (100)	8 (53)
GMA	15 (100)	14 (93)
GMT	15 (100)	14 (93)
GPS2	15 (100)	5 (33)
GPA	15 (100)	8 (53)
GPT	15 (100)	6 (40)
GS2A	15 (100)	8 (53)
GS2T	15 (100)	7 (47)
GAT	15 (100)	4 (27)
CMP	15 (100)	11 (73)
CMS2	15 (100)	11 (73)
CMA	15 (100)	13 (87)
CMT	15 (100)	14 (93)
CPS2	15 (100)	2 (13)
CPA	15 (100)	9 (60)
CPT	15 (100)	7 (47)
CS2A	15 (100)	8 (53)
CS2T	15 (100)	6 (40)
CAT	15 (100)	1 (7)
MPS2	15 (100)	12 (80)
MPA	15 (100)	12 (80)
MPT	15 (100)	14 (93)
MS2A	15 (100)	14 (93)
MS2T	14 (93)	14 (93)
MAT	15 (100)	12 (80)
PS2A	13 (87)	7 (47)
PS2T	15 (100)	1 (7)
PAT	15 (100)	9 (60)
S2AT	15 (100)	8 (53)



Grafik 4.13 . *P.aeruginosa* İzolatlarında Üçlü Kombinasyonların Etkinliği

Planktonik: 

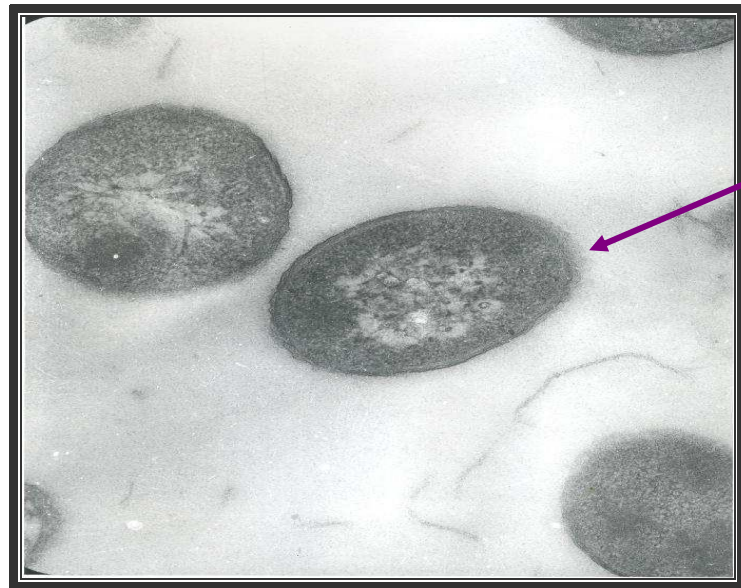
Biyofilm: 

4.3. Elektron Mikroskopi ile Biyofilm Oluşumunun Gözlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturulduktan sonra LEO 906E transmisyon elektron mikroskobu ile çekilen fotoğraflarında hücre duvarını çevreleyen biyofilm matriksinin elektron mikroskopik görünümü aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



Şekil 4.1. *P.aeruginosa* İzolatında İntakt Hücre Duvarı Dışında Biyofilm Tabakasının Yüzeyi Kaplayan Görünümü (Transmisyon Elektron Mikroskopi ile x60.000 büyütülmüş görünüm)



Şekil 4.2. Biyofilm Yapısı İçinde Farklı Yaşlarda *P.aeruginosa* Hücrelerinin Etrafını Çevreleyen Ekzopolisakkarit Yapı (Biyofilm Matriks, x46600 büyütme ile)

5. TARTIŞMA

Tıp dünyasında sağlanan gelişmeler sonucu, bir taraftan insanoğlunun yaşam kalitesi ve süresi artıyorken, diğer taraftan tanı ve tedavi amacıyla uygulanan girişimler, yoğun antibiyotik kullanımı gibi faktörlerin faturası karşımıza “hastane enfeksiyonları” ve “antibiyotiklere dirençli bakteriler” olarak çıkmaktadır.

İnsanoğlunun penisilinin keşfiyle başlattığı savaşta, bakteriler de enzimleri, pompa sistemleri ve hücre geçirgenliklerinde yaptıkları değişikliklere son zamanlarda biyofilm oluşturma özelliklerini de ekleyerek saflarını korumaya devam etmektedirler. Özellikle biyofilm geliştiren bakterilerin başını *S.aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar ve *P.aeruginosa* gibi hastane ortamlarında sıkça bulunan, dezenfektanlara da hayli dirençli olabilen suşlar çekmektedir. Bu bakteriler kateter gibi yabancı cisimlerin yüzeyinde oluşturdukları slime faktör sayesinde kendilerini bu biyofilm matriksinin içine saklayarak hem immun sistemden hem de antimikrobiyal maddelerden korurlar.

Biyofilm bakterileri antibiyotiklerin etkilerine çeşitli yollarla direnç gösterirler. Bu yolların başlıcaları antibiyotiğin biyofilm içine difüzyonunun kısıtlı olması, biyofilm içindeki bakterilerin farklı büyüme hızları ve mikroçevre değişikliklerinin antibiyotiklere olumsuz etkisidir. Pozitif yüklü antibiyotikler (aminoglikozidler gibi) negatif yüklü biyofilm polimerlerine bağlanarak penetrasyon aşamasında sorun yaşarlar.

Son yıllarda özellikle tedavi seçimlerinde yenilikler yapılmasına yönelik fikirler gündemdedir. Çünkü ideal tedavi stratejisi biyofilm matriksindeki ekstrasellüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterebilecek ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek antimikrobiyal ajanlar içermelidir (78).

Kateteri çekmeden uygulanabilecek tedaviler arasında antibiyotik kilit tedavisi gibi eskiden beri kullanılan yaklaşımların yanısıra, kateter yüzeyine yapışmayı önleyeceği düşünülen N-asetilsistein-gentamisin/tigesiklinin birlikte uygulanması gibi yaklaşımlar da gündemdedir. Bu yaklaşımlar antibiyofilm/antimikrobial kateter kilit solüsyonu uygulaması olarak adlandırılmaktadır. Anti-adeziv maddelerin ve dispersantların *S.epidermidis*'in biyofilm

oluşturma derecesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hücre kültüründe slime oluşumunda anlamlı azalma ($p<0.001$) görülmüştür. Bu sayede viskozitesi bozulan biyofilm matrisine eşzamanlı uygulanan antibiyotiklerin daha kolay penetre olması sağlanmaktadır (79). Dispersant olarak adlandırılan maddeler EDTA, EGTA, N-asetil sistein, sodyum sitrat ve sodyum klorid'dir. Anti-adezivler ise hyaluronan, heparin ve karbopol'dür. Tigesiklin ile N-asetilsistein kombinasyonunun katetere uygulanmasını takiben 12 saat içinde kateterden $\log_{10}$ 4-5 düzeyinde canlı hücre ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç da vankomisin ve linezolid ile kıyaslandığında zaten daha düşük MİK değerlerinde etkin olan tigesiklinin NAC kombinasyonunda sinerjizm gösterdiğini de ortaya koymuştur (80). Yüzey siyalik asiti uzaklaştırmak amacıyla nöraminidaz kullanılan çalışmada, nöraminidazın KNS suşlarında slime oluşumunu azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (53).

Günümüzde kateter enfeksiyonlarının tedavisindeki yaklaşımlar genelde kateteri çekmeden ikili kombinasyonların uygulanması şeklindedir. Özellikle gram pozitifler etken ise daptomisin, vankomisin içeren kombinasyonlar daha başarılı bulunmuş iken, etken gram negatifler ise meropenem ve siprofloksasin içeren kombinasyonlar önerilmektedir (73, 81).

Biyofilm oluşturma yeteneği virulansı etkileyen önemli bir faktör olmaya başlamıştır. Nitekim bu alanda yapılan pek çok çalışma vardır ve özellikle antibiyotik duyarlılıklarındaki değişiklikler hakkında son zamanlarda elde edilen veriler kaygı vericidir. Kotilainen ve arkadaşları (82) koagülaz negatif stafilokokların etken olduğu 60 sepsis hastasından elde edilen kan kültürü izolatlarında slime pozitifliği ile antibiyotik dirençlerini incelemişlerdir. Çalışmada 10 antibiyotik kullanılmış ve slime-pozitif *S. epidermidis* suşlarında MİK₅₀ ve/veya MİK₉₀ değerlerinin slime-negatif suşlara göre anlamlı oranda fazla olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada tobramisin, gentamisin ve rifampisin için slime üretimine bağlı olarak antibiyotik direncinde istatistiksel anlamlı artış görülmüştür. Bizim çalışmamızda da koagülaz negatif stafilokokların yanı sıra MRSA ve *P. aeruginosa* suşlarında da biyofilmde azalan antibiyotik duyarlılıkları gözlenmiştir.

Souli ve arkadaşları (83) slime-pozitif KNS suşlarında 22 antimikrobiyal ajanın etkinliğini inceledikleri çalışmada, rifampisin dışında tüm ajanların biyofilm ortamında etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptamışlardır. Etkinliği en çok azalan ajanlar ve etkinlik azalma oranları sırasıyla; vankomisin (%63), teikoplanin (%52) ve pefloksasin (%30) olarak

bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre metisilin dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde her ne kadar vankomisin önerilen ilaç olsa da, kateter ilişkili enfeksiyonlarda iyi bir tercih gibi görünmediğini ifade etmektedirler. Ancak bizim sonuçlarımıza göre vankomisin biyofilm ortamında da stafilokoklarda yüksek etkinlikte bulunmuştur. Saginur ve arkadaşları (84) ise yine vankomisine duyarlılıkta biyofilm ortamında belirgin azalma olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise gentamisin, linezolid ve tigesiklinin biyofilm ortamında duyarlılığında belirgin azalma görülmüş, rifampisin Souli ve arkadaşları (83) ile uyumlu olarak biyofilmde de eşit etkinlikte bulunmuştur. Souli ve arkadaşlarının çalışmasında siprofloksasinin biyofilmdeki etkinliğinde %9.5 azalma görülmüştür. Çalışmamızda ise siprofloksasinin planktonik hücreler üzerinde iyi bir etkinliği olmamasına rağmen biyofilm ortamında etkinliğinde azalma olmadığı tespit edilmiştir.

Stafilokokların oluşturduğu biyofilmlerde antibiyotik kombinasyonlarını inceleyen çalışmalar arasında Saginur ve arkadaşlarının (84) 2006'da yaptığı araştırmada araştırmacılar ÇKBT yöntemini kullanarak MSSA, MRSA ve KNS'larda biyofilmde direnç artışını araştırmışlardır. Çalışmalarında tüm antibiyotiklerde biyofilmde direnç artışı saptamışlardır. Sonuçlarına göre ikili-üçlü kombinasyonlarda en etkili olanlar vankomisin ve rifampisinin birlikte olduğu kombinasyonlardır. Planktonik hücreler tüm kombinasyonların %80'inden fazlasına duyarlı iken biyofilmde kombinasyonların ancak %42-47'sine duyarlılık bulunmuştur ($p<0.001$). Koagülaz negatif stafilokoklarda rifampisin+siprofloksasin+fusidik asit, rifampisin+vankomisin+gentamisin, rifampisin+vankomisin+siprofloksasin biyofilmde de planktonikte olduğu gibi %100 duyarlı çıkmıştır. Araştırmacılara göre rifampisin, vankomisin ve fusidik asit antibiyotik kombinasyonları tedavi seçeneklerinde en çok önerilebilecek olanlardır. Bizim çalışmamızda ise vankomisinli kombinasyonlar biyofilmde iyi etkinlik göstermişler ancak rifampisinli kombinasyonlarda genellikle belirgin aktivite azalması görülmüştür. Ancak MRKNS izolatlarına karşı en başarılı olan suşların %93'ünü inhibe eden vankomisin+rifampisin kombinasyonu olmuştur. Çalışmamızda üçlü kombinasyonlar arasında en etkin olanlar vankomisin+siprofloksasin+rifampisin kombinasyonudur. MRKNS suşları için biyofilm ortamında Saginur'un bulgularını destekler şekilde bu kombinasyonun aktivitesi daha da artış göstermiştir. Saginur'un çalışmasından farklı olarak çalışmamızda ikili ve üçlü kombinasyonlarda planktonik hücreler ve biyofilm ortamında %90 inhibisyon açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Yine ikili ve üçlü kombinasyonların etkinliği benzer bulunmuştur. Rifampisinli ikili kombinasyonlarda etkinlik azalmasına rağmen, üçlülerde en iyi vankomisin+ siprofloksasin+rifampisin kombinasyonu olmasını vankomisin aktivitesinin

yüksekliğine veya olası sinerjik etkileşimine bağlayabiliriz. Tüm bu bulgular sonucunda MRKNS izolatlarında biyofilm oluşturan enfeksiyonların tedavisinde vankomisinli kombinasyonlar en uygun tercih olabilecek gibi görünmektedir.

MRSA izolatları ile yapılan çalışmalara göz atacak olursak; Molina ve arkadaşlarının (85) 2008’de yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, kistik fibrosisli hastalardan izole 93 MRSA suşunda klindamisin ve gentamisinin biyofilmdeki inhibe edici konsantrasyonları planktonikten daha düşük çıkması çalışmanın ilgi çekici bulgusu olmuştur. Genel olarak çalışılan tüm antibiyotiklerin (linezolid, eritromisin, azitromisin, daptomisin, levofloksasin, vankomisin) duyarlılıkları biyofilmde azalmıştır. Saginur ve arkadaşları da (84) MRSA izolatlarında çalıştıkları tüm antimikrobiyallerle biyofilm ortamında belirgin etkinlik azalması görmüşlerdir. MRSA izolatlarında biz de Molina ve arkadaşlarının (85) bulgularına benzer sonuçlar tespit etmiş bulunmaktayız. Vankomisin, tigesiklin ve linezolidin biyofilm ortamında etkinliğinin azaldığı hatta linezolidde %100’den % 6.6’lara düştüğü izlenmiştir. Ancak Molina’nın çalışmasını destekler biçimde, gentamisin etkinliğinin biyofilmde arttığı bulunmuştur. Gentamisinin bakterisidal konsantrasyonlarına baktığımızda da bu bulguyu destekleyecek şekilde biyofilm ortamında bakterisidal konsantrasyonlarda azalma tespit edilmiştir. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak antimikrobiyal profilde çalışılan tigesiklinin aktivitesi planktonik hücreler ve biyofilmde benzer bulunmuştur (%100-%86.6). Çalışmamızda tüm antibiyotiklere bakıldığında biyofilmde etkinliğin belirgin azaldığı, ayrıca antibiyotiklerin bakterisidal etkinliklerini incelediğimizde de bakterisidal aktivitelerde de belirgin azalma olduğu gözlenmiştir. KNS’lerden farklı olarak MRSA’larda rifampisin hem planktonik hem de biyofilm ortamında etkisiz bulunmuş, %100 direnç gözlenmiştir.

Smith ve arkadaşları (81) klindamisin, daptomisin, linezolid ve tigesiklinin biyofilm hücrelerinde etkinliğini araştırdıkları çalışmada time-kill ve XTT yöntemi ile bakterisidal aktivite ve ortamdaki canlı hücre sayısını incelemişlerdir. Çalışmalarında 1xMİK ve 4xMİK konsantrasyonlarında klindamisin, linezolid ve tigesiklinin bakteriyostatik, vankomisin ve daptomisinin ise bakterisidal etkisi olduğunu göstermişlerdir. Daptomisin biyofilm ortamındaki hücrelerin %96’sını öldürürken, vankomisin %81’ini öldürmüştür. Buna göre araştırmacılar linezolid ve tigesiklinin MRSA planktonik hücreleri üzerinde çok etkin olmasına rağmen biyofilm ortamında etkinliklerinin belirgin olarak azaldığını ve bu antibiyotiklerin kateterde biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde yeterli etkinlikte olamayacağını belirtmektedirler. Bizim çalışmamızda da vankomisinin biyofilmdeki güçlü etkinliği ve

linezolidten elde ettiğimiz biyofilmde aktivite azalması araştırmacıları desteklemektedir. Ancak tigesiklinin biyofilm ortamındaki inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonlarının belirgin azalmaması farklı bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır ve tigesiklinin kateter ilişkili enfeksiyonlarda kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Biyofilm oluşturan infektif endokardit etkeni olan MRSA suşları ile yapılan bir çalışmada ise LaPlante ve arkadaşları (86) daptomisin ile vankomisin tek başlarına ve rifampisin ve gentamisin ile kombinasyonlarına duyarlılığını araştırmışlardır. İnfektif endokarditte daptomisinin monoterapisinin, rifampisin ve gentamisin kombinasyonlarından ve vankomisin içeren protokollerden daha iyi olduğunu öne sürmüşlerdir . Daptomisin ile 24. saatte başlayan bakterisidal etkiye rağmen vankomisin ile 72. saatte bile bakterisidal etkinlik görülememiştir. Daptomisin, rifampisin ve gentamisin ile kombine edildiğinde bile bakterisidal etkide gecikme gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar infektif endokarditte daptomisin monoterapisinin rifampisin ve gentamisin kombinasyonlarından ve vankomisin içeren protokollerden daha iyi olduğunu öne sürmektedirler.

Kan kültürlerinden izole edilen MRSA klinik izolatlarının (düşük/yüksek biyofilm yapabilme dereceli) vankomisin tek başına rifampisin ve tigesiklin ile kombinasyonlarına karşı duyarlılıklarının araştırıldığı 2009 yılında yayınlanan çalışmada ise Rose ve Poppens (57), vankomisinin MIC_{50} ve MIC_{90} değerlerinde biyofilm ortamında 4-8 kat artışlar olduğunu görmüşlerdir. Rifampisin ve tigesiklinin MIC_{50} ve MIC_{90} değerlerinde biyofilmde artış göstermiştir ancak rifampisin için biyofilm ortamında suşlar duyarlı kalırken tigesiklinin MIC_{90} değerleri 1mg/L sınırına dayanmıştır ve suşlar dirençli olarak gözlenmiştir. İncelenen 40 suşun %60'ında yüksek düzeyde biyofilm , %40'ında düşük düzey biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Time-kill çalışmasında düşük düzey biyofilm yapan suşlarda vankomisin 15 mg/L uygulandığında bakterisidal etkinliğe ulaşmıştır. Yüksek düzeyde biyofilm üreten suşlarda ise bu konsantrasyonda bakterisidal aktivitede belirgin azalma görülmüştür. Ancak rifampisin ve tigesiklin için düşük ve yüksek düzey biyofilm üreten suşlarda bakterisidal aktivitede azalma görülmemiştir. İkili kombinasyonlarda yüksek ve düşük düzey biyofilm üreten suşlarda vankomisin+rifampisin ve vankomisin+tigesiklin etkinliğinde anlamlı fark bulunmamıştır. Düşük düzey biyofilm üreten suşlar üzerinde vankomisinin tek yada kombine uygulanmasının bakteriyel öldürme üzerinde farkı bulunmamıştır. Yüksek düzey biyofilm üreten suşlarda vankomisinin+rifampisin ve vankomisin+tigesiklin ikili kombinasyonlarında da etkinlikte anlamlı fark görülmemiştir (p=0.4). Araştırmacılar deneylerinde planktonik ve

biyofilm duyarlılık testlerinde iki farklı besiyeri (planktonik hücreler için Mueller Hinton Broth, biyofilm sesil hücreleri için Triptik Soy Broth-%1 dekstrozu) kullandıklarını bunun da biyofilmde bakteriyel besin kaynaklarını değiştirebileceği ve bu koşulların araştırmanın sonuçlarını etkileyebilecek bir nokta olabileceğine de değinmişlerdir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar KİKDE tedavisinde karşılaşılan vankomisine azalmış klinik yanıtın bu çalışmadan elde edilen vankomisine duyarlılık azalması verilerini destekler nitelikte olduğunu düşünmektedirler ve kombinasyon tedavisine ağırlık verilmesini önermektedirler.

Bizim sonuçlarımızda vankomisin ve tigesiklinin ikili kombinasyonlardaki duyarlılıkları Rose ve Poppens çalışmalarının (57) sonuçlarından farklı iken, Saginur (84) ile uyum göstermektedir. Bizim bulgularımıza göre de ikili kombinasyonlarda vankomisin içeren kombinasyonlar biyofilm ortamında en iyi aktiviteyi göstermişlerdir. Vankomisin+rifampisin kombinasyonunun etkinliği yüksek iken vankomisin+tigesiklin aktivitesi %100'den %47'ye düşmüştür. Bu farklılığın nedeni olarak, bizim çalışmamızda gerek planktonik gerekse biyofilmdeki duyarlılık testlerinde aynı besiyerinin (Mueller Hinton Broth) kullanılmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Gentamisin ve siprofloksasinin vankomisinli kombinasyonları hariç diğerleri en başarısız olanlardır. Gentamisin ve siprofloksasin içeren kombinasyonlardaki bu zayıf etkinin bu antibiyotiklerin tekli olarak da MRSA izolatları üzerindeki düşük aktivitesine bağlı olduğunu düşünüyoruz. Gentamisinin tek başına kullanıldığında biyofilm ortamında görülen duyarlılık artışı kombinasyonların hiçbirisinde gözlenmemiştir. Yine çalışmamıza ek bir bulgu olarak ikili kombinasyonlarla üçlüler arasında suşların %90'ından fazlasını inhibe etme açısından fark görülmemiştir. Saginur ve arkadaşları (84) ise rifampisin ve fusidik asit kombinasyonlarının MRSA'da %90'ın üzerinde aktivite gösteren en iyi kombinasyon olduğunu göstermişlerdir. MRSA suşlarının üçlü kombinasyonlardaki etkinliği rifampisin+vankomisin+fusidik asit ve rifampisin+siprofloksasin+fusidik asit ile en yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda vankomisin+siprofloksasin+rifampisin ve vankomisin+gentamisin+siprofloksasin kombinasyonlarının en iyi aktiviteye sahip olmasının vankomisin ile sinerjistik etki göstermelerine bağlı olabileceği düşüncesindeyiz. MRSA izolatları için de vankomisinli kombinasyonlar biyofilm oluşturan enfeksiyonlar için en iyi tercih gibi gözükmemektedir.

Meropenem, sefazolin ve seftazidim'e özellikle MRSA ve MRKNS suşlarında direnç görüldüğü halde seftobiprol gibi yeni moleküllerin etkinliği üzerine yapılan yayınlarda (26) düşük pH'da görülen yüksek duyarlılık değerlerinden dolayı bu üç antibiyotik çalışmamıza

dahil edilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu üç antibiyotik biyofilmde tek başına düşük duyarlılığa sahip olmasına rağmen MRSA ve MRKNS izolatlarında ilginç olarak özellikle kombinasyonlarda başarılı bulunmuştur. MRSA ve MRKNS izolatlarında bu antibiyotiklerin linezolid, tigesiklin ve vankomisin içeren kombinasyonlarına yüksek oranda duyarlılık gözlenmiştir. MRSA suşlarında vankomisin+meropenem kombinasyonu biyofilmde de en iyi aktiviteyi gösterirken, vankomisin+meropenem+seftazidim kombinasyonu üçlü kombinasyonlarda en iyi etkinlikte bulunmuştur.

MRKNS’da ise biyofilmdeki sonuçlar daha iyidir. Meropenem+tigesiklin ile vankomisin+sefazoline biyofilmde %100 duyarlılık görülmüştür. Üçlü kombinasyonlarda da vankomisin+meropenem+siprofloksasin, vankomisin+meropenem+tigesiklin, vankomisin+siprofloksasin+sefazolin, vankomisin+siprofloksasin+seftazidim’de %100 duyarlılık gözlenmiştir.

Biyofilmde MRSA suşlarında vankomisin tek başına olduğunda MBK değerleri 64 mg/L’nin üzerinde iken, vankomisinin meropenem, seftazidim ve tigesiklinli kombinasyonlarının suşların yarısından fazlasında bakterisidal etki göstermesi sinerjiyi düşündürmektedir.

Bu sonuçlar, etkinliğin oluşmasında MRSA ve MRKNS izolatlarında biyofilm ortamında da tek başına vankomisin duyarlılıkları yüksek olduğu için mi, yoksa beta laktam grubu antimikrobiyallerin kombinasyonu farklı mekanizmalarla direnci mi azaltıyor sorularını aklımıza getirmektedir. Bu etkinlik bu antimikrobiyallerin vankomisinin biyofilm ortamına penetrasyonunu artırması ile olabileceği gibi, biyofilm ortamında metabolik dengelerde yaptıkları şu anda bilinmeyen değişiklikler sonucu da olabilir düşüncesindeyiz. Ancak bunlar şu aşamada ileri çalışmalarda çözülmesi gereken hipotetik yaklaşımlardır.

Aaron ve arkadaşlarının 2002’de yaptıkları çalışmada (87) kistik fibrosis hastalarından izole edilmiş *P.aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları planktonik hücreler ve biyofilm ortamında araştırılmıştır. Seftazidim ve siprofloksasinin biyofilmde MİK ve MBK değerleri 2 kattan fazla artmış iken aksine aminoglikozidlerde ve meropenemde MİK değerlerinde önemli bir artış görülmemiştir. Piperasilinde ise hem planktonik hem biyofilmde direnç saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda ise siprofloksasin ve amikasin hariç test edilen tüm antimikrobiyallerin

etkinliği biyofilm ortamında belirgin azalmıştır. Aaron ve arkadaşlarından (87) farklı olarak bizim çalışmamızda siprofloksasin hem planktonik hem de biyofilm ortamında %100 etkili bulunmuştur. Ayrıca bakterisidal etkinlikte de planktonik hücrelere göre minimal artış olması da bu antimikrobiyalın pseudomonaslara karşı etkin olabileceğini düşündürmüştür. Kinolonların biyofilmdeki aktivitesi ile ilgili 2001’de yapılan bir çalışmada (88) ofloksasinin yüksek aktivite göstermiş olması sonuçlarımızı desteklemektedir. Piperasilin açısından değerlendirildiğinde de bulgularımız Aaron’dan (87) farklılık göstermektedir. Planktonikte tamamen duyarlı olan hücreler biyofilm ortamında tamamen dirençli tespit edilmiştir. Aslında bu sonucumuz Aaron’un piperasilinde biyofilm direnci ile ilgili bulgusunu güçlendirmektedir. Tigesiklinin pseudomonaslar üzerine etkinliği üzerinde tartışmalar devam ederken EUCAST kriterlerine göre sınır değerı 8 mg/L olarak kabul ettiğimizde planktonik hücrelerdeki duyarlılık biyofilm ortamında belirgin olarak azalmıştır. Bu bulgu da tigesiklinin *P.aeruginosa* üzerinde etkinliği ile ilgili tartışmalara farklı bir boyut getirmektedir düşüncesindeyiz.

Kistik fibrosis hastalarından izole edilmiş *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının planktonik hücrelerine antibiyotiklerin tek başına ve ikili/üçlü kombinasyonlarının duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada Lang ve arkadaşları (73) *P.aeruginosa* suşlarında tek başına iken yüksek doz tobramisin ve meropenemin ve buna bağlı olarak en etkin ikili kombinasyonun meropenem+siprofloksasin (%85) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar meropenem ile amikasin, seftazidim kombinasyonlarında sırasıyla %63 ve %38 oranlarında bakterisidal etki göstermişlerdir. Meropenem ve yüksek doz tobramisin ile bakterisidal etkiyi sırası ile suşların %44 ve %72’sinde görmüşlerdir. İkili kombinasyonlarda en başarılı ikili %85 bakterisidal etki ile meropenem+siprofloksasin olarak tespit edilmiştir. Meropenem+amikasin %63, meropenem+seftazidim %58, siprofloksasin+amikasin %40, siprofloksasin+seftazidim %37 bakterisidal etkinlik göstermiştir. Araştırmacılar üçlü antibiyotik kombinasyonu ile elde edilen başarının ikililerden daha anlamlı olmadığını bulgularına ekleyerek meropenemli kombinasyonların en uygun tedavi seçeneği olacağı görüşüne varmışlardır.

Bizim planktonik hücrelerde yaptığımız kombinasyon çalışmasında piperasilin+seftazidim (%60) ve siprofloksasin+amikasin (%93) hariç diğer kombinasyonlarda %100 duyarlılık saptanmıştır. Bu farklılığın bizim suşlarımızın tekli antibiyotiklere olan duyarlılık oranlarının yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünölmüştür. Buna bağlı olarak çalışmamızda üçlü kombinasyonlarda piperasilin+seftazidim+amikasin kombinasyonu hariç diğerlerinde yüksek

oranda inhibisyon elde edilmiştir.

Bizim çalışmamızda *P.aeruginosa* izolatlarımız ile biyofilm hücrelerinde meropenem duyarlılığı %13.3 olarak tespit edilirken, en etkin antibiyotiklerin siprofloksasin (%100) ve amikasin (%93.3) olduğu görülmüştür. Tigesiklin ve gentamisin de biyofilmde sırası ile %46.6, %40 duyarlı çıkmıştır. Ayrıca oluşturduğumuz ikili kombinasyonlar arasında en etkin olanı, biyofilmde de %100 inhibisyon elde edilen siprofloksasin+seftazidim kombinasyonudur. Aynı kombinasyon bakterisidal etkinlik bakımından %53 oranında başarı göstermiştir. Yukarıda verilen çalışma sonuçları ile bizim çalışmamızın biyofilm bakterisidal etkinliğini karşılaştırdığımız zaman meropenem+siprofloksasin'de %80, meropenem+amikasin'de %73, meropenem+seftazidim'de %0, siprofloksasin+amikasin'de %53 bakterisidal etki tespit edilmiştir. Araştırmacıların meropenemli kombinasyonların en uygun tedavi seçeneği olacağı görüşüne bizim çalışma verilerimiz de destek vermektedir.

Çalışmamızda ikili üçlü kombinasyonlar arasında etkinlik yönünden anlamlı fark olmaması Lang ve arkadaşları (73) ile uyumlu bulunmuştur. Bununla beraber çalışmamızın Lang ve arkadaşlarının çalışmasından farklılığı aynı kombinasyonların biyofilm ortamında da denenmiş olmasıdır. Seçilen suşlar her ne kadar planktonik formda duyarlı olsalar da biyofilm ortamında antimikrobiyal duyarlılığında belirgin azalma olması önemli bir bulgumuzdur. Kombinasyonlar açısından değerlendirdiğimizde, biyofilm ortamında kombinasyonların etkinliğinin azaldığı ve meropenemli kombinasyonların en etkin olduğu gözlenmiştir. En iyi kombinasyonlar siprofloksasin+ seftazidim ile meropenemli kombinasyonlardır. Bu bulgular da Lang ve arkadaşlarının meropenem ile elde ettikleri bulguları biyofilmde de desteklemektedir. Yine biyofilm ortamında da üçlü kombinasyonların ikililere göre üstünlüğünün olmadığı diğer bir bulgumuz olarak kaydedilmiştir.

Hill ve arkadaşlarının (74) çoklu ilaç dirençli *P.aeruginosa* suşları ile aerobik/anaerobik/biyofilm koşullarında yaptığı duyarlılık çalışmasında, meropenemin en başarılı sonuç veren antibiyotik kombinasyonlarında öne çıkması bizim çalışma bulgularımızla uyumlu bulunmuştur. Araştırmacılar meropeneme duyarlı olan suş oranını biyofilm ortamında %19 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da biyofilmde %13.3 oranında duyarlılık elde edilmiştir. Bu çalışmada meropenemin siprofloksasin ile olan ikili kombinasyonunda duyarlılık oranları planktonikte ve biyofilmde sırasıyla (%87.5, %50) seftazidimle olan kombinasyonunda ise (%68.8, %25) oranlarında tespit edilmiştir. Bizim

çalışmamızda meropenemin aynı kombinasyonlara duyarlılıkları sırasıyla (%100-%73) ve (%100-%47) olarak bulunmuştur. Bizim bulgularımızda daha yüksek duyarlılık oranları elde edilmesini yine aynı şekilde o çalışmadaki izolatların tamamının çoklu ilaç dirençli suşlar olmasına bağlamak mümkündür.

Biyofilm üreten *P.aeruginosa* suşlarında antibiyotiklerin sinerjisini araştıran 2008 yılında yapılmış çalışmada (75) ise geniş spektrumlu beta laktamlar ile aminoglikozidler ve beta laktamlar ile florokinolonlar arasında sinerji varlığı tespit edilmiştir. Biz de benzer şekilde *P.aeruginosa* izolatlarımızda ikili kombinasyonlara baktığımızda, biyofilmden seftazidim+siprofloksasin'in %100, meropenem+amikasin'nin %87, siprofloksasin+meropenem'in %73 duyarlı olduğu görülmüştür. Bu değerler sinerjik etkilerinden kaynaklanabilir düşüncesindeyiz.

Pseudomonaslardaki biyofilm duyarlılığı ilgili son çalışmalardan (89) birinde kistik fibrosis hastalarından izole *P.aeruginosa* izolatları, tobramisin ve meropenem içeren ikili antibiyotik kombinasyonlarının en etkin olduğu, üçlü kombinasyonlarda da etkinliğin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da, meropenemin pseudomonas biyofilmleri üzerinde, kombinasyonlarda en uygun görünen tercih olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmalar arasında gerek kombinasyonların içeriği gerekse sayısı açısından in vivo yanıtın değerlendirilmesinden önce, in vitro daha çok yolumuzun olacağı ve bu testlerin standardizasyona ihtiyacımız olduğu belirgindir.

Biyofilm duyarlılık testlerinin kistik fibrosisli hastalarda uygulanmasının hastanın klinik iyileşmesi üzerine etkisinin retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada (90) biyofilm duyarlılık testine göre yapılan tedavinin balgamda bakteri yoğunluğunu ve atak süresini belirgin azaltmakla birlikte tedaviye yanıt üzerinde etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak bu çalışmanın retrospektif olması nedeniyle bazı kısıtlılıkları vardır ve bu konuda prospektif çalışmalar gereklidir.

KİKDE'lerin patogeneğinde önemli bir mekanizma olan biyofilm oluşumunun bu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin etkinliğini azaltan önemli bir etken olduğu çalışmamızda görülmüştür. Bu nedenle tedaviye yanıtı artırmak amacıyla gündemde olan antibiyotik kombinasyonu yaklaşımlarının başarısının in vitro olarak araştırıldığı çalışmamızda bu enfeksiyonlara neden olan önemli patojenler üzerinde farklı

kombinasyonların hem planktonik hücrelerde hem de biyofilm ortamında daha etkin olabileceği gösterilmiştir. Bu bulguların in vivo ortamda desteklenmesi için bu alanda yapılacak yeni çalışmalar bu enfeksiyonların tedavisinde başarıyı artıracak önemli adımlar olacaktır.



6. SONUÇ

Biyofilm oluşturma yeteneği ile kateter yüzeylerinde antimikrobiyalere daha yüksek düzeyde direnç geliştirebilen bakterilerin başını *S.aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar ve *P.aeruginosa* çekmektedir. Bu tez çalışmasında kateterlerden izole edilmiş bu bakterilerin geniş bir antibiyotik paneli seçilerek tek ya da ikili ve üçlü kombinasyonlara planktonik hücre ve biyofilm ortamında duyarlılıklarında oluşan değişim in vitro olarak incelenmiştir.

Buna göre elde edilen veriler ışığında,

1. Metisilin dirençli *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar ile *P.aeruginosa* izolatlarımızda biyofilmdeki sesil hücrelerde planktonik formlara göre genel anlamda azalmış antibiyotik duyarlılıkları gözlenmiştir.
2. MRSA izolatlarımızda vankomisin ve tigesiklinin planktonik hücredeki %100 duyarlılığının biyofilm ortamında %86.6'ya hafif bir azalma göstermesine karşılık linezolidde %100'den %6.6'lara belirgin düşüş izlenmiştir. Ancak şaşırtıcı olarak gentamisin etkinliğinin biyofilmde daha arttığı bulunmuştur. Rifampisin ve siprofloksasin hem planktonik hem biyofilm ortamında etkisiz bulunmuş, %100 direnç gözlenmiştir. Gerek ikili gerek üçlü kombinasyonlarda vankomisin ve rifampisin içeren kombinasyonlar biyofilm ortamında en iyi aktiviteyi göstermişlerdir. Gentamisin ve siprofloksasin içeren kombinasyonlar ise en başarısız olanlardır. Biyofilm ortamında ikili ve üçlü kombinasyonların etkinliğinin belirgin olarak azaldığı görülmüştür. İkili kombinasyonlar ile üçlüler arasında duyarlılık farkı istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır.
3. MRKNS izolatlarında vankomisin, linezolid ve tigesiklinin planktonik hücrede %100 duyarlılığına karşın biyofilmde sırasıyla %93.3, %60 ve % 66.6 duyarlı bulunmuştur. MRKNS izolatları arasında en başarılı olan suşların %93'ünü inhibe eden vankomisin+rifampisin kombinasyonu olmuştur. Çalışmamızda ayrıca linezolid ve tigesiklin içeren kombinasyonların etkinliği de yüksek bulunmuştur. İkili kombinasyonların etkinliği biyofilm ortamında azalırken, üçlü kombinasyonlarda biyofilmdeki etkinlik planktonik hücrelere benzer bulunmuştur. Suşların %90'dan fazlasını inhibe eden ikili ve üçlü kombinasyonlar karşılaştırıldığında etkinliklerde anlamlı fark görülmemiştir.

4. Beta laktam antibiyotikler ile kombinasyonlarda planktonik yapıda görülen azalan duyarlılığına karşın biyofilm ortamında özellikle vankomisinli kombinasyonların oldukça başarılı sonuçları ilgi çekici bulgumuzdur.
5. *P.aeruginosa* suşlarına siprofloksasin hem planktonik hem de biyofilm ortamında %100 etkili bulunmuştur. Ayrıca bakterisidal etkinlikte de planktonik hücrelere göre minimal artış olması da bu antimikrobiyalın pseudomonaslara karşı etkin olabileceğini düşündürmüştür. Biyofilmde siprofloksasin (%100) ve amikasin (%93.3) en duyarlı antibiyotikler olarak tespit edilmiştir. Oluşturduğumuz ikili kombinasyonlar arasında *P.aeruginosa* izolatlarında biyofilmde de %100 inhibisyon gösteren siprofloksasin+seftazidim kombinasyonudur. Aynı kombinasyon bakterisidal etkinlik bakımından %53 oranında başarı göstermiştir. Meropenemli kombinasyonların en uygun tedavi seçeneği olacağı görüşüne bizim çalışma verilerimiz de destek vermektedir. Hem ikili hem de üçlü kombinasyonların aktivitesi biyofilm ortamında belirgin olarak azalmıştır. İkili ve üçlü kombinasyonlarda etkinlik açısından istatistiksel yönden anlamlı fark görülmemiştir.

Bu tez araştırmasının verileri biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda kombine tedavi yaklaşımlarının yerinde olacağını, ikili kombinasyonlarda tedavinin akılcı yaklaşım olacağını düşündürmektedir. Ancak klinik bakımdan in vivo verilerle desteklendiği takdirde KİKDE tedavisinde daha başarılı sonuçlar elde edilebilecektir görüşünü taşımaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RT, Mermel LS, Pearson ML, Randolph A, Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infection. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 51: 1-29, 2002.
2. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY, Leblebicioglu H, Abu Khader I, Miranda Novales MG, Berba R, Ramírez Wong FM, Barkat A, Pino OR, Dueñas L, Mitrev Z, Bijie H, Gurskis V, Kanj SS, Mapp T, Hidalgo RF, Ben Jaballah N, Raka L, Gikas A, Ahmed A, Thu le TA, Guzmán Siritt ME. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control. 38(2):95-104, 2010.
3. Tacconelli E, Smith G, Hieke K, Lafuma A, Bastide P. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature and registry-based estimates. J Hosp Infect. 72(2):97-103, 2009.
4. Ulusoy S, Akan H, Arat M, Baskan S. Damar İçi Kateter İnfeksiyonlarının Önlenmesi Kılavuzu. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 9 Ek 1: 5-14, 2005.
5. Z. Yılmaz. Teflon kateterlere göre vialon kateterlerin flebit açısından incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Bolu, 2006.
6. Leblebicioglu H, Rosenthal VD, Arikan OA, Ozgultekin A, Yalcin AN, Koksall I, Usluer G, Sardan YC, Ulusoy S. The Turkish Branch of INICC. Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). J Hosp Infect 65 (3): 251-257, 2007.
7. Pronovost P, Needham D, Berenholtz S, Sinopoli D, Chu H, Cosgrove S, Sexton B, Hyzy R, Welsh R, Roth G, Bander J, Kepros J, Goeschel C. An Intervention to Decrease Catheter-Related Bloodstream Infections in the ICU. N Engl J Med 355(26):2725-2732, 2006.
8. Zürcher M, Tramer M, Walder B. Colonization and bloodstream infection with single-versus multi-lumen central venous catheters: a quantitative systematic review. Anesth Analg 99: 177-182, 2004.
9. Dezfulian C, Lavelle J, Nallamothu B, Kaufman S, Saint S. Rates of infection for single-lumen versus multilumen central venous catheters: A meta-analysis. Crit Care Med 31(9):2385-2390, 2003.
10. Pratt RJ, Pellowe CM, Wilson JA Epic 2: national evidence-based guidelines for preventing healthcare-associated infections in NHS hospitals in England. J Hosp Infect 65(1):1-64, 2007.

11. Lorente L, Henry C, Martin MM, Jiménez A, Mora ML. Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. *Crit Care*. 9:631-635, 2005.
12. Aygün G. Damar içi kateter enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No:60:79-88, 2008.
13. Glupczynski Y, Delmee M, Goossens H, Struelens M. Distribution and Prevalance of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Isolates in Intensive Care Units in Belgian Hospitals Between 1996 and 1999, *Acta Clin Belg* 56 (5) : 297-306, 2001.
14. Aygen B, Kayabaş Ü. Yoğun Bakım Birimlerinde Dirençli İnfeksiyon Sorunu, *Klinik Dergisi*, 14 (2) :83-88, 2001.
15. Yılmaz N, Köse Ş, Ağuş N, Ece G, Akkoçlu G, Kıraklı C. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar, antibiyotik duyarlılıkları ve nozokomiyal bakteriyemi etkenleri. *ANKEM Derg* 24(1):12-19, 2010.
16. Erdal İnce. Sepsis ve Septik Şok. Editöre mektuplar. *J Pediatr Inf* 3:147-150, 2009.
17. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, Quinn JP, Doern GV. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol* 45(10):3352-9, 2007.
18. A report from the NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from january 1992 through june 2004, issued october 2004, *Am J Infect Control* 32(8):470-85, 2004.
19. Zhanel GG, DeCorby M, Laing. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian national intensive care unit (CAN-ICU) study, 2005- 2006, *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1430-7, 2008.
20. Rossolini GM, Mantengoli E: Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy, *Clin Microbiol Infect* 14(Suppl 6):2-8, 2008.
21. Madani N, Rosenthal VD, Dendane T. Health-care associated infections rates, length of stay, and bacterial resistance in an intensive care unit of Morocco: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Int Arch Med*. 2: 29, 2009.
22. Salomao R, Rosenthal VD, Grimberg G. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Rev Panam Salud Publica* 24(3):195-202, 2008.
23. Leblebicioğlu H, Rosenthal VD, Akan A: Device-associated hospital-acquired infection rates in Turkish intensive care units. Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC), *J Hosp Infect* 65(3):251-7, 2007.
24. Özden, M, Demirdağ, K, Kalkan, A, Kılıç, S.S.Yoğun Bakım Ünitelerinde İzlenen ve Hastane İnfeksiyonu Gelişen Olgulardan İzole Edilen Bakterilerin Sıklığı ve Antibiyotiklere Karşı Direnç Durumları. *İnfeksiyon Dergisi* 17(2):179-183, 2003.

25. Kılıç S, Beşirbellioğlu B, Kılıç A, Pahsa A. Bir eğitim hastanesinde 2003-2004 yıllarında saptanan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları. *Gülhane Tıp Dergisi* 47: 195-198, 2005.
26. Lemaire S. Activities of Ceftobiprole and other Cephalosporins against extracellular and intracellular (THP1 macrophages and keratinocytes) forms of methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6):2289-2297, 2009.
27. Zhanel GG, Voth D, Nichol K. Pharmacodynamic activity of ceftobiprole compared with vancomycin versus methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using an in vitro model. *J Antimicrob Chemother* 64(2):364-9, 2009.
28. Zhanel GG, Lam A, Schweizer F. Ceftobiprole: a review of a broad-spectrum and anti-MRSA cephalosporin. *Am J Clin Dermatol* 9(4):245-54, 2008.
29. Menteş GÖ, Balcı İ. Yoğun bakım, hematoloji-onkoloji hastalarında gastrointestinal sistemde kolonize olan enterokok türleri ve vankomisine direnç profilleri. III. Ulusal Yoğun Bakım Enfeksiyonları simpozyumu Nevşehir 2007, Poster no. 40
30. Chung G, Cha JO, Han S, Jang H, Lee K, Yoo JI, Yoo JS, Kim HB, Eun S, Kim B, Park O, Lee YS. Nationwide surveillance study of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* strains in Korean hospitals from 2001 to 2006. *J Microbiol Biotechnol* 20(3):637-42, 2010.
31. Seifert H. A longitudinal analysis of antimicrobial susceptibility in clinical institutions in Germany as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (2004-2007). *Chemotherapy* 55(4):241-52, 2009.
32. Farrell D, Turnidge JD, Bell J, Sader HS, Jones RN. The in vitro evaluation of tigecycline tested against pathogens isolated in eight countries in the Asia-western Pacific region (2008) *J Infect* (In press corrected proof) 2010.
33. Hanberger H, Arman D, Gill H. Surveillance of microbial resistance in European Intensive Care Units: a first report from the Care-ICU programme for improved infection control. *Intens Care Med* 35(1):91-100, 2009.
34. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 238:86-95, 1978.
35. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-45, 1995.
36. Donlan RM. Biofilm: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-90, 2002.
37. Jones HC, Roth IL, Saunders WM III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 99:316-25, 1969.
38. Altun H.U, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 39:82-88, 2008.

39. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426:306-10, 2003.
40. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-8, 2001.
41. Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley AP. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70:6339-45, 2002.
42. Moller S, Pedersen AR, Poulsen LK, Arvin E, Molin S. Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* 62:4632-40, 1996.
43. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-8, 1998.
44. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum sensing controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 186:692-8, 2004.
45. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 4:18-28, 2002.
46. Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* 5:647-56, 2003.
47. Williams P. Quorum sensing. *Int J Med Microbiol* 296:57-9, 2006.
48. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22, 1999.
49. Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA, Bakaletz LO. Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* 73:3210-8, 2005.
50. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 175:137-240, 1997.
51. Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 29:413-25, 1999.
52. Öztürk B. Bakteri yüzey slime yapısındaki moleküllerin, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi. Uzmanlık tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Dalı, Aydın, 2006.
53. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 236:163-73, 2004.

54. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? *J Hosp Infect* 64:313-25, 2006.
55. Stewart P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292(2):107-113, 2002.
56. Černohorská L. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol* 53 (1), 57–60. 2008.
57. Rose W, Poppens P. Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 63:485-488, 2009.
58. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13:34-40, 2005.
59. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 5:1213-9, 2003.
60. Çağlar K. Dezenfektanlara direnç gelişim mekanizmaları? Dezenfektan işlemi ne kadar tehdit etmektedir? Günaydın M, Saniç A, Gürler B, editörler. 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı. 702-14, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2005.
61. Russel AD. Bacterial adaption and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* 57:97-104, 2004.
62. Redfield R. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* 10:365-70, 2002.
63. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56-60, 2003.
64. Whitehead N, Barnard A, Slater H, Simpson N. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:365-404, 2001.
65. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 5:1213-9, 2003.
66. McDowell P, Affas Z, Reynolds C. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 24:895-904, 1997.
67. Middleton BJ, Qazi S, Hardman A. N-acylhomoserine lactones produced by *Pseudomonas aeruginosa* modulate agr-dependent virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Clin Rev Microbiol* 15:194-222, 2002.
68. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O. N-acylhomoserine lactone mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*. 147:3249-62, 2001.
69. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiol* 43:1367-78, 2002.

70. Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 48:151-60, 2004.
71. Wicox MH, Kite P, Mills K, Sugden S. In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. *Antimicrob Chemother* 47:171-5, 2001.
72. Baskın H. Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Sözlü sunum.*
73. Lang B, Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 162(6), 2241-2245, 2000.
74. Hill D. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 43: 5085–5090, 2005.
75. Paul M, Silbiger I, Grozinsky S, Soares-Weiser K, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 25(1):3344, 2006.
76. Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 31(4):131-8, 2000.
77. Gür D. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Ondokuzuncu Bilgi Eki, CLSI M100-S19, 2009.
78. Donlan R.M. Biofilms on central venous catheters: Is eradication possible? *Curr Top Microbiol Immunol* 322:133-161, 2008.
79. Kadry A. Impact of slime dispersants and anti-adhesives on in vitro biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lenses and on antibiotic activities. *J Antimicrob Chemother* 63(3):480-484, 2009.
80. Aslam S. Combination of tigecycline and n-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4):1556–1558, 2007.
81. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents*. (4):374-378, 2009.
82. Kotilainen P, Nikoskelainen J and Huovinen P. Antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococcal blood isolates with special reference to adherent, slime-producing *Staphylococcus epidermidis* strains. *Scand J Infect Dis* 23:325-32, 1991.

83. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42(4):939-41, 1998.
84. Saginur R. Multiple Combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 50(1):55-61, 2006.
85. Molina A, High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired MRSA ST228-SCC mecI capable of biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 62:961-967, 2008.
86. LaPlante K, Woodmanse S. Activities of daptomycin and vancomycin alone and in combination with rifampin and gentamicin against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an experimental model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 53(9):3880-3886, 2009.
87. Aaron S.D, Ferris W, Ramotar K. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 40(11):4172-4179, 2002.
88. Spoering A. L., Lewis K. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J Bacteriol* 183(23): 6746-6751, 2001.
89. Dales L, Ferris W, Vandemheen K, Aaron S.D. Combination antibiotic susceptibility of biofilm-grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(10):1275-9, 2009.
90. Keays T, Ferris W, Vandemheen KL, Chan F, Yeung SW, Mah TF, Ramotar K, Saginur R, Aaron SD. A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: a better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. *J Cyst Fibros* 8(2):122-7, 2009.
91. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Erişim Tarihi: 30/10/2009