T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ
II.Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Canan ERYILDIZ

STAFİLOKOK İZOLATLARINDA, ANTİBİYOTİKLERİN ANTİBİYOFİLM ETKİNLİĞİ ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Gülcan KUYUCUKLU

Referans no: 10151792

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ
II.Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Canan ERYILDIZ

STAFİLOKOK İZOLATLARINDA, ANTİBİYOTİKLERİN ANTİBİYOFİLM ETKİNLİĞİ ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Gülcan KUYUCUKLU

Destekleyen Kurum : TÜBAP-2018/46 ve TÜBİTAK 2228-B

Tez No:

EDİRNE – 2019

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ'a, Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e, ve ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Canan ERYILDIZ'a, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve laboratuvar çalışanlarına, Doç. Dr. Burhan ŞEN'e ve Bio. Gülsüm ÜZEYİR'e, bu süreçte beni destekleyen tüm arkadaşlarıma, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, desteğini tüm yaşamım boyunca benden esirgemeyen çok değerli aileme ve Ural KAZAN'a; projemizin gerçekleşmesinde desteklerinden dolayı TÜBAP birimine, doktora eğitimine teşvik eden ve burs aldığım TÜBİTAK'a ve TÜBİTAK 2228-B programına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatını bilime adamış tüm bilim kadınlarına…

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

STAFİLOKOKLAR **3**

BİYOFİLM VE YAPISI **11**

STAFİLOKOKLARLARDA BİYOFİLM OLUŞUMU **20**

N-ASETİLSİSTEİN (NAC) VE BİYOFİLME ETKİSİ **25**

ANTİBİYOFİLM AKTİVİTE TESTLERİ **29**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **36**

BULGULAR **58**

TARTIŞMA **93**

SONUÇ **101**

ÖZET **102**

SUMMARY **104**

KAYNAKLAR **106**

ŞEKİLLER LİSTESİ **121**

ÖZGEÇMİŞ **126**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AAP : Accumulation Associated Protein

agr : Accessory gene regulator

ATCC : American Type Culture Collection

bap : Biofilm Associated Protein

bhp : Bap-like Protein

CBD : Calgary Biofilm Device

cDNA : Complementary Deoxyribonucleic Acid

CFU : Colony Forming Unit

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

CNA : Collegen Adhesin

Ct : Cycle threshold

dk : Dakika

DLVO : Derjaguin Landau Verwey Overbeek

DNA : Deoxyribonucleic acid

DNaz : Deoxyribonuclease

EB : Elution Buffer

EPS : Extracellular Polmeric Substance

ET : Eksfoliyatif Toksin

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Fc : Fragment Crystallizable Region

FİK : Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu

fnb : Fibronectin Binding Protein

GIT : Guanidin tiyosiyanat

HCI : Hidroklorik asit

Ig : İmmunoglobulin

IP : İzopropanol

ica : İntracellular Adhesion

kDa : Kilo Dalton

KNS : Koagülaz Negatif Stafilokok

log : Logaritma

M : Molar

MBEK : Minumum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu

MBİK : Minumum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu

MGW : Molecular Grade Water

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

MHC : Majör Histokompatibilite Kompleksi

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MRSA : Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

MS : Mass Spectrometry

MSCRAMMs : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

MSSA : Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*

MTP : Mikro Titre Plağı

NAC : N-asetilsistein

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

NCTC : National Collection of Type Cultures

OD : Optic density

PBP : Penisilin Bağlayan Protein

PBS : Phosphate Buffered Saline

Ph : Power of Hdyrogen

PIA : Polisakkarit İnterselüler Adezinleri

PMS : Fenazin metosülfat

PNAG : N-asetil glukozamin

PSM : Fenolde Çözünebilen Modulinler

PV : Panton-Valentin

PYR : L-pirolidonil-beta- naftilamid

PCR : Polimerase Chain Reaction

qRT-PCR : quantitative -Real Time Polymerase Chain Reaction

QS : Quorum-sensing

r2 : Korelasyon faktörü

RNA : Ribonükleik Asit

rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asit

RT-RIN : Revers Transkriptaz Ribo Nükleik Asitaz İnhibitör

RQ : Relative Quantification

SarA : *Staphylococcus* yardımcı düzenleyici protein A

SD : Standart Değer

SEA : Stafilokokkal Enterotoksin A

SEM : Scanning Electron Microscope

Spa : Stafilokokkal Protein A

TE : Tris-EDTA

TEM : Transmission Electron Microscope

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

TSST-1 : Toksik Şok Sentromu Toksini-1

UDP-Glc-NAC : Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

XTT : 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

Δ : Delta

δ : Epsilon

°C : Santigrat derece

GİRİŞ VE AMAÇ

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glukozaminoglikanlar) ile çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır (1).

Biyofilm, cansız veya canlı yüzeylerde oluşabilir. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler en başta yer alır. Biyofilmin prostetik kalp kapağı, intrauterin araç, kontakt lens, santral venöz kateter, üriner kateter, meme implantı gibi medikal araçlar üzerinde gelişmesi, biyofilm kaynaklı enfeksiyonlara ve hasta morbiditesinin artmasına sebep olmaktadır. Bu durum aynı zamanda sağlık bakımı maliyetlerinde artışa da neden olur (1,2).

Biyofilmler, antibiyotik etkisine dirençli ve antifagositik etkileri olması nedeniyle, sıklıkla tedavisi zor, kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır (3). Enfeksiyon hastalıklarının yaklaşık %65'i biyofilm oluşturan bakteriler ile ilişkilidir. Klinik öneme sahip pek çok Gram pozitif, Gram negatif bakteri ve funguslar biyofilm oluşturur (4). Bu mikroorganizmalardan biri olan Stafilokoklar, *Staphylococcaceae* ailesinde yer alan, fakültatif anerobik, Gram pozitif, küme oluşturan koklardır. Stafilokoklar, insanda nazofarenks, deri, vajina, rektum, perine ve burunda yaygın olarak kolonize olur ve fırsatçı patojen olarak insan enfeksiyonlarından en sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar arasında yer alır. İnsandan insana direkt temas veya hava yoluyla bulaşabilirler. Hastane kökenli enfeksiyonların en sık etkenlerinden olan *Staphylococcus aureus ve Staphylococcus epidermidis,* enfeksiyonların çoğunlukla biyofilm kaynaklı olmaları nedeniyle oldukça önemli mikroorganizmalardır (5). *Staphylococcus* türleri, glikokaliks veya salgı tabakası içerisine gömülmüş çok tabakalı biyofilm oluşturabilir. Bu etkenlerin oluşturdukları biyofilm, ölü doku ve kemik veya tıbbi

olarak implante edilmiş cihaz üzerinde gelişir ve biyofilm kaynaklı tedavisi zor enfeksiyonlara neden olur (6).

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde, antibiyotik etkinliği azalmaktadır. Matriksin fizikokimyasal özellikleri ve ekzopolisakkaritlerden düşük ve geciken penetrasyonun sonucu olarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların öldürülmesi için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonu, planktonik formlarının tedavisi için gereken antibiyotik konsantrasyonunun 1000 ila 15000 katı arasında olabilir (7).

Son yıllarda antibiyotik direncini kırma ya da farklı mekanizmalarla bakteriyel üremeyi ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonu engelleme konusunda yapılan çalışmalar; bakterilerin çevreyi algılama yani Quorum Sensing (QS) özelliklerini baskılama ya da değiştirmeleri üzerinden bir yol izlenebileceğini düşündürmüş ve önemli bir beklenti yaratmıştır. Aynı zamanda, biyofilm mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı da konakçı çevreye mikrobiyal adaptasyonu önlemek için umut veren bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde, birçok molekülün antibiyofilm aktivitesi araştırılmaktadır. Bu moleküllerden birisi de N-asetilsistein (NAC) molekülüdür. NAC, bir tiyol bileşiği olup L-sistein ve glutatyonun öncüsü olan önemli bir mukolitik maddedir. NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltmakta etkili olduğu bilinmektedir (8,9).

Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus ve S. epidermidis* izolatlarının; i) biyofilm yapma yeteneklerinin, ii) stafilokok tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonlarının (MBEK) ve iii) biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyelerinin, NAC molekülü varlığındaki değişiminin ortaya konması amaçlanmıştır. Böylece, NAC'ın, antibiyotiklerin, stafilokok izolatlarına karşı antibiyofilm etkinliğini nasıl değiştirdiği gösterilerek yeni tedavi yaklaşımları için yol gösterici bir sonuç elde edilmesi hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

STAFİLOKOKLAR

Genel Özellikleri

Stafilokoklar, 1878 yılında ilk kez Robert Koch tarafından tanımlanmış, Alexander Ogston tarafından isimlendirilmiş; üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan (Yunanca: *staphylia* - üzüm), *Staphylococcaceae* ailesinde yer alan Gram pozitif koklardır (10) (Tablo 1). Genelde üzüm salkımı şeklinde görülme eğilimi gösterseler de, tekil, ikili ya da kısa zincirler şeklinde de görülebilirler. Bu bakteriler, yaklaşık 0.5-1.5 µm çapında küçük, yuvarlak ve oval bakterilerdir (11) (Şekil 1). Hareketsizdirler. Spor oluşturmazlar. İdeal üreme sıcaklıkları 37°C'dir. pH 7,4'te, fakültatif anaerob olarak, 18-40°C sıcaklık aralığında üreyebilirler. Bu cins içerisinde *Staphylococcus saccharolyticus* anaerobtur (11,12). Yüksek konsantrasyonda tuz varlığında (%10 NaCI), üreyebilmelerinden yararlanılarak, Mannitol Salt Agar gibi seçici besiyerleri ile kolayca izole edilebilirler (12).

Katalaz enziminin varlığı, en önemli özelliklerinden biridir. Bu bakterilerin katalaz testi pozitif, oksidaz testi negatiftir. Stafilokoklar, glukoz başta olmak üzere karbonhidratları parçalayarak son ürün olarak laktik asit oluşturur fakat gaz oluşturmazlar. Bu cins içerisindeki türlerinin çoğu 37°C'de 24 saat içinde 1-3 mm çapında, kenarları düzgün ve hafif kabarık, renkleri sarıdan porselen beyazı rengine kadar değişebilen koloniler oluşturur (13). Kuvvetli biyofilm tabakası oluşturan nadir türler, mukoid koloni morfolojisi gösterebilir. Uygun ortam şartlarında 2 günde koloni büyüklügü 6-8 mm çapına ulaşabilir. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* ise beyaz renkte koloni oluşturur (12,13) (Şekil 2). Ancak bu bakterilerde anaerobik koşullarda pigment oluşumu ortadan kalkar. Bu bakteriler, sporsuz olmasına

rağmen dış çevre şartlarına ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kültürlerde, 4°C'de 2-4 ay, -20°C'de ise 3-8 ay canlılıklarını devam ettirebilir fakat 60°C'lik sıcaklığa 30 dk dayanabilirler. Ayrıca, %2 fenolde, 15 dakikada inaktive olurken; %3 hekzaklorofen gibi belirli kimyasallarla da inhibe olurlar (14,15).

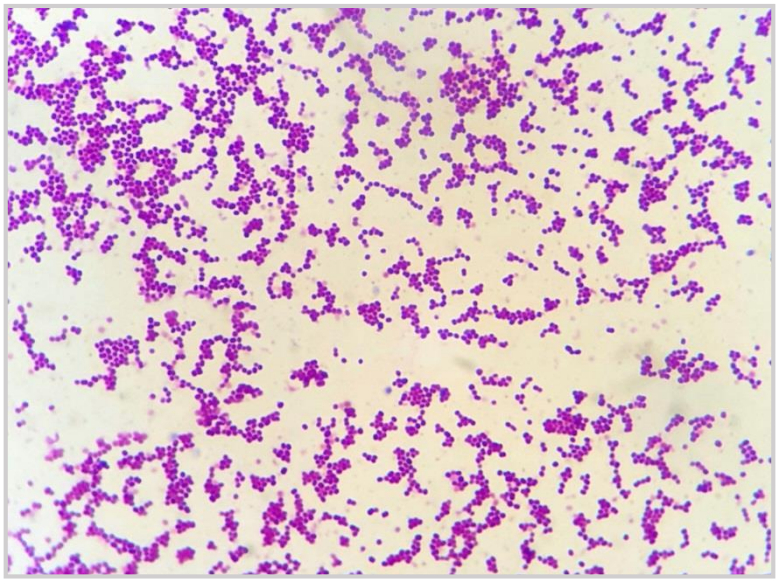
Staphylococcus cinsi, 45 tür ve 24 alt tür içerir. Bu cinsin tür ayrımında; koagülaz testi, mannitol üzerine etkileri, novobiyosin duyarlılığı ve deoksiribonükleaz testi kullanılmaktadır. Koagülaz testi pozitif sonuç veren türler, *S. aureus, S. intermedius ve S. hyicus*'tur. *S. aureus*'un koagülaz oluşturma yeteneği, diğer virülansı düşük türlerden ayrılmasını sağlar. Diğer türler genelde koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak bir arada değerlendirilir. Koagülaz testi negatif sonuç veren türler arasında; *S. epidermidis, S. hominis, S.haemolyticus, S. caprae, S. capitis, S. koossii, S. lentis, S. sciuri, S. simulans, S. warneri, S. equorum, S. gallinarum*ve *S. saphrophyticus* yer almaktadır (16). *S. aureus*, karbon kaynağı olarak mannitolü kullanırken, *S. epidermidis* izolatları mannitol fermentasyonu yapmaz. *S. epidermidis* suşları, albamisin veya katomisin olarak da bilinen novobiyosine karşı duyarlı olup, *S. saprophyticus'*dan bu özelliği ile ayrılır. Deoksiribonükleaz testi; mikroorganizmalarda DNaz aktivitesini belirlemek için kullanılmaktadır. *S. epidermidis* türü bu enzime sahip değilken; *S. aureus* türü bu enzim aktivitesine sahiptir (17,18) (Tablo 2).

Stafilokoklar, üredikleri ortamda konakçı üzerine etkili olan ve antijenik özelliğe sahip 30'dan fazla madde salgılar. Bu maddeler arasında, α-hemolizin, β-hemolizin, pirojenik toksin, epidermolitik toksin, enterotoksinler, bakteriyosin, lökosidinler, stafilokoagülaz, lizozim, nükleazlar, hiyalüronidaz gibi ekstraselüler maddeler ve peptidoglikan, kümelenme faktörü ve protein A gibi selüler maddeler sayılabilir (19).

Stafilokoklar, insanda deri ve mukozal yüzeylerde yaygın olarak kolonize olur ve fırsatçı patojen olarak bilinirler. İnsanlarda, nozokomiyal enfeksiyonlara, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, cerrahi yara enfeksiyonlarına, toksinlere bağlı enfeksiyonlara, solunum sistemi enfeksiyonlarına, üriner sistem enfeksiyonlarına, santral sinir sistemi enfeksiyonlarına, kardiyovasküler sistem enfeksiyonlarına, kas ve iskelet sistemi enfeksiyonlarına, biyofilm kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadırlar. İnsan hastalıkları ile ilişkili olarak en iyi bilinen türleri *S. aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. saprophyticus'*tur (19). Bunların içinde etken olaraken sık rastlanan türler *S. aureus* ve *S. epidermidis'*dir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları kromozomal olarak *mec-A* geni taşımaktadır. Hastane enfeksiyonlarının ikinci en sık etkeni olan *S. aureus*'ların büyük çoğunluğu metisiline dirençlidir (14).

Tablo 1. *Staphylococcus* cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması (11)

Alem	*Bacteria*
Şube	*Firmicutes*
Sınıf	*Bacilli*
Takım	*Bacilliales*
Aile	*Staphylococcaceae*
Cins	*Staphylococcus*



Şekil 1. Gram boyama yöntemi ile boyanmış Stafilokokların mikroskobik görünümü (x100)



Şekil 2. *S. aureus* (solda) ve *S. epidermidis* (sağda) koloni morfolojisi (%5 koyun kanlı agar) (10)

Tablo 2. Klinik öneme sahip *Staphylococcus* türleri için önemli testler ve sonuçları (5)

Tür	Koa-gülaz	Isıya dayanıklı nükleaz	Alkalen fosfataz	Novo-biyosin direnci	Poliki-non B direnci	D-Trehaloz	D-Mannitol	Biyofilm
S. aureus	+	+	+	-	+	+	+	+
S. epidermidis	-	-	+	-	+	-	-	+
S.saprophyticus	-	-	-	-	-	+	d	-
S. lugdunensis	-	-	-	-	d	+	-	+
S. haemolyticus	-	-	-	+	-	+	d	d

(+): %90'dan fazla tür pozitif; (-):%90'dan fazla tür negatif; d: Türlerin % 11-89'u pozitif

Mikrobiyolojik Yapı ve Fizyolojik Özellikleri

Hücre duvarının en dış bölümü, birçok stafilokokta polisakkarit kapsül ile çevrelenmiştir. *S. aureus* suşlarında 11 adet kapsül serotipi belirlenmiştir. Serotip 1 ve 2, çok kalın bir kapsüle sahip, mukoid görünümlü koloniler oluşturup, insanda nadiren görülen hastalıklar ile ilişkilidir. Serotip 5 ve 8 ise, insanda en sık enfeksiyona neden olanlardır (19,20). Kapsül, bakterilerin fagositozunu engelleyerek, polimorfonükleer lökositlerden korumaktadır. Bu bakterilerde bulunan biyofilm tabakası, monosakkaritler, proteinler ve peptidler içermekte ve bakterilerin değişik yüzeylere ve yabancı cisimlere (katater, şant, greft, prostetik kapak vb.) tutunma özelliğini arttırarak, sağ kalımında önem taşımaktadır (21). Bakterinin hücre duvar yapısı; bakteriye şeklini veren, dış ortam şartlarına karşı fiziksel bariyer oluşturan ve yapısal destek sağlayan bir yapıdır. Bu bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan ve teikoik asit olmak üzere başlıca iki önemli kimyasal yapıdan oluşmaktadır.

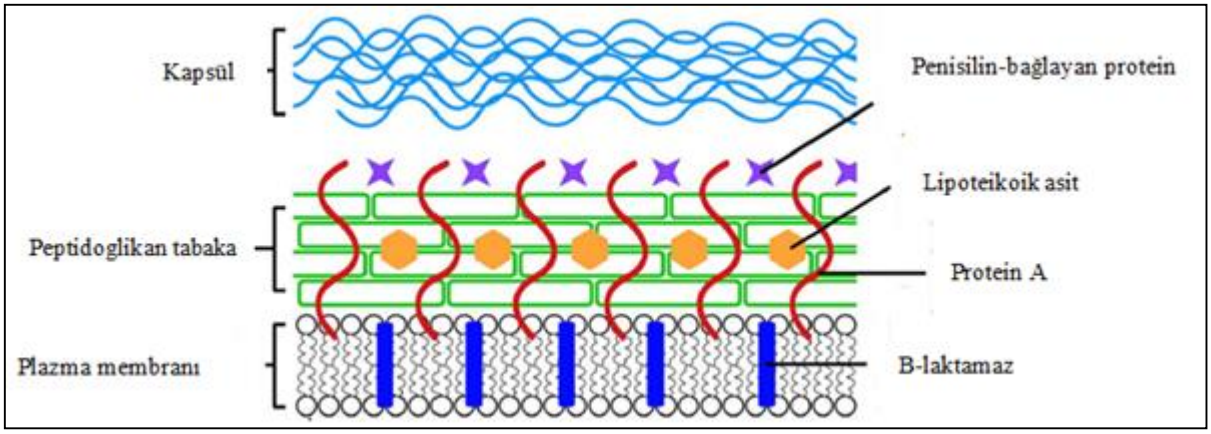
Peptidoglikan, glikan zincirlerinden ve 10-12 arasında değişen N-asetilmuramik asit ile N-asetilglukozamin alt ünitelerinden oluşur. Oligopeptid yan zincirleri, N-asetilmuramik asit alt ünitelerine bağlanarak, peptid köprüleri ile çapraz bağ yapar. Bu çapraz bağlanmış katmanlar, hücreye dayanıklılık ve sağlamlık kazandırır (20,21). Peptidoglikan tabakasının yapımında görevli enzimlere penisilin-bağlayan proteinler (PBP) denir ve bu enzimler beta-laktam antibiyotiklerin hedefidir. Metisilin ve benzeri penisilinlere direnç, kromozomal olarak aktarılan *mec-A* geni ile ilişkilidir (22). Bu gen, PBP2'yi kodlar. PBP2, betalaktamlara düşük afinite gösterdiği için peptidoglikan sentezinin devamını sağlar. Bu durum, toplum için yeni bir tehdit oluşturan MRSA suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. MRSA suşları; metisilin, oksasilin, nafsilin ve sefalosporinlere karşı dirençlidir ve bu nedenle klinik olarak oldukça önem taşırlar (22,23).

Teikoik asitler, hücre duvarının önemli komponentlerinden biri olup, hücre duvar kuru ağırlığının %30-50'sini oluşturur. Teikoik asitler türe özgül olup, N-asetilmuramik asite ya da

sitoplazmik membran lipitlerine kovalent olarak bağlanmıştır. Bu yapılar, zayıf immünojen özellikte olsalar da peptidoglikana bağlı olduklarında özgül antikor yanıtını uyarabilmektedir (24). Teikoik asitler, hücre duvar teikoik asitleri ve membran teikoik asitleri olmak üzere ikiye ayrılır. Duvar teikoik asitleri, Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakasına bağlı olup; yapısında poliribitol fosfat (*S. aureus*) veya poligliserol fosfat (*S. epidermidis*) bulunur. Membran teikoik asitleri ise sitoplazmik membranın dış yüzeyinde yerleşmiş halde olup gliserol fosfat molekülleri içerirler (24,25).

Protein-A (Spa), *S. aureus* suşlarının yüzeyinde bulunurken; koagülaz negatif olan suşlarda bulunmaz. Bu protein, peptidoglikana ya da sitoplazmik membrana bağlı olarak bulunur. IgG_1, IgG_2 ve IgG_4'ün Fc parçalarına bağlanma özelliği gösterir. Protein A varlığının gösterilmesi, *S. aureus* için kullanılan özgül bir tanımlama testidir (26). *S. aureus*, suşlarının dış yüzeyinde aynı zamanda kümelenme faktörü (bağlı koagülaz) de bulunmaktadır. Bu protein, *S. aureus* için önemli bir virülans faktörüdür (27,28). Bu protein, ilk olarak plazmada bulunan protrombin ile reaksiyona girerek kompleks oluşturur. Bu kompleks, trombin aktivasyonuna neden olur. Böylece koagülaz, fibrinojene bağlanarak onu fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümelenmesine neden olur. Bu mekanizma sayesinde mikroorganizma fibrin takakası ile sarılarak fagositozdan korunmuş olur (28,29). Bu protein de, *S. aureus*'un tanımlamasında kullanılan özgül testlerden biridir. *S. epidermidis* ve diğer KNS, bu enzime sahip olmamalarıyla, *S. aureus*'dan ayrılır (30).

Sitoplazmik membran; protein, lipid ve az miktardaki karbonhidrattan oluşur. Osmotik basıncı dengeleyen bir bariyer görevi yapar. Ayrıca, hücrenin biyosentez ve solunum enzimlerini taşıyan bir yapı olarak işlev görmektedir (31) (Şekil 3).



Şekil 3. *S. aureus*'un hücre duvar yapısı (32)

Virülans Özellikleri

Stafilokokların virülans faktörleri, konak dokularına tutunmayı sağlayan yüzey proteinlerinden, özgül toksinlerden, hidrolitik enzimlerden ve biyofilm yapma özelliklerinden oluşur (33,34). Stafilokokların virülans faktörlerinin ekspresyonu, agr (aksesuar gen regülatörü) adı verilen bir düzenleme sisteminin kontrolü altındadır. Bu düzenleme sistemi, bakteri proteinlerinin ekspresyonunu arttırarak dokudaki kolonizasyonu artırmada görev yapmaktadır (34).

Yüzey yapıları

Bazı stafilokoklar kapsül oluşturur. Bu kapsüller, serumdaki opsoninlere bağlanarak onları kapatır, bakteriyi fagositozdan korur ve mononükleer hücre infiltrasyonunu önler (35).

Hücre dışı biyofilm tabakası da bakterileri fagositozdan koruyan bir diğer yüzey oluşumudur. Ayrıca, bakterinin yabancı cisimlere tutunmasını kolaylaştırır ve antibiyotiklere olan duyarlılığını azaltır. Yapılan çalışmalarda, stafilokoklarda biyofilm oluşumunun oldukça yaygın olduğu bildirilmektedir (36). Protein A, bir grup adezin (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMS) arasında yer alan bakteri yüzey proteinidir. Bu protein, *S. aureus'ta* bulunan, serumdaki bazı opsoninlerin (IgG_1, IgG_2, IgG_4) Fc reseptörlerine bağlanarak, antikor bağımlı immün temizlemeyi inhibe eder ve antikomplementer etki gösterir. Sitokinleri ve trombositleri uyarabilir ve B hücrelerini aktive eder (37).

Fibronektin bağlayan protein A ve B (fnbA ve fnbB) yüzey proteinleri ise, fibrinojen ve fibronektine bağlanarak yabancı yüzeylere yapışma ve tıbbi cihazlara kolonize olmada işlev görürler (38).

Enzimleri

Koagülaz: *S. aureus'*un tanımlanmasında sıklıkla kullanılan en önemli enzimlerden biri koagülazdır. Bu özellik, stafilokokun plazma içinde inkübe edilmesiyle gösterilir. Birkaç saat inkübasyonu takiben, plazma içinde fibrin pıhtısı oluşur. Koagülaz, bakterilerin oluşturduğu abselerin etrafında fibrin tabakası oluşturarak bakterilerin fagositozdan korunmasını sağlar. İki ayrı koagülaz tipi vardır. Bunlardan ilki, stafilokokların hücre duvarına bağlı koagülazdır. Bu enzim fibrinojeni doğrudan fibrine dönüştürerek kümeleşmeyi sağlar. Bu nedenle kümeleşme faktörü olarak da bilinir. İkincisi ise serbest koagülazdır. Bu enzim de aynı etkiyi globülin plazma faktörü (koagülaz reaksiyon faktörü) aracılığıyla

gösterir. Ortama salındığında trombin ile birleşerek stafilotrombin oluşturarak, fibrinojenin fibrine dönüşmesini katalize eder (38).

Hyaluronidaz: Doku kompenentlerinin yapısında bulunan hyalüronik asitin parçalanmasına neden olur. Böylece bakteriler, doku içinde hızlıca yayılabilir.

Stafilokinaz: Bu enzim, bir fibrolizindir. Fibrin yapısını çözerek fibrinolitik etki meydana getirir.

Bu bakterilerde aynı zamanda hidrojen peroksitin toksik etkisinden korunmayı sağlayan katalaz; vücudun sebase dokularında barınmayı sağlayan lipazlar ve visköz DNA'yı hidrolize eden ısıya dayanıklı termonükleaz enzimleri de bulunabilir.

Ekstraselüler proteazlar: Metalloproteaz, serin ve sistein proteazlardır. *S. aureus* ve *S. epidermidis'*de bulunur. Bu proteazlar, konak savunmasının aşılmasında ve dokulardaki hızlı yayılmada işlev görmektedir.

Üreaz: Üre döngüsünde ve aminoasit metabolizmasında rol oynayarak üre yıkımına neden olur. Özellikle biyofilm oluşturan bakteri hücrelerinin metabolizmaları sonucu, laktik asit ve formik asit ortaya çıkar. Bu olay pH azalmasına neden olmaktadır. Bakteriler, bu düşen pH değişiminden kendilerini üreaz enzimi ile korumaktadır (38-41).

Toksinleri

Staphylococcus cinsi içerisinde yer alan *S. aureus*, beş farklı sitolitik toksin (alfa, beta, delta, gamma ve Panton-Valentin), iki eksfoliyatif toksin (A ve B), on sekiz enterotoksin (A-R) ve toksik şok sendromuna neden olan toksik şok sendrom toksini-1 (TSST-1) gibi çok sayıda toksin yapmaktadır (42).

Alfa toksin (α-hemolizin): *S. aureus* suşları tarafından salgılanan 33 kDa ağırlığında bir proteindir. Bu toksin, sitoplazmik membranlara gömülür ve transmembran por oluşumuna neden olur. Bu durum hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Bu toksin nötrofiller üzerine etkili olmasa da; kan damarlarındaki düz kaslar, eritrositler, lökositler, hepatositler, trombositler gibi hücreler olmak üzere vücuttaki pek çok hücreyi parçalayabilir (43).

Beta toksin (Sfingomiyelinaz–C, β-hemolizin): Fosfolipaz C aktivitesine sahiptir. Sfingomiyelin ve fosfotidilkoline spesifiktir. Membran fosfolipidlerini parçalayarak eritrosit ve lökosit gibi hücrelerin lizisine neden olur (43).

Delta toksin (δ-hemolizin): Hücrelerde membran hasarına yol açan, 26 aminoasitten oluşmuş bir proteindir. *S. epidermidis* tarafından üretilen hemolizin; genellikle δ-toxindir. Bu toksin, hücre yüzeyinde geniş porlar oluşturarak etki eder ve eritrositler başta olmak üzere hücreleri patlatır. Ayrıca makrojafları uyararak sitokin salgılanmasına neden olur (43).

Gama toksin (γ-hemolizin): *S.aureus*'un tüm suşları tarafından üretilmektedir. Bu toksin, nötrofillerin ve makrofajların parçalanması neden olur. Bu toksinin sitolitik etkisi membran yüzeyinde por oluşumunu takiben hücre katyon gradiyentindeki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bunun sonucu olarak da salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olabilirler (43).

Panton–Valentin lökosidin (PV lökosidin): Bu bakterilerin %10'dan azı tarafından üretilir. Her iki toksin de iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bu polipeptid yapılara, S ve F komponentleri adı verilir. Yapısal olarak üç farklı adet S zinciri ve 2 farklı adet F zinciri salgılanır. Bu farklı zincirlerin farklı birleşimleri sonucu altı farklı gama toksin ve PV lökosidin oluşur. Bu toksinler gibi hücre lizisine ve doku yıkıma yol açar. Ayrıca bu toksinler, eritrosit, makrofaj, lenfosit, nötrofiller ve trombositler üzerine etkilidir (44).

Eksfoliyatif toksin (Epidermolitik toksin): *S. aureus* suşlarının küçük bir bölümü tarafından oluşturulur. Antijenik yapı bakımından A ve B tipleri bulunur. A tipi kromozomal genler tarafından kodlanır ve ısı stabildir. B tipi ise plazmide bağlı genler tarafından kodlanır ve ısı labildir. Bu toksin stafilokokal haşlanmış deri sendromunun nedenidir. Süperantijen özelliktedir. Sadece derinin keratinize epidermis tabakasının stratum granulosum bölümünde bulunan desmoglein-1'e bağlanarak, serin proteaz aktivitesi gösterir. Burada hücreler arası bağları bozarak, intradermal bağlantıları koparır (44,45).

Enterotoksinler: *S.aureus*'un meydana getirdiği suda eriyebilen fakat sindirim enzimlerine ve kaynatmaya dayanıklı polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksinlerin A, B, C1, C2, D, E, F gibi farklı tipleri bulunmaktadır. Bir suşta bir ya da birkaç türü bulunabilir. Bu toksinler, kuvvetli gastrointestinal toksin olmalarının yanında süperantijenik özellikte olup, MHC sınıf II proteinlerine bağlanıp T-hücre proliferasyonunu stimüle ederek, yoğun sitokin salınımına yol açarlar. Stafilokokkal Enterotoksin A (SEA), stafilokokkal besin zehirlenmelerine neden olan en önemli toksindir. Stafilokokkal Enterotoksin D, gıda zehirlenmelerinde karşılaşılan diğer bir önemli toksindir (46,47).

Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1): Süperantijen özellikte olup, yapısal olarak enterotoksin B ve C'ye benzer. Menstruasyon dönemindeki kadınlarda vajinal tampon kullanımı ve burun ameliyatları sonrası burun tamponlarının kullanımı kolonizasyonu kolaylaştırır. *S.aureus*'ların %20'sinde bulunduğu belirtilmekte olup; bu toksinin yapımından faj 1 grubundan 29 ve 52 tipleri sorumludur (47-49).

S. aureus ve *S. epidermidis* cinsi bakterilerin virülans faktörleri ve etkileri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 3) (35,36,45).

Tablo 3. *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in virülans faktörleri ve biyolojik etkileri (35,36,45)

Virülans Faktörleri		Biyolojik Etkileri
Yüzeyel Yapıları	Kapsül	Adezyon ve antifagositer etki (*S. aureus, S.epidermidis*)
	Biyofilm tabakası	Yabancı cisimlere tutunma (*S. aureus, S.epidermidis*)
	Pepdidoglikan	Zayıf endotoksin benzeri etki ve apse oluşumu (*S. aureus, S.epidermidis*)
Yüzeyel Yapıları	Teikoik Asit	Fibronektine bağlanma (*S. aureus, S.epidermidis*)
	Protein A	IgG (G3 dışında) Fc parçasına bağlanma ve kompleman karşıtı etki (*S. aureus*)
Enzimleri	Koagülaz	Fibrinojeni fibrine dönüştürme (*S. aureus*)
	Hylalurinidaz	Bağ dokuyu parçalama ve yayılım (*S. aureus*)
	Stafilokinaz	Fibrini çözer (*S. aureus*)
	Lipaz	Lipitleri parçalama (*S. aureus*)
	Nükleazlar	Nükleik asiti parçalama (*S. aureus*)
	Katalaz	Antifagositer etki (*S. aureus, S. epidermidis*)
	Metalloproteaz ve sistein proteaz	Elastaz aktivitesi ve doku harabiyeti (*S. epidermidis*)
Toksin-leri	Hemolizin (α, β, γ, δ, P-V Lökosidin)	Farklı hücreler ve lökositler üzerinde sitolitik etkinlik (*S. aureus*)
	δ-toxin	Eritrositleri parçalar ve sitokin üretimini uyarır (*S. epidermidis*)
	Enterotoksin (A-E, H,I)	Stafilokokkal besin zehirlenmesine neden olur ve süper antijenlerdir (*S. aureus*)
	Eksfoliyatif toksin (ET-A, ET-B)	Epidermiste bulunan desmosom köprülerini parçalar, haşlanmış deri sendromuna sebep olur (*S. aureus*)
	TSST-1	Toksik Şok Sendromu etkeni ve süper antijen (*S. aureus*)

BİYOFİLM VE YAPISI

Biyofilm, bir substrata veya ara yüzeye tutunmuş mikroorganizma kolonileri ve onların salgıladığı hücre dışı maddelerden ve çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerin birleşiminden oluşan bir tabakadır (50). Donlan (51), biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve biyofilmi geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüzeye veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan formları ile aralarında farklılıklar bulunan, mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamıştır. Mikroorganizmaların yüzeye tutunarak oluşturduğu her tabaka biyofilm olarak tanımlanamaz. Gerçek bir biyofilm yapısında olmayan mikroorganizmalar, bulundukları ortamda planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedir. Bu yapılarda, normal biyofilm tabakası içerisindeki mikroorganizmalarda bulunan direnç ve geri dönüşümsüz yapışma özellikleri bulunmamaktadır (50,51).

Biyofilm matriksinin %95'e varan kısmını su oluşturur. Matriks, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptir. Biyofilm içerisindeki hücrelere, esansiyel besinleri ve oksijeni taşıyan ve atık maddeleri uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları bulunur. Biyofilm içerisinde

bulunan bu kanallar ve su, bakteriyel yapıları birbirine bağlayarak, biyofilm içerisindeki maddeler için çözücü ve taşıyıcı bir işlev görür. Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstrapolimerik maddeler (EPS) biyofilmin ana ekstraselüler komponentini meydana getirir. EPS, biyofilm hücrelerinin yüzeye sıkıca tutunmasını ve yüzeye dönüşümsüz olarak bağlanmasını sağlar. Yapısında öncelikle polisakkaritler bulunmaktadır. EPS, yüksek oranda su içeriğine sahip olup, yapısında hidrofilik, hidrofobik ya da ikisini de içeren kısımlar bulunmaktadır. Yapısındaki yüksek su içeriği biyofilm içerisindeki mikroorganizmaları su kaybına karşı korur (52). Biyofilm içerisinde yerleşen mikroorganizmalar matriks kütlesinin %5'ini oluştururken; ekzopolisakkaritler %1-2, globüler yapıdaki proteinler ve enzimleri içeren diğer proteinler %1-2, parçalanan bakteriyel hücrelerden çıkan nükleik asitler %1-2 oranlarında bulunmaktadır. Bunun dışında lipidler ve matriksi saran serbest iyonlar da biyofilm yapısında bulunan bileşenlerdendir. Biyofilm matriksi mikroorganizma türüne ve gelişim ortamına bağlı olarak farklı özellikler taşıyabilir. Örneğin, Gram pozitif bakterilerin katyonik yapıda bir matriksi bulunurken; Gram negatif bakterilerde bu yapı nötral ya da polianyonik yapıdadır.

Biyofilm tabakası bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi, birden fazla mikroorganizma türü de bir arada bulunabilir (52, 53).

Biyofilm oluşumu rastgele meydana gelmez. Bu oluşumda, biyofilm içerisindeki bakterilerin türler arası veya türler içi iletişiminde ve değişen çevre koşullarına karşı davranışlarının düzenlenmesinde en önemli mekanizmalardan biri "quorum-sensing" (QS) yani "çoğunluğu algılama" olarak adlandırılan sinyal molekülü aracılı mekanizmadır. QS, düşük molekül ağırlıklı difüze olabilen sinyal moleküllerinin, sensör kinazların aktivasyonu veya regülatör proteine yanıtına dayanmaktadır. Bu mekanizma süreci ile biyofilm içerisindeki bakteri popülasyonunun yoğunluğu hissedilmekte ve bu sayede bulundukları ortama uyum sağlama ve korunma olanağı sağlanmaktadır. Oluşan sinyal, mikroorganizma sayısıyla doğru orantılı olarak artar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, oto-indükleyici moleküllerin lokal konsantrasyonları artar. Bu artış ile, biyofilm oluşumuna yönelik işlemler başlatılmış olur. Bu mekanizma aracılığıyla, bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlemektedir (53). Biyofilmlerde dinamik bir denge söz konusudur. Film içerisinde bulunan bakteriler zaman zaman filmden ayrılabilir ve böylece serbest olarak yaşamlarını sürdürebilirler ya da bu mikroorganizmalar film yapısına katılabilir. Bundan dolayı biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar vücudun farklı kısımlarına yayılabilmektedir (54).

Biyofilmler, cansız veya canlı yüzeylerde oluşabilir. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler en başta yer alır (55). Biyofilmler aynı zamanda, prostetik kalp kapağı, intrauterin araç, kontakt lens, santral venöz kateter, üriner kateter, meme implantı gibi medikal araçlar üzerinde de gelişebilir. Böylece, hasta morbiditesinde ve sağlık bakımı maliyetlerinde artış ile sonuçlanan ve sıklıkla implant kaybına sebep olan biyofilm kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlara da sıklıkla sebep olurlar (56).

Biyofilm oluşumununda etkili bazı faktörler bulunmaktadır. Bunlar yüzey özellikleri, mikroorganizmanın türü ve çevrenin etkileri olmak üzere üç temel başlıkta incelenir. Yüzey özelliklerinin biyofilm oluşumuna etkisi, yüzeyin yapısı, pürüzlülük, hidrofobisite gibi özellikler ile ilişkilidir. Mikroorganizmanın biyofilm oluşumuna etkileri arasında ise mikroorganizmanın türü, sayısı, hücre duvarı yapısı, hücre duvar yükü, EPS yapısı, proteinleri, hidrofobisite ve hareketlilik organelleri yer alır. Biyofilm oluşumunda çevresel etkiler ise pH, sıcaklık, katyon ve iyon konsantrasyonu, besinin içeriği ve miktarı oldukça önemlidir (57,58).

Biyofilm Oluşumu ve Evreleri

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir. Biyofilm oluşumu farklı aşamalara ayrılarak incelenebilir. Birinci aşamada, materyal yüzeyinde, mikrobiyal adezyon için ilk substratı oluşturacak şekilde film birikimi başlamaktadır. İkinci aşamada, organizmalar dönüşümlü olarak substrata bağlanmaktadır. Üçüncü aşamada, sinyal molekülleri aracılığı (QS) ile yeterli çevresel uyarının sağlanması durumunda, organizmalar gen ekspresyonlarında, EPS'nin üretimine ve yüzeye geri-dönüşsüz bağlanmaya olanak verecek temel değişiklikler geçirmektedir. Mikroorganizmalar mikrokoloniler haline dönüşür. Dördüncü aşamada, biyofilm büyüyüp, akışkan faza artırılmış kütle transferine olanak veren sütun ve su kanallarından oluşan karmaşık üç boyutlu yapıya olgunlaşmaktadır. Son aşamada ise, biyofilm içerisindeki bazı organizmalar planktonik gen ekspresyonu yaptıkları durumlarına geri dönerek, biyofilm döngüsünü yeni konumlarda tekrar başlatma potansiyeline sahip olarak, biyofilmi saran çevreye dağılmaktadırlar (50,58). Bu evreler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 4).

Tutunma evresi: Biyofilm oluşumunda ilk olarak bakteriler bir canlı ya da cansız yüzey ile ilişki kurar. Bu aşamada yüzeyin özellikleri önem arz etmektedir. Ardından, planktonik formundaki bakterilerde bir dizi gen regülasyonu devreye girer. Fenotipik ve

metabolik olarak biyofilm oluşturan forma dönmeye başlarlar. Bu aşamada QS mekanizması devreye girer ve yüzeye tutunan her bakteri ortama sinyal molekülleri salgılar. Bu sistem ile çevrede bulunan bakteri popülasyonunun yoğunluğu belirlenir. Yüzeye tutunma işlemi zamana bağlı bir oluşumdur. Öncelikle bakteriler yüzeye dönüşümlü ardından dönüşümsüz olarak tutunur (50,59).

Dönüşümlü olarak tutunma evresi: Bu aşamada bakteri hücresi yüzeye zayıf etkileşimler olan hidrofobik etkileşimler, elektrostatik bağlar ve van der Waals bağları ile bağlıdır. İlk tutunma işleminde hidrofobik etkileşimler oldukça önemlidir. Dönüşümlü tutunma aşamasında, bakteriler yüzeye yakındır fakat yüzeye henüz temas etmemiştir. Bu aşamada yüzey uygun ve ortamda yeterli besin varsa bakteriler yüzeye dönüşümsüz olarak tutunmaya hazırlanır (50,60) (Şekil 5).

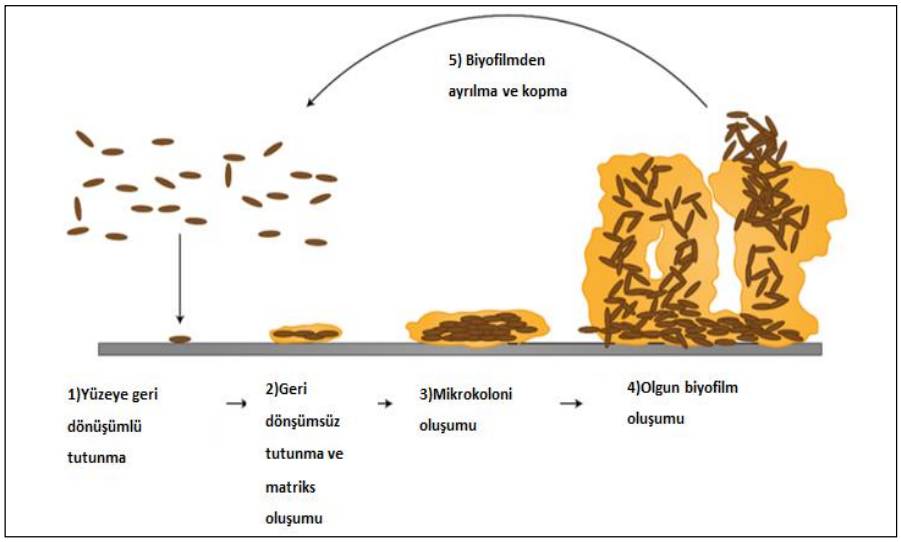
Dönüşümsüz olarak tutunma evresi: Bu evrede yüzeyle kuvvetli etkileşimler olan kovalent bağlar, iyonik bağlar, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri gibi bağlar meydana gelir. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi tutunma organelleri ile EPS oluşturarak yüzeye dönüşümsüz olarak bağlanır. Bu evrede, biyofilm tabakasını yüzeyden uzaklaştırmak için güçlü mekanik kuvvetlere, deterjan, dezenfektan, enzim, sanitizerler ve yüksek ısı gerektiren işlemlere ihtiyaç vardır (50,61).

Yapışma evresi: Yapışma evresi, bakterilerin yüzeye daha kuvvetli olarak tutunma işlemini içeren moleküler mekanizmaları kapsar. Tutunmayı güçlendirmek ve yapışma için çeşitli adezin molekülleri devreye girer. Bu evrede, ortamın pH'sı, yüzey özellikleri, çevresel faktörler ve besin miktarı gibi özellikler önemli rol oynar (61). Biyofilmdeki bakteri ile yüzey arasında bazı fizikokimyasal etkileşimler gerçekleşir. Bu etkileşimler, DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorisi olarak adlandırılan bakteri hücresi yüzey özelliklerine bağlı olan ve termodinamik teoriler olarak bilinen bakteri ve yüzey yapışma enerjisini açıklayan teoriler ile açıklanmaktadır. Bu teorilerde, biyofilmde itici ve çekici güçlerin birbiri ile eşitlendiği belirtilir. Bu güçlerin büyüklükleri, biyofilm içerisindeki mikroorganizma ve bağlandığı yüzeydeki mesafeye ve aradaki iyonik bağlara göre değişmektedir (50,62,63).

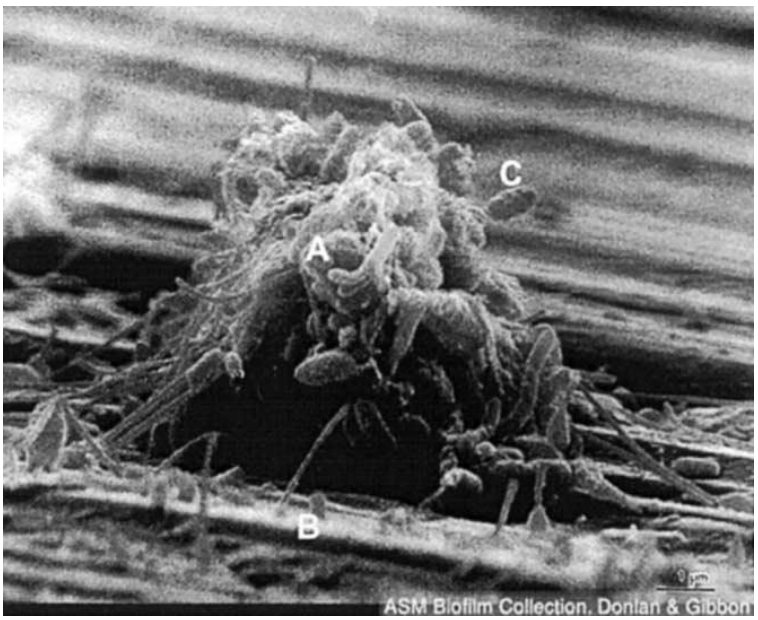
Toplanma evresi: Biyofilmdeki bakteriler mikrokoloniler oluşturur ve EPS ile sarılı olarak bir arada yaşamaya başlar (50,64).

Olgun biyofilm oluşumu evresi: Oluşan mikrokoloniler, daha kompleks yapılar olan apartmana ya da mantara benzer şekilde yapılar oluşturur. Bu yapıların aralarında beslenmenin sağlanması ve atıkların uzaklaştırılması için su kanalları oluşur (50,63).

Biyofilmden ayrılma evresi: Bu aşamada biyofilmdeki bazı bakteriler, koparak dış ortama yayılır. Ayrılma durumu, dış ortam şartlarına bağlı olarak tekli ya da çoklu olarak gerçekleşebilir. Biyofilm matriksinden koparak ayrılan bakterilerin, ayrıldıkları topluluğun tüm direnç karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir (50,64).



Şekil 4. Biyofilmin oluşum evreleri (65)



Şekil 5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile biyofilm oluşumunun mikrografisi A. Oluşmuş olgun biyofilm B. Biyofilm oluşan yüzey ve tutunan bakteri hücreleri C. Biyofilme bağlı bir bakteri hücresi (51)

Biyofilmin Mikroorganizmaya Sağladığı Faydalar

Mikroorganizmalar, biyofilm tabakası oluşturarak, planktonik formlarına kıyasla bir takım avantajlara sahip olurlar (66-71).

Çevresel etkenlere karşı korunma: Biyofilmler, bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri, osmolarite değişimleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Bu tabaka, mikroorganizmalar için bir kalkan görevi görüp, mekanik etkilerden korunmaya da katkı sağlamaktadır (66-71).

Besinlerin alınması ve atıkların uzaklaştırılması: Biyofilm, besinlerin depolanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını da kolaylaştırır. Biyofilmdeki EPS varlığı ve su kanalları, çevreden alınan besinlerin alınmasında ve kullanılmasında kolaylık sağlar (66-71).

Fagositozdan ve bağışıklık sisteminden korunma: Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenerek, bağışıklık sisteminden korunmasını sağlar. Bu nedenle biyofilm, klinik olarak kronik seyirli ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. Tüm bu etkilerin yanısıra, biyofilmden kopan hücreler, planktonik formlarına kıyasla başka yüzeylere daha kolay tutunup, kolayca yayılma özelliğine sahip olmaktadır (66-71).

Yeni genetik özellik kazanımı ve metabolik ortaklık sağlanması: Biyofilmde bulunan bakteriler, dış ortam faktörlerine ve uyaranlarına (besin, ısı, pH vs.) aynı yanıtı verip, benzer fenotipik ve metabolik değişiklikler göstermektedir. Biyofilmin matriksi bakteriler arasında gen transferi ve konjugasyon için uygun bir ortam sağlar. Bakteriler böylece birbirine özellikle direnç genlerini kolaylıkla aktarabilir (66-71).

Antimikrobiyal maddelere karşı direnç: Biyofilm tabakası, antimikrobiyal maddelerin aynı mikroorganizmanın planktonik formuna kıyasla etkisini azaltmaktadır. Bu tabaka mikroorganizmaya, antimikrobiyallere direnç özelliği kazandırır. Kazanılan bu antimikrobiyal direnç, biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda tedavide zorluklara neden olmaktadır. Biyofilm yapısı aynı zamanda dezenfektanlara ve ısıya karşı da koruyucu bir etki göstermektedir (72).

Biyofilm ve Antimikrobiyal Direnç İlişkisi

Biyofilm, enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik etkinliğini güçleştirmektedir. Matriksin fizikokimyasal özellikleri, mikroçevrede ve biyofilmdeki bakterilerde meydana gelen değişiklikler, matriksin antibiyotiği parçalayabilecek enzimlere sahip olması, biyofilmde farklı mikroorganizmaların bulunması gibi birçok etkenin sonucu olarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların öldürülmesi için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonu, planktonik haldeki türdeşlerinin tedavisi için gereken antibiyotik konsantrasyonunun 1000-15000 kat arasında artmaktadır (7, 72-79).

Biyofilmlerin antibiyotik direnci multifaktöriyel olup, farklı mekanizmalar aracılığıyla meydana gelmektedir. Biyofilm kaynaklı antibiyotik direncinde temel sorun, kullanılan antimikrobiyal molekülün biyofilmin tüm katmanlarına penetre olamamasıdır. Biyofilm matriksinin kimyasal ve fiziksel özellikleri ve EPS'ler, antibiyotiklerin difüzyonunu güçleştirmekte olup; yeterli konsantrasyonun bakteriye ulaşmasını engellemektedir. Antibiyotik penetrasyonunu engelleyen mekanizmalardan biri de, negatif elektriksel yüklü biyofilm matriks polimerlerinin, pozitif elektriksel yüklü antibiyotik ilaçlar ile etkileşiminin bozulması olup, antibiyotik difüzyonu olumsuz etkilenmektedir. Antibiyotiğin biyofilme düşük penetrasyonu sonucu, antibiyotiğin subinhibibör konsantasyonun etkisi ile bakterilerde direnç gelişimi tetiklenmektedir (73).

Biyofilmin katmanlarında oksijen konsantrasyonu, besin maddelerinin yoğunluğu, pH gibi faktörler değişkenlik gösterebilir. Oksijen konsantrasyonunun biyofilmin alt katmanlarında düşük olması bu ortamda anaerobik-mikroaerofilik ortam oluştur. Bu durum, aminoglikozid grubu antibiyotiklerin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Buna benzer olarak biyofilmin katmanlarındaki metabolik atıkların birikimi pH değişimlerine neden olarak antibiyotik etkinliğini düşürmektedir (74).

Biyofilm kaynaklı antibiyotik direncinde önemli nedenlerden biri de biyofilmde, farklı büyüme fazında olan bakteriler bulunmasıdır. Besin kullanımına bağlı olarak, bazı bakteriler biyofilm içinde yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalır. Bu noktada, kullanılan antibiyotik bu fazdaki bakterilere etki göstermemektedir (75). Diğer bir etken ise, biyofilm içeriğinin bakteriler arası gen transferleri için uygun bir ortam sağlamasıdır. Bakteriler böylece birbirine antibiyotik direnç genlerini aktarır ve ortak metabolik yollar kullanarak antibiyotik etkisinden kendilerini korurlar.

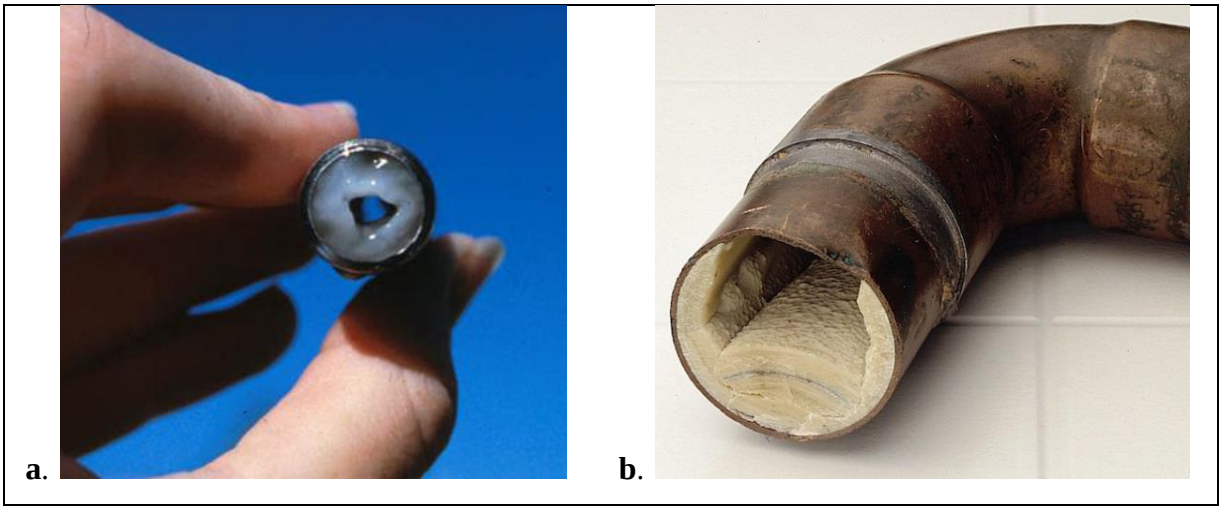
Persistan bakteri yaklaşımı da biyofilm direncinde önemli bir yaklaşımdır. Biyofilmdeki persistan bakteriler, yüksek konsantrasyon antibiyotik kullanımı sonrasında dahi canlılıklarını koruyabilir ve tekrarlayan kronik seyirli enfeksiyonlara neden olabilirler (76).

Son yıllarda antibiyotik direncini kırma ya da farklı mekanizmalarla bakteriyel üremeyi ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonu engelleme konusunda yapılan çalışmalar, bakterilerin QS özelliklerini baskılama ya da değiştirmeleri üzerinden bir yol izlenebileceğini düşündürmüş ve önemli bir beklenti yaratmıştır. Aynı zamanda, biyofilm mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı da konakçı çevreye mikrobiyal adaptasyonu önlemek için umut veren bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde, birçok molekülün antibiyofilm aktivitesi araştırılmaktadır (77-79).

Biyofilmin İnsan Sağlığına Etkileri

Biyofilm, insan sağlığı açısından ciddi sorunlara neden olmaktadır. Endüstriyel alanlarda da olumsuz etkiler yaratarak ekonomik kayıplara neden olurlar. Biyofilmler, sanayide ürün kontaminasyonları ve alet yüzeylerinde, teçhizatlar üzerinde (boru tıkanması, su kirliliği ve su hatlarında tıkanma vb.) hasarlara neden olarak sermaye ve enerji kaybına neden olmaktadır (Şekil 6) (80-84).

Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda, biyofilmler oldukça etkilidir. Gıda endüstrisinde önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle süt, et, tavuk ve deniz ürünlerinin depolama tanklarında ve ambalaj materyalleri üzerinde biyofilm oluşumu sıklıkla gözlenmektedir. Mikroorganizmalar, çelik, ahşap, cam, teflon, plastik, naylon gibi birçok yüzeyde biyofilm oluşturabilir. Aynı zamanda, yüzeylerdeki çatlak ve yarıklarda yüzeye daha kolay tutunmakta, mekanik temizlemelere rağmen biyofilm yapılarını korumaktadır (85-89).



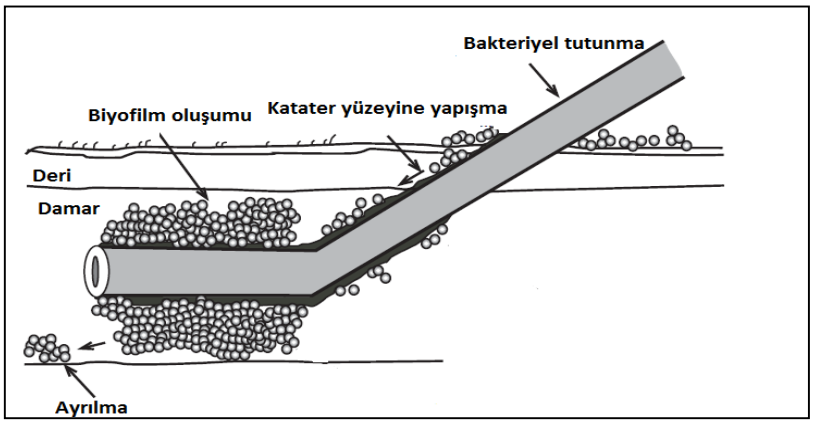
Şekil 6. Biyofilmin çeşitli teçhizatlar üzerinde neden olduğu hasarlar a. Çelik boru yüzeyindeki biyofilm (8) b. Su borularında sebep olduğu tıkanmalar (90)

Tüm enfeksiyon hastalıklarının en az %65'i biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile ilişkilidir. Klinik öneme sahip pek çok Gram pozitif, Gram negatif bakteri ve mantarlar biyofilm oluşturur (4). Yapılan çalışmalarda, nozokomiyal enfeksiyonların büyük bir kısmında biyofilm yapan mikroorganizmaların etkili olduğu ortaya konmuştur. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavi zorluğu ve tedavi süreçlerinin uzamasından kaynaklanan giderlerin artması da sağlık sektöründe karşılaşılan bir diğer sorundur. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada cerrahi operasyonlarda protez değişim nedeninin %2'sinin biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar olduğu gösterilmiştir (91).

Biyofilm yapan mikroorganizmalar klinik olarak en sık otitis media, kistik fibrozis, doğal kapak endokarditi, periodontit ve yabancı cisim enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Tablo 4) (92). Protez yapılar, implantlar, santral venöz kataterler, ortopedik ve üriner sistem kataterleri, intrauterin aletler, kontaks lens gibi medikal cisimlerde biyofilm kaynaklı klinik tablolara neden olurlar (Şekil 7). Biyofilm yapısının neden olduğu enfeksiyonlarda farklı mekanizmaların etkili olduğu belirtilmektedir. Bu mekanizmalardan biri, özellikle kateter enfeksiyonlarında, biyofilmden kopan hücre yapılarının dolaşıma katılarak yeni enfeksiyonlara neden olmasıdır. Bir diğer mekanizma, Gram negatif bakterilerin neden olduğu biyofilm enfeksiyonlarında endotoksin üretiminin daha fazla gözlenmesidir. Bu durumda konakta daha fazla immün yanıt oluşmakta ve enfeksiyonun şiddeti bununla doğru orantılı olarak artmaktadır (93). Biyofilmler yapıları itibariyle konak bağışıklık sistemine yapısal direnç göstererek ve bakterileri fagositozdan koruyarak, enfeksiyon varlığını devam ettirir ve kronik seyirli enfeksiyonlara neden olur. Biyofilmin neden olduğu antibiyotik direnci de tedavide sorun oluşturmaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarında bakteriler birbirine plazmidler aracılığıyla direnç genlerini aktarmaktadır. Bu nedenle özellikle bu hastalarda antibiyotik konsantrasyonlarının biyofilm yapılarına göre ayarlanması ve antibiyofilm aktivitesine sahip takviye moleküllerin kullanımı gibi düzenlemeler yapılması önem arz etmektedir. Bu durumların göz ardı edilmesi bu enfeksiyonların tedavilerinde biyofilm varlılığının devam etmesine neden olarak, tedavi sürecini zora sokmaktadır (94).

Tablo 4. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ve etken mikroorganizmalar (78,95,96)

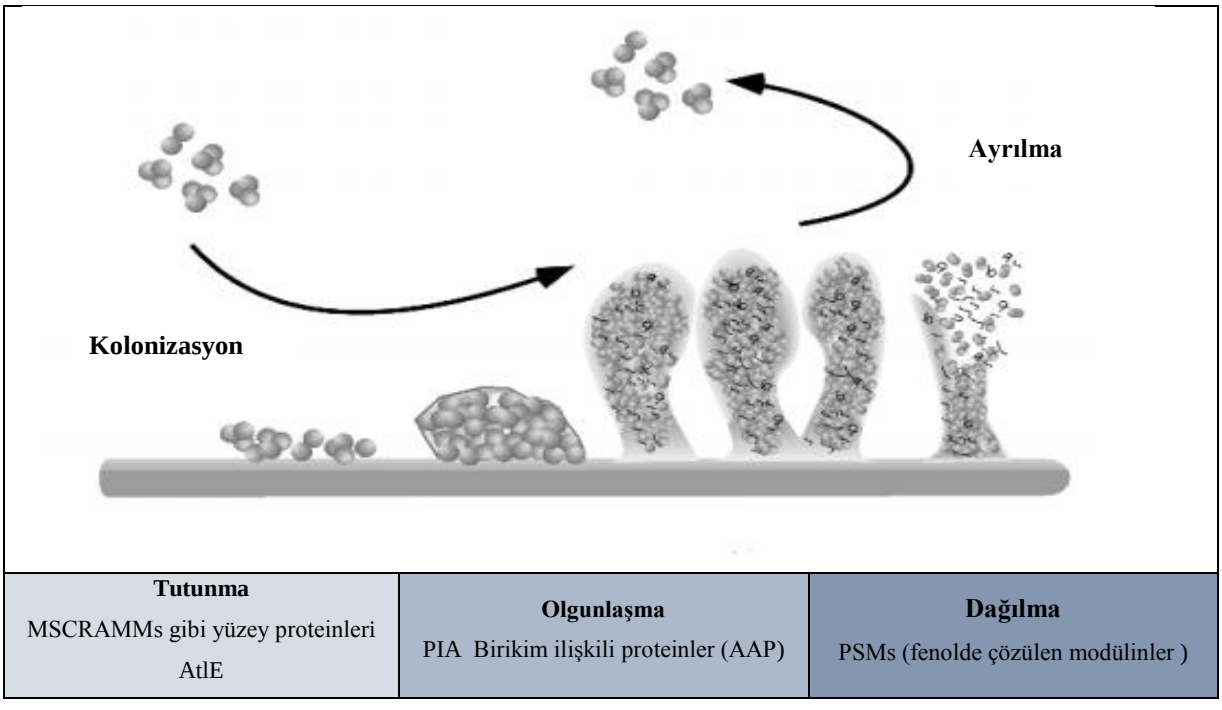
Enfeksiyon veya hastalık	Mikroorganizma etkenleri
Dental plaklar ve periodontit	*Streptococcus sangui, Prevotella intermedia, Actinobacillus, Candida albicans*
Otitis media	Non-tipik *Haemophilus influenzae*
Osteomiyelit	Çeşitli bakteriyel ve fungal türler-genelde karışık olarak
Kaslar, iskelet enfeksiyonları	Gr (+) koklar (*Staphylococcus* spp.)
Kronik tonsillit	Değişik türler
Kistik fibrozis pnömonisi	*P. aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia*
Bakteriyel prostatit	*E. coli* ve diğer Gr (-) bakteriler
Nekrotizan fasiit	Grup A streptokoklar
Enfeksiyöz böbrek taşları	Gr (-) basiller
Yapay kalp kapakçığı (endokarditis, septisemi)	S. *epidermidis, S. sanguis, S. aureus* (diğer koagülaz (-) *Staphylococcus sp.)*
Üriner kateter enfeksiyonları (bakteriüri)	*E. coli, P. aeruginosa, E. faecalis, Proteus mirabilis, Candida* spp.
İntravasküler kateterler (septisemi, endokarditis)	*S. epidermidis, S. aureus*, Gr (-) bakteriler
Merkezi venöz kateterler (septisemi)	*S. epidermidis* ve diğerleri (koagülaz (-) *Staphylococcus sp.*), *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae, P. aeruginosa, C. albicans*
Hickman kateterleri	*S. epidermidis, C. albicans*
Ortopedik aletler (septisemi)	*S. epidermidis, S. aureus*, Peptokoklar, Streptokoklar, Gr (-) bakteriler, *Propionibacterium acnes*
Endotrakeal tüpler (pnömoni)	*P. aeruginosa, E. coli, S. epidermidis, S. aureus*, farklı bakteri ve funguslar
Yoğun bakımda pnömoni	Gr (-) basiller
Penis protezleri	S. *epidermidis, S. aureus*
Yapay ses telleri	*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp.



Şekil 7. Stafilokokların intravasküler medikal cihazlarda biyofilm oluşturma modeli (9)

STAFİLOKOKLARLARDA BİYOFİLM OLUŞUMU

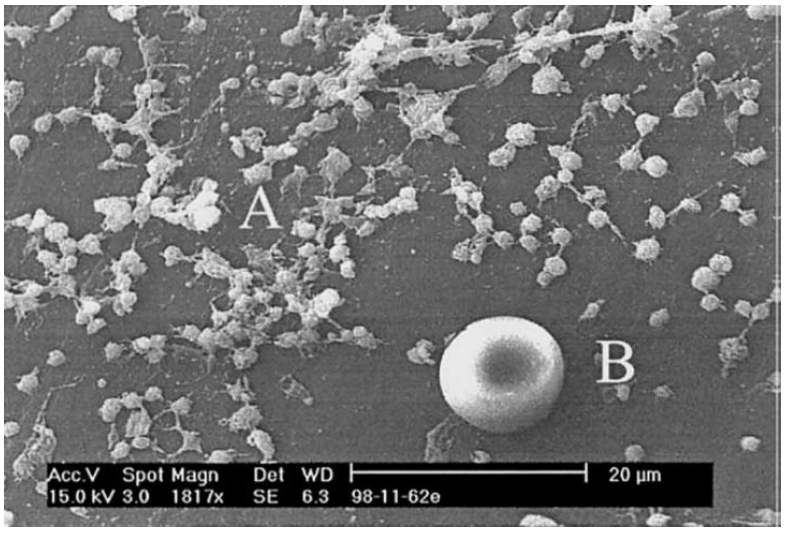
Bakteriyel biyofilmlerin, endokardit, otitis media, kistik fibrozis ve yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere birçok enfeksiyonda etkili olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşumu, stafilokoklar için önemli bir virülans faktörüdür. Stafilokoklarda biyofilm oluşum mekanizmasında etkili birçok gen ve molekül bulunmaktadır (Şekil 8). Yapılan çalışmalarda, bu bakterilerin biyofilm oluşumunda iki önemli aşama bulunduğu saptanmıştır (97-101). Stafilokokkal biyofilmde ilk aşamada, yüzeye erken aderanstan sorumlu yüzey proteinleri ve adezinler görev alır. Bu proteinler yüzeye tutunmadan ve yapışmadan sorumludur. *S. aureus*'ta bu proteinler MSCRAMMs olarak tanımlanan yüzey proteinleridir (98). Bu yüzey proteinleri yardımıyla mikroorganizma, yabancı maddelerin yüzeylerine veya konak doku ligandlarına tutunur (99). Bu yüzey proteinlerinin çeşitliliği, konaktaki matriks proteinleri, fibrinojen, fibronektin, kollajen gibi farklı yapılara ve hücrelere bağlanmada etkilidir (100-102). Stafilokoklarda birincil bağlanmada etkili bazı yüzey proteinleri şunlardır: kollajen bağlayan protein (cna) (103), fibrinojen bağlayan protein a ve b (fnba ve fnab) (104,105), fibrinojen bağlayıcı protein (fib), laminin bağlayıcı protein (eno), elastin bağlayıcı protein (ebpS), clumping factörler A and B (clfA – clfB) (106), kemik siyaloprotein bağlayıcı protein (bbp) (107). Bu farklı yüzey proteinleri ile stafilokoklar farklı dokularda biyofilm kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (108).



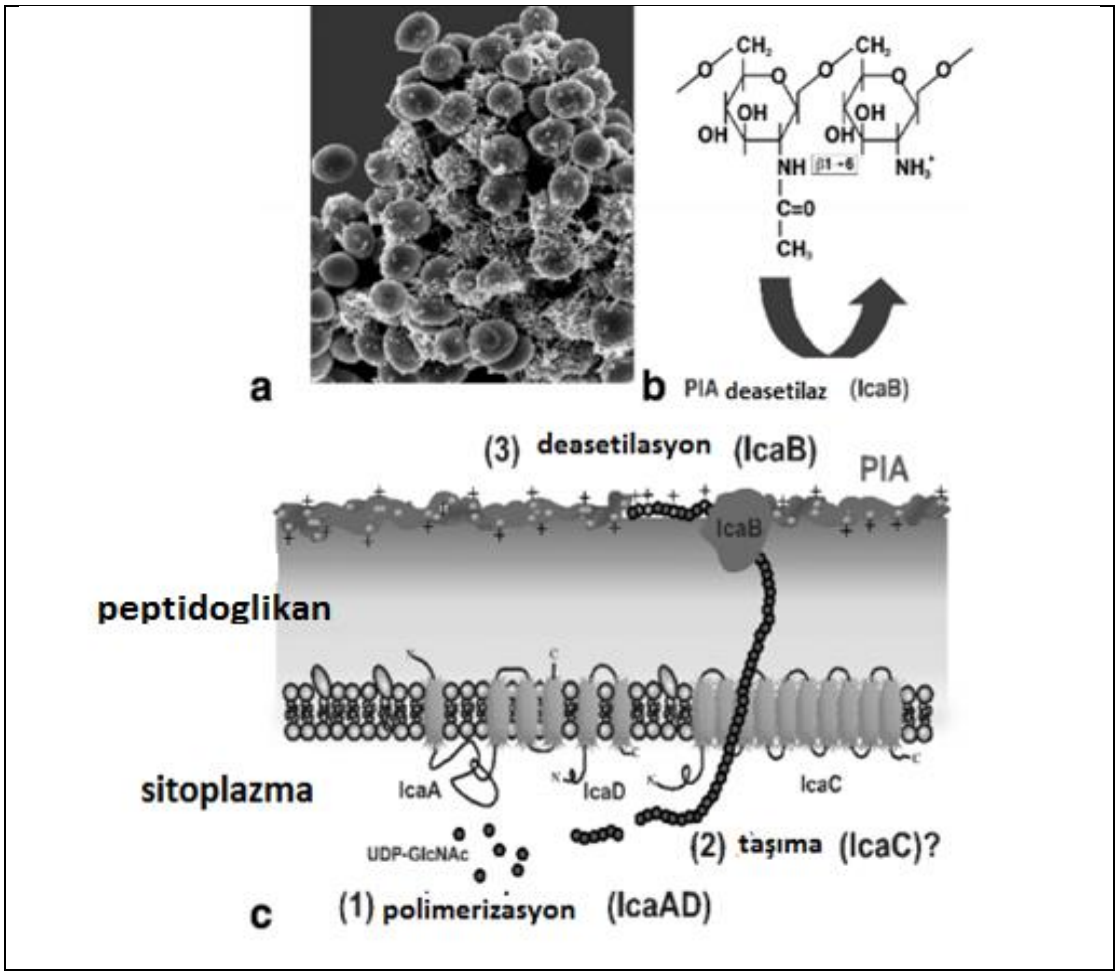
Şekil 8. Stafilokoklarda biyofilm oluşumu ve bu evrelerde görevli proteinler (97)

Hücre duvar yapısında bulunan TE de stafilokoklarda primer yapışmada etkili rol oynar (108). *S.epidermidis*'in tutunmasını etkileyen bir diğer önemli faktör otolizin AtlE'dir. Bu yüzey molekülleri konakta bulunan doku ligandlarına ve katı yüzeylere tutunmada kritik rol oynar (108,109).

İkinci aşama ise bakteriyel hücre birikimi ve çok tabakalı biyofilm aşamasının başlaması ve olgun biyofilm oluşumudur (Şekil 9) (110,111). Biyofilm oluşumunun ikinci evresi için kapsüler polisakkarit adhezin (PS/A) ve polisakkarit intersellüler adhezin (PIA) olarak adlandırılan ekstrasellüler polisakkarit üretimi gereklidir. PS/A ve PIA yapısal olarak ortak β-1-6-glukozamin omurgasına sahiptir fakat amino grupları yönünden farklılık göstermektedir (112). Özellikle PIA, biyofilmin ana komponentini oluşturmaktadır ve sentezi biyofilmin olgunlaşması ve hücre agregasyonu için önemlidir. PIA, *ica* gen lokusu tarafından üretilen β-1,6 glukozid bağlarıyla bağlanmış, %10-20 oranında deasetilasyona uğramış N-asetilglukozamin kalıntılarının dallanmamış poli-N-asetil-beta-1-6‑glukozamin (PNAG) homopolimeridir (Şekil 10) (112,113). Yapılan bazı çalışmalarda, *ica* gen lokusunda meydana gelen mutasyonların *S. epidermidis*'deki biyofilm oluşumunu durdurduğu bildirilmiştir (109). Ayrıca PIA'nın hücre yüzeyine tutunmasında görev yapan çeşitli proteinler de bu aşamada görev yapmaktadır (114). Bunlardan bir tanesi olan Accumulation Associated Protein (AAP) biyofilm oluşumunda önemli role sahiptir. AAP, hücreler arası birikim ve bağlanmada etkili olan bir proteindir. Bu yapılar hücreler arası bağlanmada ve biyofilm matriksinin oluşmasında oldukça önemlidir (115,116).



Şekil 9. Stafilokoklarda biyofilm oluşumunun SEM görüntüsü görüntüsü A. Biyofilm oluşturmuş bakteriler B. Eritrosit (51)



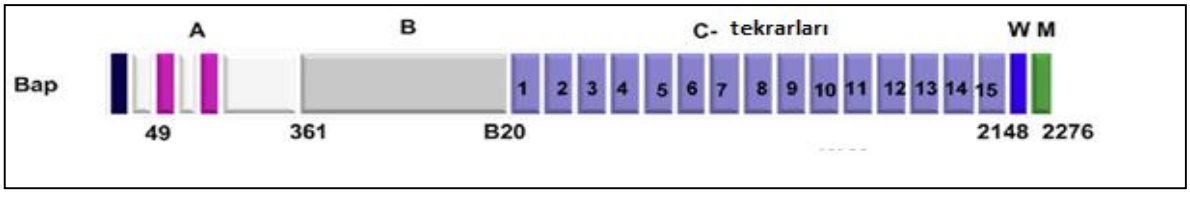
Şekil 10. Stafilokoklarda PIA yapısı ve sentezi a. PIA yapısının SEM görüntüsü, b. PIA'nın kimyasal yapısı, c. PIA'nın sentez aşamaları (1. Polimerizasyon 2. Sentez sonrası hücre duvarına taşıma 3. PIA deasetilaz enzimi ile deasitilasyon) (97)

Stafilokoklarda biyofilm oluşumunda, en etkin mekanizma *ica* aracılı biyofilm oluşumundan sorumlu *icaADBC* operonudur (117-122). Bu mekanizma ilk kez *S. epidermidis* suşlarında gösterilmiştir (123). Bu operonda bulunan genlerin kodladığı enzimler tarafından, PIA ve PNAG olarak bilinen hücre dışı adhezin polisakkariti gibi moleküller sentezlenir. Bu moleküller biyofilmin ana komponentini oluşturur. PIA, stafilokokların en önemli biyofilm molekülü olup, hücreler arası agregasyonu sağlarken; PNAG ise biyofilm matriksinin ana komponentlerinden biridir (121). *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakteri türlerinin ikisinde de *icaADBC* operonu bulunur. Bu operondaki en önemli iki gen *icaA* ve *icaD* genleridir. *icaA* geni, PIA üretiminden sorumlu olan N-asetilglukozaminil transferaz enziminin sentezinden sorumludur. *icaD* geni ise, kapsüler polisakkaritin ifadesinden sorumlu olan N-asetilglukozamiltransferaz enziminin maksimum ekspresyonda çalışmasında etkilidir (124). Ayrıca, bu iki genin birlikte aktivasyonu, glukoz oligomerleri olan üridin difosfat N-

asetilglukozaminin sentezinde rol oynar (125). *icaA* geni tek başına düşük ekspresyon gösterirken, *icaD* geni varlığı ve etkisi ile enzim aktivitesinde ve sentezlenen oligomerlerin sayısında belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir. *icaC* geni biyofilmde sentezlenen oligomerlerin uzatılmasında deasitilasyon basamağında görev yapar. Biyofilmdeki PIA'ya karşı oluşan antikor tarafından tanınan in vitro bir ürün üretir ve hücre duvarına taşınmasında etkilidir (126,127). *icaB* geninin ise deasitilasyon ve sentez basamağında katalizör bir görev yaptığı düşünülmektedir ve hücre duvarında sentezlenen PIA'nın biyolojik işlev kazanmasında etkili olduğu düşünülmektedir (128-130). Bu operonda *icaR* geni varlığı da bildirilmiştir. Bu genin işlevi tam olarak aydınlatılmasa da; PIA sentezi için diğer genlerin ekspresyonu için düzenleyici işlev yaptığı düşünülmektedir (131). *S. epidermidis* türü bakterilerin biyofilminde *ica* lokusun klinik önemi oldukça fazladır. Bununla birlikte *S. aureus* bakterilerinde de klinik izolatların çoğunda bulunduğu bildirilmiştir (130,138).

Stafilokokkal biyofilm gelişiminde *icaADBC* lokusunun dışında *ica* bağımsız moleküler yolakların varlığı da ortaya konmuştur (139,140). Bu mekanizmaların temelinde hücre yüzey adezinlerinin matrikse bağlanmasındaki farklılıklar ve farklı biyofilm proteinleri etkilidir (140). Bu mekanizmalardan en önemlisi ve en iyi aydınlatılmış olanı, biyofilm ilişkili proteinin (*bap*) sentezidir. Bu protein, ilk kez *S. aureus* sığır mastitis V329 izolatında tanımlanmış ve çalışılmıştır (139). *bap* proteini bakteri yüzeyinde bulunan tekrarlayan karbon domainlerinden oluşan 2276 aminoasit içeren bir proteindir (Şekil 11). Bu biyofilm proteini özellikle cansız yüzeylere yapışmada, hücre birikimi ve matriks oluşumu basamaklarında görev yapmaktadır. Biyofilm, ilk oluşum basamaklarında, *bap* geni tarafından sentezlenmektedir. Özellikle hayvanlarda etkili izolatlarda varlığına sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durum, konaklarda ve yüzeylerde biyofilm oluşurken farklı proteinlerin ve yolakların etkili olabileceği fikrini desteklemektedir. Yapılan çalışmalarda, bu proteinin özellikle abiyotik yüzeylere yapışma ve intersellüler adezyon aşamalarında görev yaptığı gösterilmiştir.

S .epidermidis türü bakterilerde, *bap* geninin homoloğu, *bhp* (hücre duvarı ile ilişkili biyofilm proteini) geni ve proteinidir. Bu protein, 2402 aminoasitten oluşup, *S. aureus*'taki *bap* proteini ile benzer yapıda olup, benzer işlevi görmektedir (139,140).



Şekil 11. Stafilokoklarda *bap* proteinin yapısı

Yapılan çalışmalarda, stafilokoklarda *bap* geni bulunma sıklığı *ica* operonuna göre daha az saptanmıştır. Bu genin, özellikle hayvansal kaynaklı enfeksiyonlarda ve cansız yüzeylerdeki biyofilmlerde etkili olduğu bulunmuştur (141).

sarA (*Staphylococcus* yardımcı düzenleyici protein A) geni, *bap* geni için bir aktivatör ve *bap* aracılı biyofilm oluşumunda arttırıcı etkisi olan bir regulatör olarak işlev görmektedir (142). Özellikle MRSA suşlarında, *sarA* geninin mutasyonunun biyofilm oluşum kapasitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (143).

Stafiloklarda biyofilmden ayrılma evresinde ise agr sistemi rol oynamaktadır (143). Biyofilmin sentezinde ve biyofilmden ayrılma aşamalarında molekül sinyaller ya da oto indükleyiciler, agr lokusu tarafından sentezi düzenlenen *AgrD* peptidi gibi otoindükleyici peptidler (AIP) etkili rol oynar. Bu aşamada ayrıca, fenolde çözülen modülinler (PSM) ve proteaz enzimleri düzenleyici etkilidir (144).

N-ASETİLSİSTEİN (NAC) VE BİYOFİLME ETKİSİ

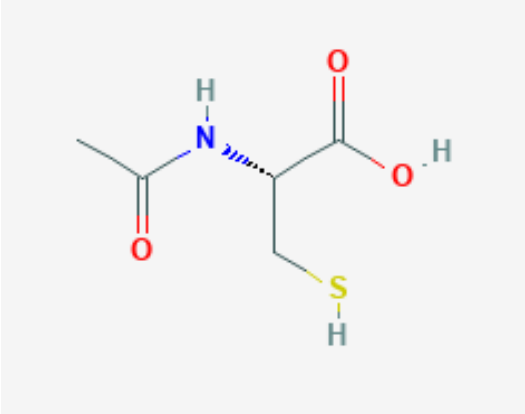
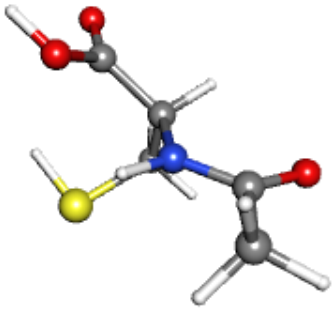
N-asetilsistein ve Yapısı

N-asetilsistein (NAC), tiyol bileşiği yapısında, L-sistein aminoasitinin N-asetillenmiş bir türevi olup, glutatyon öncüsü bir moleküldür. NAC, antioksidan ve mukolitik özelliklere sahip bir moleküldür (Tablo 5). Yapısındaki sülfidril gruplarının etkisi ile serbest oksijen radikallerini nötralize etme özelliğine sahiptir. NAC, hücreye girdikten sonra deasitilasyona uğrayarak, glutatyon molekülünün öncüsü olan L-sisteine dönüşmektedir. Glutatyon hücre içi redoks tepkimelerinde önemli bir molekül olup, hücreyi oksidatif stresten korur (145,146).

NAC, diğer sistein türevlerine göre daha az toksik oluşu, oksidasyon duyarlılığının daha az olması ve suda çözünme özelliği ile daha avantajlıdır. NAC, insanda önemli bir sistein kaynağıdır ve bu nedenle glutatyon sentezi için sistein sağlayıp, karaciğerde glutatyona dönüşürek sistemik dolaşıma karışır. Bu özelliği ile önemli bir antioksidandır. İlaç sektöründe intravenöz ve oral tablet formları, avantajlı özellikleri ve düşük yan etki profili ile farklı alanlarda kullanılmaktadır. NAC, pratik uygulamada en çok mukolitik olarak kullanılır. Yapısında bulunan sülfidril grupları, balgamın glikoproteinleri arasındaki disülfid bağlarını kırar ve depolimerizasyona neden olur (147). Bununla birlikte antioksidan, antienflamatuvar, endotelyal korumada, yüksek doz parasetamol tedavisinde de kullanımı mevcuttur. Antioksidan ve nükleofilik özellikleri ile apoptotik süreci baskıladığı ve redoks potansiyal dengesini koruduğu düşünüldüğü için kanser tedavilerinde de kullanımı mevcuttur. Antiinflamatuvar etkisi, pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını önleyerek ve lökosit

adezyonunu azaltarak meydana gelmektedir. Ayrıca, kemik rezorpsiyonunu önlediği için çeşitli dental ve kemik doku uygulamalarında kullanılmaktadır (147,148).

Tablo 5. NAC'ın Uluslararası İlaç Kütüphanesi bilgileri (148)

PubChem CID	12035
Kimyasal Yapısı	
 İki boyutlu yapısı	 Üç boyutlu yapısı
Kimyasal güvenlik	 Irritant Laboratory Chemical Safetmmary (LCSS) Datasheet
Moleküler Formül	$C_5H_9NO_3S$
Moleküler Ağırlık	163,191 g/mol

NAC ve Biyofilme Etkisi

Son yıllarda antibiyotik direncini kırma ya da farklı mekanizmalarla bakteriyel üremeyi ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonu engelleme konusunda yapılan çalışmalar; QS özelliklerini baskılama ya da değiştirmeleri üzerinden bir yol izlenebileceğini düşündürmüş ve önemli bir beklenti yaratmıştır. Aynı zamanda, biyofilm mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı da konakçı çevreye mikrobiyal adaptasyonu önlemek için umut veren bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde, birçok molekülün antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi araştırılmaktadır. Bu moleküllerden birisi de NAC molekülüdür (149,150).

NAC; antimikrobiyal etkilere sahip bir bileşiktir. Bu özelliğiyle, NAC antimikrobiyal direnç çalışmalarında alternatif bir farmakolojik yaklaşıma neden olmuştur (150). NAC'ın yapısındaki sülfür grupları bakterilerin yüzeye adezyonunu azaltmakta ve ayrıca yüzeye yapışmış bakterilerin de ayrılmasında etkili olduğu belirtilmektedir (151-153). İlk kez 1977'de yapılan in vitro bir çalışmada, NAC'ın değişik konsantrasyonlarının hem Gram negatif bakterilerde hem de Gram pozitif bakterilerde doza bağlı olarak büyümeyi engellediği bildirilmiştir (MİK 2-20 μg/mL) (149). Oosterhof ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da doza bağlı olarak bakteriyel büyümede inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (8). NAC, moleküler olarak küçük bir yapıda olduğu için biyofilm içerisine penetrasyonu kolaydır ve biyofilm içerisindeki bakteriyal hücrelerin açığa çıkmasını ve kullanılan antibiyotiklerin biyofilm içine işlemesini kolaylaştırmaktadır (154).

NAC'ın biyofilm üzerine etkisi ilk defa *S. epidermidis* üzerinde gösterilmiştir. *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, S. epidermidis* ve *S. aureus* gibi, Gram negatif ve Gram pozitif bakteri biyofilmlerini etkili bir şekilde azalttığı da in vitro çalışmalarda rapor edilmiştir (154-161).

NAC'ın etki mekanizması temel olarak; ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltıp, olgun biyofilmin yapısını bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak gerçekleşir (160,161). Ekstrasellüler polisakkarit yapımı sırasında NAC'ın disülfidril köprüleri açılır ve biyofilm bütünlüğü olumsuz olarak etkilenir. İn vitro çalışmalar, NAC'ın umut verici şekilde antibiyofilm aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. NAC'ın antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesini oluşturan mekanizmalar tam olarak bilinmemesine rağmen, biyofilm ile ilgili enfeksiyonların tedavisinde yararlı olacağı düşünülmektedir (Tablo 6) (8, 146, 149-178).

NAC'ın antimikrobiyal aktivitesinin anlaşılması için bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlar; i) sistein kullanımının rekabetçi inhibisyonu, ii) NAC sülfidril grubunun bakteriyel proteinlerle reaksiyonu, iii) dolaylı etkilerle hücre içi redoks dengesinin bozulmasının hücre metabolizması ve hücre içi sinyal iletim yolları üzerinde etkisi şeklindedir. NAC, antibiyofilm stratejileri arasında yer alan önemli bir moleküldür (160). Buna ek olarak, NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltmakta etkili olduğu da bilinmektedir (160-163).

NAC'ın mikrobiyal aktivitelere karşı çok faktörlü etkisi, antibiyofilm çalışmalarındaki olumlu etkisi ile biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için umut verici bir moleküldür.

Bu kapsamda, bu molekülün biyofilm etki mekanizmalarının saptanması ve farklı çalışmalar ile doğrulanması büyük önem taşımaktadır.

Tablo 6. Bakteriyel ve fungal patojenlere karşı NAC'ın antibiyofilm aktivitesini gösteren in-vitro çalışmalar (146)

Çalışılan mikroorganizma	Referans çalışma	Test edilen NAC konsantrasyonu (µg/mL)
Escherichia coli	El Feki ve ark., 2009 [167]	2000 ve 4000
	Marchese ve ark., 2003 [168]	70-8000
Klebsiella pneumoniae	Mohsen ve ark., 2015 [169]	2500
	Aslam and Darouiche ve ark., 2011 [158]	80000
	El Feki ve ark., 2009 [167]	2000 ve 4000
	Aslam ve ark.., 2007 [151]	80000
	Olofsson ve ark., 2003 [8]	250-2000
Enterobacter cloacae	Aslam and Darouiche ve ark., 2011 [158]	80000
	Olofsson ve ark., 2003 [8]	250-2000
Proteus spp.	Mohsen ve ark., 2015 [169]	2500
	El Feki ve ark, 2009 [167]	2000 ve 4000
Pseudomonas aeruginosa	Mohsen ve ark., 2015 [169]	2500
	Lea ve ark., 2014 [161]	12500
	Drago ve ark., 2013 [170]	3000-24000
Pseudomonas aeruginosa	Aslam and Darouiche ve ark., 2011 [158]	80000
	Zhao ve ark., 2010 [155]	500-10000
	El Feki ve ark., 2009 [167]	2000 ve 4000
Pseudomonas mendocina	Olofsson ve ark., 2003 [8]	250-2000
Acinetobacter baumannii	Olofsson ve ark., 2003 [8]	250-2000
Prevotella intermedia	Moon ve ark., 2015 [171]	375-3000
Staphylococcus aureus	Mohsen ve ark., 2015 [169]	20000
	Drago ve ark., 2013 [170]	6000-24000
	Aslam and Darouiche ve ark., 2011 [158]	80000
	El Feki ve ark., 2009 [167]	2000-4000
	Aslam ve ark., 2007 [151]	80000
	Roveta ve ark., 2004 [172]	8000
	Bozzolasco ve ark., 2002 [173]	7-8000
Staphylococcus epidermidis	Leite ve ark., 2013 [174]	4000-40000
	Kirmusaoglu ve ark., 2012 [175]	30-2000
	Gomes ve ark., 2012 [157]	4000 ve 40000
	Aslam and Darouiche ve ark., 2011 [158]	80000
	El Feki ve ark., 2009 [167]	2000 ve 4000
	Venkatesh ve ark., 2009 [176]	500-32000
	Aslam ve ark., 2007 [150]	80000
	Perez-Giraldo ve ark., 1997 [149]	30-8000
Enterococcus faecalis	Quah ve ark., 2012 [177]	12500-50000
Candida albicans	El-Baky ve ark., 2014 [178]	312-40000
	Venkatesh ve ark., 2009 [176]	500-32000

ANTİBİYOFİLM AKTİVİTE TESTLERİ

Biyofilm oluşumunu saptamada sıklıkla kolorimetrik yöntemler kullanılır. Kullanılan yönteme ve mikroorganizma türüne göre inokulum miktarı, besiyeri, inkübasyon koşulları değişebilmektedir. Bu durum yöntemlerin uygulanmasında modifikasyonları beraberinde getirmekte ve yöntemlerin standardizasyonuna gereksinim duyulmaktadır. Biyofilm saptamada en sık kullanılan yöntemler, kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi) ve mikroplak yöntemidir (Tablo 7). Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitenin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemler, floresan mikroskobisi, konfokal lazer tarama mikroskobisi ve elektron mikroskobisi gibi mikroskobik yöntemler ve biyofilm genlerinin tarandığı moleküler yöntemlerde mevcuttur. Heterojen yapıdaki biyofilmlerin taranmasında floresan in-situ hibridizasyon yöntemi ve kateter gibi medikal cihaz yüzeylerinde oluşan biyofilm yapılarının incelenmesinde rulo plaka yöntemi de tercih edilir (179).

Tablo 7. Biyofilm tespitinde kullanılan yöntemler ve amaçları

Method	**Amacı**
Tüp Metodu	Tüpün dibine ve duvarlarına kaplı biyofilmi gözlemleyerek kalitatif tespit
Kongo Red Agar	Koloni rengi değişimini gözlemleyerek kalitatif tespit
Mikroplak Metodu	Mikroplaka okuyucusu (microELISA) ile biyofilm miktarının tayini
Real-Time PCR	Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin taranması
Konvansiyonel PCR	
Multipleks PCR	

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin standartları, Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI) (180) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST) (181) gibi kuruluşların yayınladığı rehberler ile sağlanmıştır. Fakat mikroorganizmaların biyofilm oluşturmuş halleri (sesil formları) için uygulanan standart bir antibiyofilm aktivite testi bulunmamaktadır. Bu kapsamda yapılan yeni çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Kullanılan antibiyofilm aktivite testlerinde iki temel yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi, üretilmiş ya da üretilecek olan antibiyofilm ajanın, biyofilm oluşumundan önce muamele edilmesiyle biyofilm oluşumunun ne kadar engellediğinin saptanması, ikincisi ise araştırılacak ajanın oluşan biyofilmi ne kadar yok ettiğinin saptanmasıdır. Birinci yaklaşım

ile minimum biyofilm inhibitör konsantrasyonu (MBİK); ikinci yaklaşım ile ise minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) saptanabilmektedir. Her iki konsantrasyonu belirlemek için de aşağıdaki yöntemler kullanılır (182, 183).

XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid) Yöntemi

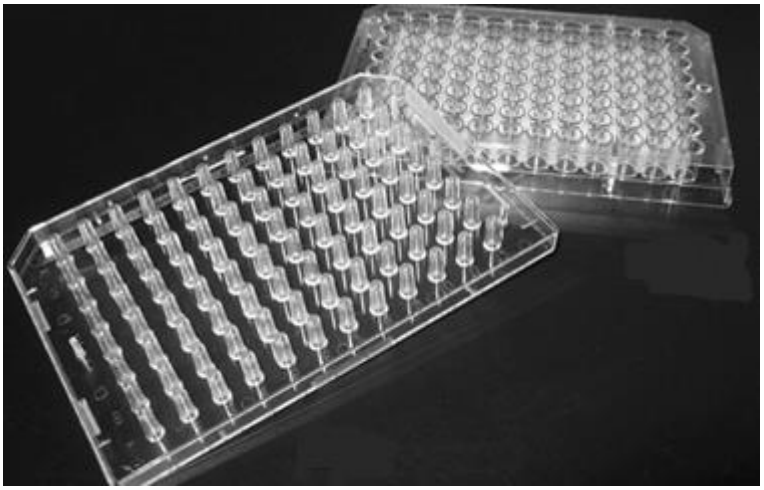
XTT, kolorimetrik temelli bir yöntemdir. Bu yöntemde, 96 kuyucuklu mikroplakta biyofilm oluşturulur. Antibiyotiğe maruz kalan biyofilm yıkanarak planktonik formlar uzaklaştırılır. Her kuyucuğa XTT ve fenazin metosülfat (PMS) içeren çözelti eklenir ve inkübasyona bırakılır. Kuyucuklardaki örnekler tüpe aktarılarak santrifüj edilir. Süpernatant, tekrar yeni bir mikroplağa aktarılır ve 490 nm'de absorbans ölçülür. Bu grubun kontrol grubunu ise antibiyotiğe maruz kalmayan biyofilm tabakası oluşturur (184).

Calgary Yöntemi

Calgary Biyofilm yöntemi, antibiyofilm duyarlılığının saptanması için önerilen hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Calgary Biyofilm Cihazı (Calgary Biofilm Device, CBD), standart 96 kuyucuklu mikroplak ve 96 çıkıntılı kapak kullanılarak 96 eşdeğer biyofilmin üretilmesi esasına dayanır. CBD, biyofilmlere karşı etkili rasyonel antibiyotik seçimi ve yeni etkili antibiyotik bileşiklerin taranması için etkili bir yöntem sunmaktadır.

Calgary Biyofilm Cihazı, iki parçalı bir reaksiyon kabından meydana gelir. Alt bileşen, standart 96'lı mikroplak şeklindedir. Üst bileşende ise 96 adet çıkıntı bulunur ve bu çıkıntılar reaksiyon kabının alt bileşeninin kanallarına oturmak ve standart 96 kuyucuklu bir plakanın oyuklarına uyacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 12). Bu şekilde sistemde olası çevresel kirlenmenin önüne geçilerek her bir çıkıntıda eşdeğer kabul edilebilecek biyofilm oluşumu sağlanır. Daha sonra bu çıkıntılar kırılarak burada oluşan biyofilm üzerinde çalışılacak maddenin antibiyofilm aktivitesi araştırılır ya da biyofilm oluşmadan önce kuyucuklara araştırılan madde eklenerek biyofilm oluşumunu önleme etkisi incelenebilir. Bu sistem ile üzerinde biyofilm oluşmuş çıkıntıların olduğu kapak, içinde yıkama solüsyonu bulunan başka bir mikroplağın üzerine kapatılır ve 1-2 dakika bekletilir. Yıkama ile planktonik formlar uzaklaştırıldıktan sonra çıkıntılar kırılarak sonikatöre yerleştirilir. Böylece çıkıntılardaki biyofilm mikroplaktaki çözeltiye geçmiş olur. Planktonik formdaki bakterilerden de kontrol amacıyla mikroplak hazırlanır ve karşılaştırma yapılır. MİK değeri

planktonik formların bulunduğu mikroplaktaki bulanıklık kontrol edilerek veya 650 nm'de optik dansite ölçümüyle saptanır (185).



Şekil 12. Çıkıntılı kapaklı mikroplak (185)

Bio-Timer (BT) Yöntemi

Bu yöntem; mikroorganizmanın metabolizmasına bağlı olarak, besiyerindeki indikatör yardımıyla besiyeri renginin değişimi için geçen süre ölçülerek, inokulumun tespit edilmesi esasına dayanır. Bunun için çalışılacak mikroorganizmalara uygun besiyerleri ve indikatörler seçilir. Besiyeri olarak genellikle Mueller Hinton Broth ve Sabouraud Liquid Medium; indikatör olarak ise fenol kırmızısı veya resazurin (mavi-mor) tercih edilir. İndikatörlü besiyerleri steril edildikten sonra NaOH ve HCl yardımıyla çalışılacak pH değerleri ayarlanır. 24 kuyucuklu mikroplakların her birinde farklı inokulum incelenmek üzere; kuyucuklara indikatörlü besiyeri eklenir. İlk kuyucuklara mikroorganizma süspansiyonu eklenerek diğer kuyucuklara doğru çift katlı seri dilüsyon yapılır. Her kuyucuktan, ilgili katı besiyerlerine eş zamanlı pasaj yapılır. Mikroplaklar ve katı besiyerleri uygun inkübasyona kaldırılır. Mikroplaklardaki renk değişimi belirli zaman aralıklarında incelenir. Besiyerindeki renk değişiminin görüldüğü süre cinsinden tespit edilir. İnkübasyon sonunda katı besiyerindeki koloniler sayılarak renk değiminin gerçekleştiği süreye karşı $\log_{10}$ CFU grafiği çizilir. Aynı işlemler antimikrobiyal madde ile karşılaştırılmış biyofilm kuyucuklarında tekrarlanarak, grafik yardımıyla biyofilm içerisindeki inokulum hesaplanır (186,187).

Mikroskobik Yöntemler

Çeşitli yüzeylerde ve mikroplakta oluşan mikrobiyal biyofilmlerin antibiyofilm ajanla muamelesinden sonra bu materyaller taramalı elektron mikroskopisi (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) veya konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) gibi çeşitli mikroskoplar ile incelenebilir. Bu teknikte, biyofilm oluşturulan yüzey yıkanarak planktonik formlar uzaklaştırılır. Ardından gluteraldehit ve kakodilik asit ile 4°C'de 16 saat boyunca sabitleme yapılır. Sabitleme aşamasını takiben yüzeyler 10 dk kakodilik asitle, 10 dk distile su ile yıkanarak önce alkolle sonra havayla kurutulur ve SEM ile incelenir. CLSM için biyofilm incelenmesi yönteminde de,öncelikle biyofilm oluşturulan yüzey yıkanarak planktonik formlar uzaklaştırılır. Gluteraldehit ve fosfat tamponlu salin ile 4°C'de 16 saat boyunca sabitleme yapılır. Yüzeyler 1 dk salin içinde durulanır. Uygun floresanlarla sabitlenir ve CLSM kullanılarak incelenir (188).

Kristal Viyole Mikroplak Yöntemi

Bu yöntemde genellikle 96 kuyucuklu mikroplak tercih edilir. Yöntem mikroplakta bulunan biyofilmin boyanması ve boyanın yoğunluğunun ELISA reader gibi bir cihazla okunarak antibiyofilm etkisi araştırılan maddenin etkinliğinin saptanmasına dayanır. Katı besiyerinde üretilen mikroorganizma sıvı besiyerine aktarılarak McFarland yoğunluğunda inokulum ayarlanır. Mikroplağın herbir kuyucuğuna belirlenen miktarda mikroorganizma süspansiyonu inokule edilir. Eğer biyofilm oluşumunu önleyici aktivite araştırılacaksa antimikrobiyal ajan bu aşamada eklenir. Mikroplaklar uygun koşullarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikroplaklar ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltılır. Boşaltılan kuyucuklar yavaşça PBS (Phosphate Buffered Saline) gibi uygun bir yıkama solüsyonuyla yıkanarak planktonik mikroorganizmalar uzaklaştırılır. Biyofilmi yok edici aktivite için tekrar antimikrobiyal ajan ve besiyeri eklenerek uygun koşullarda inkübasyona bırakılır. Metanol veya sodyum asetat gibi bir ajanla 10 dakika biyofilmin fiksasyonu sağlandıktan sonra kuyucuklara eşit miktarda kristal viyole eklenerek 20 dakika boyanın biyofilme nüfuz etmesi beklenir ve kuyucuklar boşaltılarak yeniden yıkama işlemi yapılır. Bu aşamada kristal viyole biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerini boyamakta olup biyofilm yapısına katılmamış diğer hücre ve maddeler yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmaktadır. Yüzeye tutunmuş bakteri hücrelerine ve biyofilme zarar vermemek ve doğru sonuçlar elde edebilmek için yıkama işlemlerinin yavaş yapılması gerekmektedir. Yıkama sonrasında mikroplaklar oda ısısında en az 30 dk süreyle kurumaya bırakılır. Kuruma sonrasında mikroplaklar etanol, asetik asit veya aseton gibi ajanlarla muamele edilir ve spektrofotometrik ölçüm yapan mikroplak okuyucu

cihazda belirli bir dalga boyunda ölçüm yapılarak, her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlenir. Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak antibiyofilm aktivitenin varlığı ve derecesi saptanabilir. Bu yöntem ile antibiyofilm etkinliği ölçülebilir. Etken madde deneyin ilk aşamasında eklenerek, biyofilm oluşumuna etkisi (MBİK) saptanabilir. Aynı zamanda, biyofilm oluşturulduktan sonra etken madde eklenerek, olgun biyofilme etkisi (MBEK) de tespit edilebilir (189-191).

Biyofilme Gömülü Bakteri Sayımı Yöntemi

Bu yöntemde çeşitli yüzeylerde veya mikroplaklarda oluşturulmuş biyofilmlerin içerdiği bakteri sayısı belirlenir. Oluşturulan biyofilmler, PBS ile yıkanır ve kurutulur; bu aşamada biyofilme bağlanmayan planktonik hücreler ortamdan uzaklaştırılmış olur. Ardından biyofilme steril serum fizyojik eklenerek, sonikasyona tabi tutulur. Böylece, biyofilme gömülü bakteriler açığa çıkmış olur. Buradan alınan sıvılar seyreltilerek ya da direkt olarak katı besiyerlerine ekilerek sayılır. Etken madde oluşturulmuş biyofilme eklenerek inkübasyon sağlanır. Böylece, etken maddenin olmadığı grup ile eklenen grup arasındaki bakteri sayısındaki azalma logaritmik olarak hesaplanmış olur (182).

Dama Tahtası Yöntemi

Kombine bileşiklerin, antibiyofilm duyarlılıklarının tespitinde kullanılan ise sinerji testidir. Aynı test, farklı bileşiklerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kombine etkiyi saptamada kullanılmaktır (192).

Dama tahtası testinde, farklı ilaçların, farklı konsantrasyonları 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak biyofilme kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaçların kombinasyondan elde edilen MBEK değerleriyle tek başlarına olan MBEK değerleri oranlanır ve fraksiyonel inhibitor konsantrasyonu (FİK) bulunur. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplanır ve fraksiyonel inhibitor konsantrasyonu indeksi (FİKİ) hesaplanır. Her maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antibiyofilm madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı saptanan MBEK değerine bölünmesi ile elde edilir (193,194).

Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerde mikroorganizmalarda biyofilm ilişkili genlerin varlığı aranmaktadır. Bu amaçla en çok polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) kullanılmaktadır. PCR, DNA içerisinde yer alan dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi ileri ve geri primerler kullanılarak in-vitro koşullarda amplifiye etmeye yarayan yöntemdir. Biyofilm ilişkili genlerin taranmasında ve antibiyofilm ilişkili çalışmalarda birden fazla PCR çeşidi kullanılmaktadır. Bunlardan konvansiyonel PCR, real-time PCR ve multiplex PCR sıklıkla tercih edilmektedir.

Konvansiyonel PCR; PCR tüpü içerisine kalıp DNA'nın, primerlerin, uygun tampon, enzim ve kimyasalların konularak yapıldığı temel PCR yöntemidir. Görüntülenmesinde agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Biyofilm ilişkili çalışmalarda saptanmak istenen biyofilm geninin özgün ileri ve geri primerleri tasarlanarak PCR reaksiyonuna alınır.

Real-time PCR, nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) yönteminde mikroorganizmalarda biyofilm ilişkili genlerin varlığı aranmaktadır. Böylece biyofilm yapan mikroorganizmalar saptanabilmektedir. Ayrıca, kantitatif real time PCR yöntemleri kullanılarak biyofilm oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen genlerin değişik koşullar altındaki gen ekspresyon seviyeleri saptanabilir. Örneğin, antimikrobiyal ajan içeren ve içermeyen ortamlardaki bakterilerin qRT-PCR ile gen ekspresyon seviyeleri saptanabilir. Gen ekspresyon analizlerinde referans (housekeeping) gen olarak 16S rRNA geni kullanılır. Daha sonra qRT-PCR cihazı için ticari olarak temin edilen uygun izolasyon kiti ile RNA izole edilir. Ardından komplementer DNA (cDNA) sentezi ile çoğalma evresine geçilir. Bu evreyi preinkübasyon ve amplifikasyon aşamaları izler ve ardından genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilir. Biyofilm ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi analizleriyle farklı koşullara ve ajanlara maruz bırakılmış mikroorganizmalardaki biyofilm genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış veya azalışlar tespit edilmektedir.

Multiplex PCR; aynı kalıp DNA dizisini çoğaltmak amacıyla aynı reaksiyon içerisine birden fazla primer ilave edilerek çoğaltma işlemi yapılan yöntemdir. Bu yöntem ile çok sayıda biyofilm ilişkili genin varlığı tek bir çalışma ile ortaya konabilmektedir. Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumu kompleks bir yapıya sahip olup; oluşumundan birden fazla gen sorumludur. Bu amaçla multiplex PCR'ın kullanımı bu tarz çalışmalarda önem arz etmektedir. Biyofilm ilişkili genlerin saptanması için hızlı ve pratik bir yöntemdir (182,195).

Kütle Spektrometrisi (MS)

Biyofilm içeriği bol miktarda EPS ve ekstrasellüler enzimler içermektedir. Biyofilm matriksindeki bu protein yapılar ve EPS gibi karmaşık yapılarda kütle spektrofotometresi ile incelenebilmektedir. Biyofilm matriksinde devam eden kimyasal süreçler bu yöntemle incelenmektedir. Bu amaçla özellikle MALDI-TOF MS (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) kullanılmaktadır. Bu yöntem, mikroorganizmaların protein yapılarını iyonize ettikten sonra vakumlanmış çemberlerdeki elektriksel alandan geçirerek protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır. Bu yöntem ile etken madde sonucu biyofilm matriksindeki protein değişimleri ve bakteri yüzey proteinlerinde meydana gelen değişimler ve bakteri büyümeleri izlenebilmektedir. Bu yöntemin maliyeti ve hassasiyeti yüksektir (196).

Antibiyofilm ajanlarının etkisini saptamada kullanılan yöntemler Tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Antibiyofilm ajanlarının etkisini saptamada kullanılan yöntemler, uygulamaları ve amaçları

Yöntem	Uygulama	Amacı
XTT Yöntemi	96 kuyucuklu mikroplakta yapılan kolorimetrik temelli bir yöntemdir.	Uygulanan ajanın biyofilm üretimine karşı etkisini ölçer.
Calgary Yöntemi	Calgary cihazı ile yapılan yöntemdir.	Uygulanan ajanın oluşmuş biyofilme etkisini ölçer.
Bio-Timer Yöntemi	24 kuyucuklu mikroplaklarda indikatörlü besiyeri ile yapılan yöntemdir.	Uygulanan ajanın biyofilme karşı etkisini $\log_{10}$ CFU grafiği çizilerek ölçer.
Mikroskobik Yöntemler	Çeşitli yüzeylerde ve mikroplakta oluşan mikrobiyal biyofilmlerin görüntülenmesi esasına dayanan yöntemdir.	Uygulanan ajanın etkisini mikrobiyal görüntülemedeki değişimine göre ölçer.
Mikroplak Yöntemi	96 kuyucuklu mikroplakta yapılan kolorimetrik temelli bir yöntemdir.	Uygulanan ajanın hem biyofilm üretimine hem de oluşmuş biyofilme karşı etkisini ölçer.
Bakteri sayım Yöntemi	Çeşitli yüzeylerde veya mikroplaklarda oluşturulmuş biyofilmlerin içerdiği bakteri sayısı belirlemeye yarayan yöntemdir.	Uygulanan ajanın biyofilme üretimine ve oluşmuş biyofilme karşı etkisini $\log_{10}$ bakteri sayısı değişimini ölçer.
Dama Tahtası Yöntemi	Farklı ilaçların, farklı konsantrasyonları ile biyofilme etkisi hesaplanır.	Uygulanan ajanın biyofilme karşı etkisini FİK değeri hesaplanarak saptanır.
Moleküler Yöntemler (qRT-PCR)	Spesifik biyofilm genlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçümüne dayanır.	Uygulanan ajanın biyofilm genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim saptanır.
Kütle Spektrofotometrisi	Biyofilm matriksindeki proteinler izlenir.	Uygulanan ajanın biyofilm matriksindeki protein seviyelerindeki değişim izlenir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu mikroplate (Lp Italiana Spa)
Analitik terazi (Ohaus)
Bakteri İzolasyon ve Tanımlama kiti (Microgen® Staph-ID)
Beher
Biyogüvenlik kabini Sınıf II (Metisafe)
Boncuklu Bakteri Saklama Tüpü (Or- Bak)
Çok kanallı otomatik mikropipetler (Eppendorf)
Deney tüpü
Densitometre (Biosan)
Derin Dondurucu (Arçelik)
Eküvyon çubuğu
Elisa reader (Thermo)
Erlen
Etüv (Redline by binder)
Manyetik Karıştırıcı (VELP)
Mikropipet ucu (Axygen)
Milipor filtre (0.22µm) (Milipore®)
Otoklav (Daihan Scientific Maxterile 47 lt)
Paslanmaz çelik pens
Paslanmaz çelik spatül
Pastör fırını (Daihan)
Petri kabı (Fıratpen)
pH metre (Thermo)
Real Time PCR cihazı (Roche)
RNA İzolasyon kiti (Bio-Speedy)
Santrifüj (Vwr)
Sonikatör (Wisd)
Tek kanallı otomatik mikropipetler (Eppendorf)
Tek kullanımlık steril öze
Vortex (VELP)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Agar agar (Sigma)
Ampisilin (Mustafa Nevzat Pharma)
Binding buffer (Bioeksen)
D-Glukoz (Difco)
Distile su
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Gene On)
Elisyon solüsyonu (Bioeksen)
Etanol(%96) (Sigma)
Glasiyal asetik asit (Sigma)
Gliserol
Hidroklorik asit (HCl) (Sigma)
İzoproponol (Sigma)
Kristal viyole (Sigma)
Metanol (Sigma)
Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)
Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck)
NAC (Sigma)
PBS (Sigma)
Primerler (Macrogen)
Serum fizyolojik
Sybeer green (BioRad)
Taq DNA polimeraz Seti (Gene On)
Triptik Soy Agar (TSA) (LabM)
Triptik Soy Broth (TSB) (LabM)
Tris (Applichem)
Ultra saf su
Vankomisin (Mayne Pharma.)
Wash buffer (Bioeksen)

Mikroorganizmalar

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve stafilokok olduğu bildirilen 170 adet bakteriden, biyofilm oluşturan toplam 50 adet *S. aureus ve S. epidermidis* izolatı kullanıldı. Kalite kontrol suşu olarak, Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,*S. aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 standart suşları kullanıldı. *S. aureus* ATCC 6538 ve *S. epidermidis* NTCC 11047 biyofilm pozitif kontrol; *S. aureus* ATCC 29213 biyofilm negatif kontrol olarak çalışmalarda kullanıldı. Gram boyama ve katalaz testlerini takiben 'Microgen® Staph-ID' kiti ile klinik izolatların stafilokok olduğu doğrulanarak çalışmaya alındı. Her izolat boncuklu kriyoviallerde (Or-Bak) stoklanarak, -80ºC'de saklandı. Çalışmamızda kullanılan bakteri izolatlarının numaraları, elde edildiği hasta grubu ve izole edildiği örnek türü Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Bakteri izolatlarının numaraları izole edildikleri hasta grupları ve örnekleri

BAKTERİ NUMARASI	BAKTERİ İSMİ	HASTA GRUBU	ÖRNEK
1	*MRSA*	Dahili Yoğun Bakım Servisi	Kan
2	*MRSA*	Acil Polikliniği	Kan
4	*MSSA*	Acil Polikliniği	Kan
8	*MSSA*	Acil Polikiliniği	Kan
9	*MSSA*	Koroner Yoğun Bakım Servisi	Kan
11	*S.epidermidis*	DahiliYoğun Bakım Servisi	Bos
12	*MSSA*	Acil Polikliniği	Kan
13	*MRSA*	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Aspirat
18	*S.epidermidis*	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	Kan
19	*S.epidermidis*	Genel Cerrahi Servisi	Katater
21	*MRSA*	EnfeksiyonServisi	Kan
22	*MRSA*	Plastik Cerrahi	Kan
26	*MSSA*	Beyin ve Sinir Cerrahisi Servisi	Doku biyopsi
40	*MSSA*	Enfeksiyon Servisi	Yara sürüntüsü
42	*MSSA*	Plastik Cerrahi Servisi	Doku biyopsi
45	*MSSA*	Acil Polikliniği	İdrar
49	*MSSA*	DahiliYoğun Bakım Servisi	Kan
53	*S.epidermidis*	Acil Polikliniği	Katater
56	*S.epidermidis*	DahiliYoğun Bakım Servisi	Kan
59	*MSSA*	Çoçuk Yeni Doğan Servisi	Kan
60	*MSSA*	Nerfroloji Servisi	Kan
61	*MRSA*	Medikal Onkoloji Servisi	Kan
64	*MRSA*	Ortopedi Servisi	Doku biyopsi
65	*MSSA*	Hematoloji Servisi	Kan
66	*MSSA*	Enfeksiyon Servisi	Aspirat
67	*MSSA*	Deri Ve Zührevi Hastalıklar	Yara sürüntüsü
73	*MSSA*	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	Aspirat
76	*MSSA*	Ortopedi Servisi	Doku biyopsi
80	*S.epidermidis*	Reanimasyon Ünitesi	Solunum sekresyonu
83	*MSSA*	Onkoloji Servisi	Kan
91	*MSSA*	DahiliYoğun Bakım Servisi	Solunum sekresyonu
92	*MSSA*	Plastik Cerrahi Servisi	Aspirat
109	*S.epidermidis*	Acil Polikliniği	Yara sürüntüsü
110	*S.epidermidis*	Göğüs Hastalılıkları Servisi	Kan
112	*S.epidermidis*	Plastik Cerrahi Servisi	Doku biyopsi
115	*MRSA*	DahiliYoğun Bakım Servisi	Kan
121	*MRSA*	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Kan
127	*S.epidermidis*	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	Kan
129	*S.epidermidis*	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	Kan
130	*MSSA*	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Aspirat
136	*MSSA*	Çoçuk Genel Servisi	İdrar
141	*MSSA*	AcilPolikliniği	Yara sürüntüsü
152	*S.epidermidis*	Nöroşirurji Servisi	Kan
M1	*MRSA*	Kardiyoloji Servisi	Kan
M2	*MRSA*	Cerrahi Yoğun Bakım	ETA
M3	*MRSA*	Beyin ve Sinir Cerrahi Servisi	İdrar
M7	*MRSA*	Plastik Cerrahi Servisi	Doku
M8	*MRSA*	Onkoloji Servisi	Kan
M11	*MRSA*	Dahili Yoğun Bakım Servisi	ETA
M13	*MRSA*	Enfeksiyon Servisi	Katater

Stafilokok İzolatlarının İdentifikasyonu

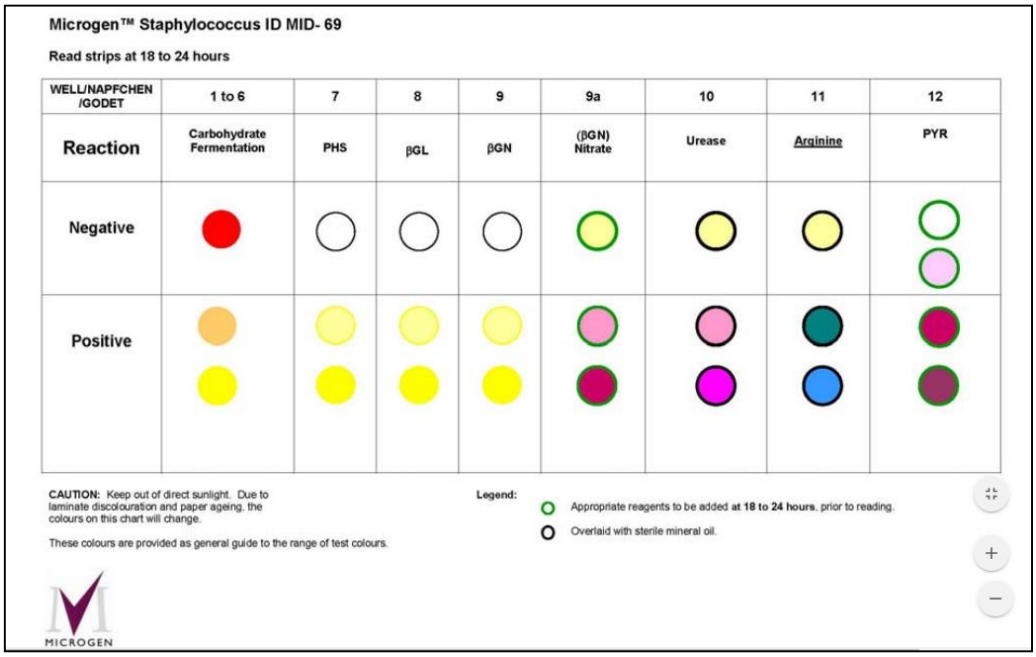
Çalışmamızda stafilokok izolatlarının identifikasyonu için ticari olarak temin edilen Microgen® Staph-ID kiti kullanıldı. Microgen® Staph-ID kiti stafilokok türlerinin identifikasyonu için geliştirilmiş 12 substrat içeren biyokimyasal bir test sistemidir (Tablo 10). Öncesinde tüm izolatlar Gram boyama ile boyandı ve katalaz testi yapıldı. Katı kültürden lam üzerine alınan bakteri kolonisi üzerine, H_2O_2 ilave edildi. Gaz kabarcıkları gözlenen izolatlar, katalaz pozitif; gözlenmeyenler ise katalaz negatif olarak tespit edildi.

Tablo 10. Microgen® Staph-ID kiti referans substratları ve reaksiyon değerlendirmesi

Kuyucuk	Reaksiyon	Tanımlama	Pozitif	Negatif
1	Sukroz	Karbonhidrat fermentasyonu-Fenol red ayıracı ile kırmızıdan sarıya renk değişimine neden olur	Sarı-Sarı/Turuncu	Kırmızı
2	Trehaloz			
3	Mannitol			
4	N-Asetil Glukozamin			
5	Mannoz			
6	Turanozun			
7	Alkalin Fosfataz	P-nitrofenil fosfatın alkalin fosfotaz ile hidrolizi sonucu sarı nitrofenolün üretilmesi	Sarı	Renksiz
8	Glukozidaz	P-nitrofenil β-D glikopiranosid'in β-Glukozidaz ile hidrolizi sonucu sarı nitrofenolün üretilmesi	Sarı	Renksiz
9	Glukoronidaz	O-nitrofenil β-D glukuronidin β-Glukuronidaz tarafından hidrolizi sarı nitrofenol üretimi ile sonuçlanır	Sarı	Renksiz
9	Nitrat	Nitrat α-Naftilamin ve Sülfanilik Asit ilavesinden sonra koyu kırmızı oluşturan nitrite indirgenir	Kırmızı	Sarı
10	Üreaz	Üre hidrolizi, amonyak oluşumuyla sonuçlanır. Fenol kırmızısı dönüşen pH'da bir artışa neden olur sarıdan pembeye / kırmızıya döner	Koyu Pembe	Solgun Somon Rengi
11	Arginin	Arginin, ornitin, amonyak ve $C0_2$'ye arginin dihidrolaz ile dönüştürülür. pH'da bir artışa neden olur ve bromothymol mavisinin renginde yeşilden maviye bir değişim olur 48 saat sonra yeşil reaksiyonlar negatiftir.	Yeşil/Mavi	Sarı/Yeşil
12	PYR	L-pirolidonil-beta- naftilamid hidrolizi	Kırmızı/Koyu Pembe	Renksiz/Soluk Somon Rengi
	LAT	CF için Lateks Aglütinasyon testi ve Protein A veya tüp koagülaz testi		
	CPG	Görünür koloni pigmentasyonunun gelişimi (krem altın renkli)		

Triptik Soy Agar (TSA) besiyerinde saf koloniler halinde 18-24 saat üretilen izolatlar, kitin içerisinde bulunan süspansiyon içerisinde karıştırıldı. Kitin içerisinde bulunan panelin yüzeyindeki geri yapışkanlı şerit kaldırılarak bakteri süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µL

eklendi. Arjinin ve üreaz kuyucuklarına ilave olarak 3 damla mineral yağ eklendi. Geri yapışkanlı şerit tekrar yapıştırılarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklar okundu. Reaksiyonlar okunduktan sonra beta-glukuronidaz kuyucuğuna nitrat-A ve nitrat-B reaktifleri, L-pirolidonil-beta-naftilamid (PYR) hidrolizi kuyucuğuna da PYR reaktifi eklendi. Tüm sonuçlar kaydedilip pozitif sonuçlar toplanarak bir kod elde edildi. Kod kitle birlikte temin edilen Microgen Doğrulama Programına girilerek sonuç analiz edildi (Şekil 13).



Şekil 13. Microgen® Staph-ID kiti renk tablosu

Kristal Viyole Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Bu yöntemin temel prensibi, biyofilm tabakayı oluşturan bakteri ve ekstaselüler matriksin negatif yüklü molekülleri bazik bir boya olan kristal viyole ile boyanarak spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (190-191).

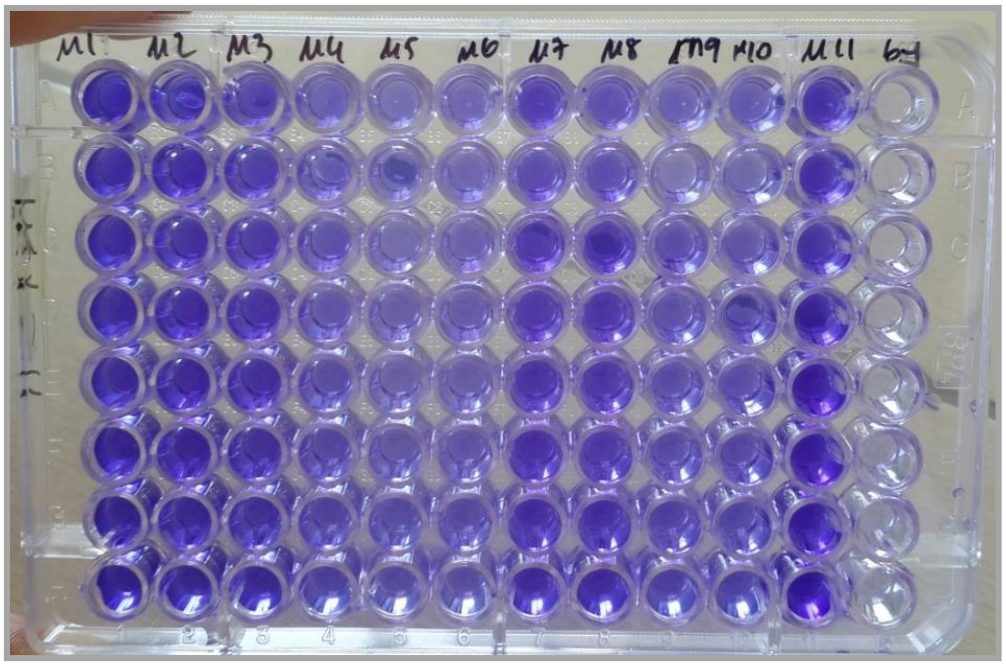
Stafilokok oldukları doğrulan 170 adet bakteri izolatı, -80ºC'den çıkartılarak triptik soy agara pasajlandı. Bakterilerin saflıkları kontrol edildikten sonra, biyofilm oluşumunu artırmak amacıyla %5 glukoz içeren triptik soy agara ardışık olarak iki kez pasajlandı (Şekil 14). İnkübasyonu takiben %5 glukoz içeren triptik soy agarda üretilen bakterilerden, McFarland 0,5 yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu işlemin ardından, %5 glukoz içeren triptik soy broth besiyerinden 100'er µL alınarak, 96 kuyucuklu mikroplaklara aktarıldı. Tüm kuyucuklara McFarland 0,5 (10^8 CFU/mL) yoğunluğunda hazırlanan bakteri

süspansiyonundan 100 µL eklendi ve 18-24 saat 37 ºC'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar PBS (0.01 M potasyum fosfat tamponu) ile 5 kez yıkandı. Ardından tüm kuyucuklara 200 µL metanol eklenip 10 dakika bekletilerek fikse edildi ve yıkama işlemi yapıldı. Tüm kuyucuklara 200 µL kristal viyole eklenerek, 20 dakika boyunca boyama işlemi yapıldı. Plaklar, musluk suyu ile yıkandı ve kurutuldu. Tüm kuyucuklara 200 µL %33'lük glasiyal asetik asit eklendi ve plak okuyucuda (bio-tek plate reader) 570 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek, biyofilm yönünden değerlendirildi (Şekil 15) (191).

Sonuçların değerlendirilmesi şu şekilde yapılmıştır: Negatif kontrol kuyucuklarından (*S.aureus* ATCC 29213) saptanan ortalama değerlerin (OD) üzerine 3 standart değerin (SD) eklenmesiyle sınır değer (cut-off/ODc) belirlendi ve buna göre her bir bakteri için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalaması sınır değerin üzerinde olan izolatlar biyofilm pozitif olarak kabul edildi. OD değeri sınır değerle bunun 2 katı arasında olanlar zayıf (+), 2-4 katı arasında olanlar orta (++), 4 katı üzerinde olanlar ise kuvvetli biyofilm pozitif (+++) olarak adlandırılmıştır. Sınır değer hesaplama ve biyofilm yoğunluk kategorileri Tablo 11'de gösterilmiştir (197). Tüm deneyler 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 14. %5 glukoz içeren triptik soy agarda üremiş stafilokok kolonileri



Şekil 15. Kristal viyole-mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespiti

Tablo 11. Sınır değer (ODc) ve biyofilm yoğunluk kategorileri (197)

ODc= OD (negatif kontrol) + 3×SD (negatif kontrol)	
OD ≤ ODc	biyofilm negatif
ODc < OD ≤ 2×ODc	zayıf düzeyde biyofilm pozitif (+)
2×ODc < OD ≤ 4×ODc	orta düzeyde biyofilm pozitif (++)
4×ODc < OD	kuvvetli düzeyde biyofilm pozitif (+++)

Sefoksitin Testi

S. aureus izolatlarında metisilin direncinin gösterilmesi için CLSI M100-S28 (180) önerileri doğrultusunda; disk difüzyon yöntemiyle sefoksitin testi yapıldı. MHA besiyeri besiyerinin kalınlığı yaklaşık 4 mm olacak şekilde, 90 mm çaplı petrilere 25 mL dökülerek düz bir zeminde katılaşması sağlandı. McFarland 0,5 yoğunluğunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile inokulum hazırlandı. Steril pamuk uçlu eküvyon süspansiyona batırılıp fazla sıvı tüpün iç duvarında alındıktan sonra yüzeyi tamamen kuru olan besiyeri yüzeyine yayma ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan alana, 30 µg sefoksitin diski yerleştirilip; 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, diskin etrafında oluşan inhibisyon zon çapı, kumpas yardımıyla ölçüldü. Zon çapı, 22 mm'den küçük olan bakteriler, MRSA olarak değerlendirilip, çalışmaya alındı (180).

Mikrodilüsyon Yöntemi

Antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M100-S28 önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (180). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 standart suşları kalite kontrol suşları olarak kullanıldı.

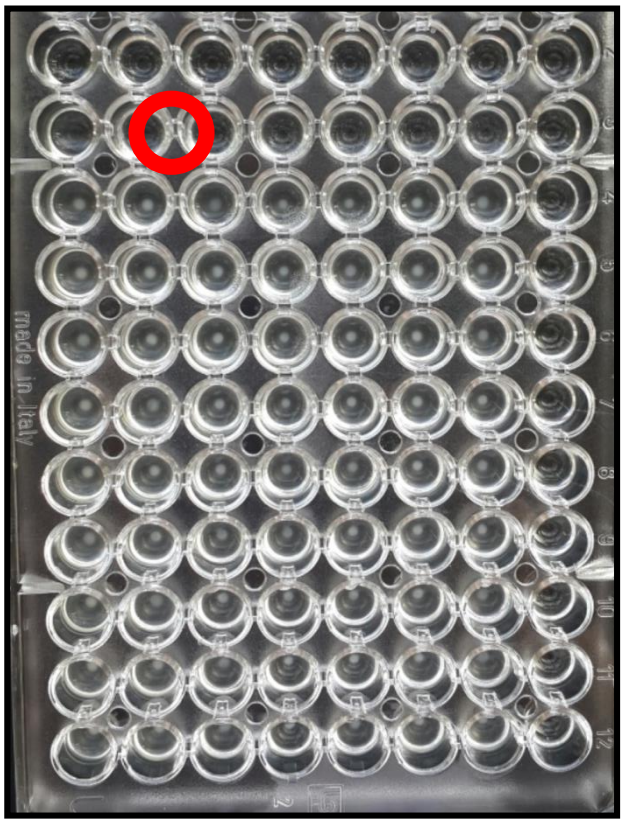
Çalışmada Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) ve katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) kullanıldı. Besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Mikrodilüsyon testi için 96 kuyucuklu mikroplaklara 100 µL hacimde eklendi. MHA plaklarında üretilen *S. aureus ve S. epidermidis* kolonileri öze ile alınarak steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Süspansiyonun bulanıklığı, McFarland 0,5 standardına uygun bulanıklığa ayarlandı. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı (Biosan) kullanılarak saptandı. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğuna (Şekil 16) ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek $5x10^5$ CFU/mL yoğunluğunda kullanıldı.

N-asetilsistein (NAC), ampisilin ve vankomisin stok solüsyonları, steril distile suda çözülerek hazırlandı. Stok solüsyonları hazırlanan NAC, ampisilin ve vankomisin mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100 µL hacimde eklendi, böylece stok solüsyondaki madde konsantrasyonuyarı yarıya sulandırılmış oldu. Çok kanallı mikropipet (Eppendorf®) kullanılarak çift katlı dilüsyon yapılarak, mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da madde konsantrasyonu her defasında yarı yarıya azaltıldı. Sonuç olarak mikroplaklarda NAC'ın 4075-64 µg/mL; ampisilin ve vankomisinin 16-0,016 µg/mL seri konsantrasyonları elde edildi. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonundan 10 µL inokülasyon yapıldı. Her mikrodilüsyon plağında sadece besiyeri ve mikroorganizma içeren, sadece besiyeri içeren kontrol kuyucukları eklendi. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37ºC'de 18-24 saat inkübe edildi.

MİK (Minumun İnhibitör Konsantrasyonu), mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak saptandı. Böylece izolatların antibiyotiklere ve NAC'a duyarlılıkları saptandı (Şekil 17). Tüm deneyler 3 paralel olacak şekilde çalışıldı.



Şekil 16. Mikrodilüsyon yöntemi için McFarland 0,5 standart yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanması



Şekil 17. Mikrodilüsyon yöntemi ile bakterilerin MİK değerlerinin belirlenmesi

MİK değerleri üzerine NAC'ın etkisinin Dama Tahtası Yöntemi ile Araştırılması

Dama tahtası yönteminde, doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikroplakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna antibiyotiğin (16-0,016 µg/mL) seri sulandırımları, bir başka mikroplağın yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise NAC'ın (4075-64 µg/mL) seri sulandırımları dağıtıldı. İki plağın içerikleri başka bir mikroplakta birleştirildi (Tablo 12). Kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyon aralığı, MİK değerlerine göre tespit edildi. MHA plaklarında üretilmiş olan *S. aureus ve S. epidermidis* kolonilerinden öze ile alınarak steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Süspansiyonun bulanıklığı, McFarland 0,5 standardına uygun bulanıklığa ayarlandı. Bakteri süspansiyonu McFarland 0,5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek, $5x10^5$ CFU/mL yoğunluğunda kullanıldı. Hazırlanan inokülüm NAC ve antibiyotiklerin seri sulandırımlarının konsantrasyonlarını içeren plaklara her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde eklendi. Plaklar 37 ºC'de 18-24 saat inkübe edildi (Şekil 18) (192,193).

Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapıldı. Dama tahtası yöntemi uygulanarak antibiyotiklerin ve NAC'ın birçok farklı konsantrasyon kombinasyonu denenerek, birlikte etkili oldukları en uygun konsantrasyon kombinasyonu tespit edilmiş oldu. Tüm deneyler 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır (198).



Şekil 18. Dama tahtası yönteminde sonuçların değerlendirilmesi

Tablo 12. Antimikrobiyal duyarlılık için dama tahtası testinde kullanılan antibiyotik (ampisilin veya vankomisin) ve NAC'ın kullanılan konsantrasyonları (µg/mL) ve FİK hesaplanması

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0	0,25/0	0,125/0	0,063/0	0,031/0	0,016/0
B	0/4075	16/4075	8/4075	4/4075	2/4075	1/4075	0,5/4075	0,25/4075	0,125/4075	0,063/4075	0,031/4075	0,016/4075
C	0/2038	16/2038	8/2038	4/2038	2/2038	1/2038	0,5/2038	0,25/2038	0,125/2038	0,063/2038	0,031/2038	0,016/2038
D	0/1018	16/1018	8/1018	4/1018	2/1018	1/1018	0,5/1018	0,25/1018	0,125/1018	0,063/1018	0,031/1018	0,016/2038
E	0/509	16/509	8/509	4/509	2/509	1/509	0,5/509	0,25/509	0,125/509	0,063/509	0,031/509	0,016/509
F	0/254	16/254	8/254	4/254	2/254	1/254	0,5/254	0,25/254	0,125/254	0,063/254	0,031/254	0,016/254
G	0/127	16/127	8/127	4/127	2/127	1/127	0,5/127	0,25/127	0,125/127	0,063/127	0,031/127	0,016/127
H	0/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64	0,25/64	0,125/64	0,063/64	0,031/64	0,016/64

- 1A Kontrol kuyucuğu (sadece besiyeri ve bakteri içerir): sarı renk
- 1 (B-H) Sadece NAC'ın seri dilüsyonu: yeşil renk
- A (2-12) Sadece antibiyotiğin (ampisilin ya da vankomisin) seri dilüsyonu: pembe renk
- Diğer kuyucuklar antibiyotik/NAC kombinasyon konsantrasyonları: mavi renk

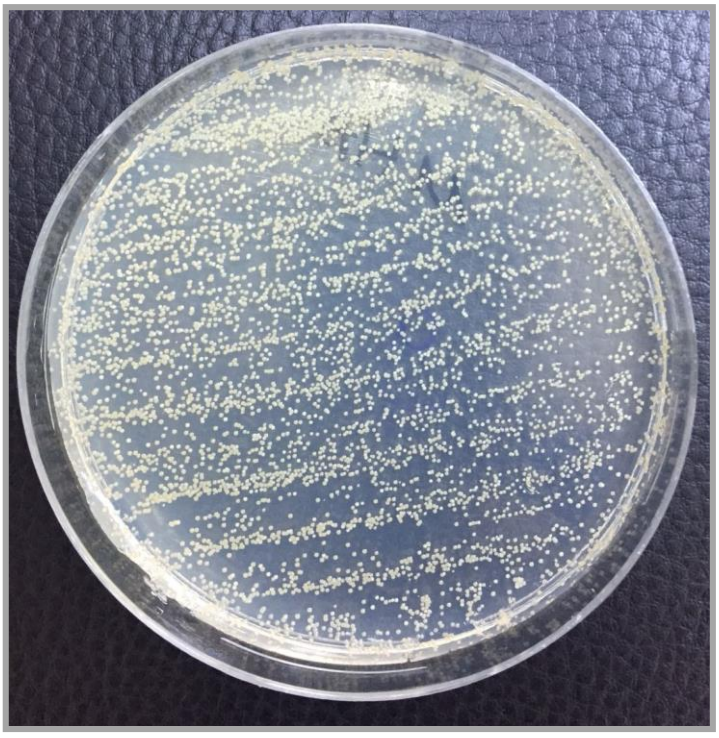
$FİK_{antibiyotik} = MİK_{\text{ab kombinasyon}}/MİK_{antibiyotik}$

$FİK_{NAC} = MİK_{\text{NAC kombinasyon}}/MİK_{NAC}$

$FİKİ = FİK_{antibiyotik} + FİK_{NAC}$

Antibiyofilm Aktivite Testleri İçin Bakteri İnokulumunun Belirlenmesi

Antibiyofilm aktivite deneyinde kullanılacak olan bakteri inokulumunu belirlemek için, 100 µL %5 glukoz eklenmiş Mueller Hinton Broth besiyeri içeren 96 kuyucuklu plaklara McFarland 0,5 yoğunluğunda hazırlanan ve değişik oranlarda dilüe edilen bakteri süspansiyonları 100 µL olacak şekilde pasajlandı. Pasajlanan bakteriler, 37ºC'de inkübe edilerek sırasıyla 6, 12, 18, 24, 32, 48 saat bekletildi. Ardından bu plaklar, PBS ile yıkanarak, kuyucuklara tekrar sıvı besiyeri eklendi ve ultra sonikatörde (40 kHz'de 15 dk; soğuk distile su ilavesiyle) bekletilerek biyofilm içerisindeki bakterilerin besiyerine geçmesi sağlandı. Sıvı besiyerindeki bakteriler, 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılarak Mueller Hinton Agara ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayıldı (Şekil 19). Bu yöntemle bakterilerin hangi inkübasyon koşullarında ve hangi sürede oluşturdukları biyofilmin içerdiği bakteri sayısının, antibiyofilm aktivite çalışmaları için gerekli inokuluma yakın olduğu saptanarak bir ön değerlendirme yapılması sağlandı.

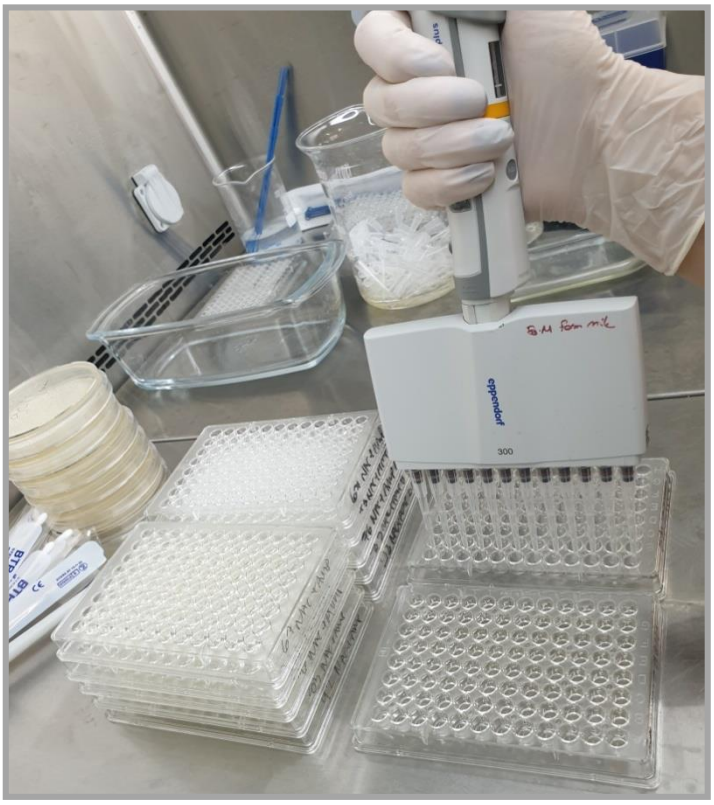


Şekil 19. Sonikasyon işlemi sonrası üremiş bakteri kolonileri

Antibiyofilm Aktivitenin belirlenmesi

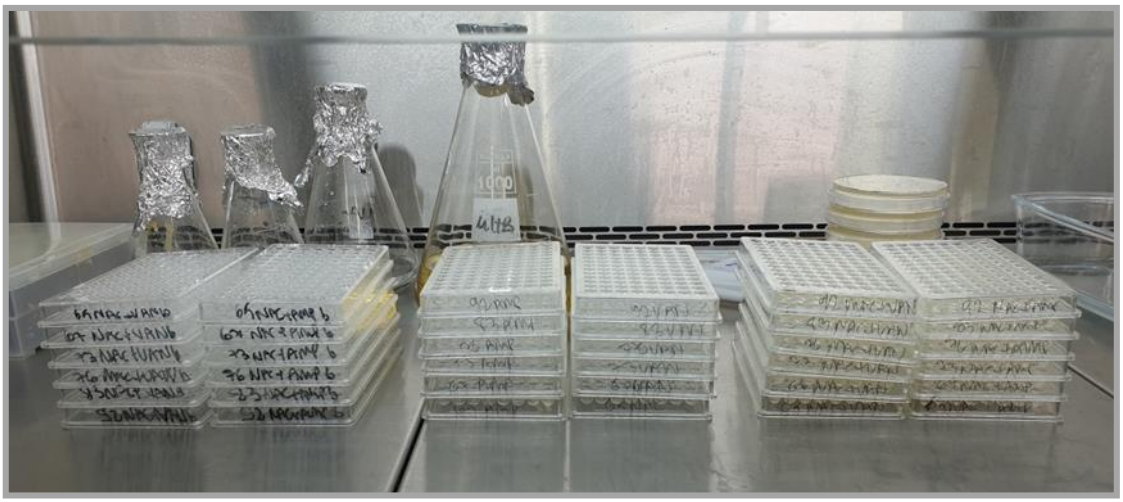
Bu çalışma için öncelikle, %5 glukoz eklenmiş MHB besiyeri içeren 96 kuyucuklu düz tabanlı plaklara, McFarland 0,5 yoğunluğunda ayarlanmış bakteri inokulumları 100 µL

eklenerek 18 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 20). Bu aşamada inkübasyon için kullanılan koşullar, yapılan ön değerlendirme çalışmaları ile tespit edilen bilgiler çerçevesinde ayarlandı.



Şekil 20. Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi için bakterilerin biyofilm oluşturma işlemine alınması

İnkübasyon sürelerinin bitimine doğru; %5 glukoz eklenmiş MHB besiyeri, 96 kuyucuklu plaklara 100 µL olacak şekilde dağıtıldı. Ampisilin (8000 µg/ml), vankomisin (8000 µg/ml) ve NAC'ın (16384 µg/ml) stok solüsyonları hazırlanarak 96 kuyucuklu plakların ilk kuyucuğuna 100 µL olacak şekilde eklendi. İlk kuyucuktan itibaren 100 µL aktararak çift katlı seri sulandırım yapıldı. Biyofilm oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmış olan plaklar inkübatörden çıkarılarak içerikleri boşaltıldı. Bu plakların tabanında oluşan biyofilm inokulum olarak kullanıldı. Çift katlı seri sulandırım yapılarak hazırlanmış olan plakların içeriği, inokulum içeren bu plaklara aktarıldı (Şekil 21). 18-24 saat 37 ºC'de inkübasyonu takiben üremenin görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonlarının olduğu kuyucuktaki madde miktarları MBEK olarak saptandı (182, 193).



Şekil 21. Kullanılan maddelerin kombinasyonlarının antibiyofilm etkisinin belirlenmesi

Antibiyofilm etkinin saptanmasında kullanılan madde kombinasyonlarının etkisini incelemek için dama tahtası yöntemi kullanıldı. Bunun için %5 glukoz eklenmiş MHB besiyeri, 96 kuyucuklu plaklara 100 µL olacak şekilde dağıtıldı. Ampisilin (16000 µg/ml) , vankomisin (16000 µg/ml) ve NAC'ın (32768 µg/ml) stok solüsyonları hazırlanarak 96 kuyucuklu plakların ilk kuyucuğuna 100 µL olacak şekilde eklendi. İlk kuyucuktan itibaren 100 µL aktararak çift katlı seri sulandırım yapıldı. Doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikroplakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna vankomisin ve ampisilinin seri sulandırımları, bir başka mikroplağın yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise NAC'in seri sulandırımları dağıtılarak ve bu iki plağın içerikleri başka bir mikroplakta birleştirildi (Tablo 13). Biyofilm oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmış olan plaklar inkübatörden çıkarılarak içerikleri boşaltıldı. Bu plakların tabanında oluşan biyofilm inokulum olarak kullanıldı. İki plağın içeriği birleştirilerek hazırlanmış olan plakların içeriği, inokulum içeren bu plaklara aktarıldı. 18-24 saat 37ºC'de inkübasyonu takiben üremenin görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonlarının olduğu kuyucuklardaki madde miktarları MBEK olarak saptandı.

Bu aşamada, sadece biyofilm oluşumu gerçekleşen ve madde içermeyen kontrol kuyucukları ve dama tahtası yönteminde MBEK olarak tespit edilen tüm kuyucuklardan triptik soy agara 100 µL yayma ekim yöntemiyle ekim yapıldı. Ekim yapılmadan önce plakların içerikleri boşaltılıp, 5 kez PBS ile yıkandıktan sonra, plakların içerisine steril serum fizyolojik 100 µL eklenerek, sonikatörde 15 dk bekletildi (Şekil 22). Bu işlem sonrasında kuyucuklardan alınan örnekler; 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılarak, 3'er adet MHA besiyerine pasajlandı. Bu besiyerleri 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben bakteri kolonileri sayılarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizma sayısı hesaplandı.

Üreme olmayan plaklara ekim yapılan kuyucuktaki konsantrasyon, MBEK olarak değerlendirildi. Üreme olan plaklarda koloni sayıları hesaplanarak kontrol ile kıyaslandı ve biyofilm içerisindeki bakterilerin kaç CFU/mL azalma gösterdiği saptandı. Ayrıca kontrol kuyucuğundaki bakteri sayısı (CFU/mL) başlangıç inokulumu olarak değerlendirildi (Şekil 23).

Katı besiyerlerine ekim yapılan tüm kuyucuklardan %50 soğuk etanol içerisinde ependorf tüplere alınarak moleküler testler için -80'de saklandı.



Şekil 22. Sonikatör içerisine yerleştirilen plaklar



Şekil 23. Sonikasyon işlemi sonrası plaklarda bulunan bakteri sayısının tespiti için 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılmış örneklerin MHA besiyerine ekimi ve bakteri sayım işlemleri

Plaklarda biyofilm oluşumunun doğrulanması için, kontrol için ayrılan kuyucuklar, PBS ile yıkandıktan sonra 200 µL metanol içerisinde 10 dakika fikse edildi. Ardından 200 µL kristal viyole içerisinde 20 dakika boyandı. Yıkandıktan ve kurutulduktan sonra %33'lük glasiyel asetik asit içerisinde bekletilip ve kuyucuğun renginin kristal viyole rengi olması biyofilm varlığı yönünden değerlendirildi. Kuyucuk içeriği başka bir plağa aktarılarak ve ELISA reader'da OD ölçülerek değerlendirildi (Şekil 24). Tüm çalışmalar 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 24. Kontrol plaklarında biyofilm oluşumunun kristal viyole doğrulanması ve ELISA reader'da OD ölçümü ile değerlendirilmesi

Tablo 13. Antibiyofilm aktivite için dama tahtası testinde kullanılan antibiyotiğin (ampisilin veya vankomisin) ile NAC'ın kullanılan konsantrasyonları (µg/mL) ve FİK hesaplanması

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	4000/0	2000/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	62,5/0	31,25/0	15,63/0	7,81/0	3,90/0
B	0/8192	4000/8192	2000/8192	1000/8192	500/8192	250/8192	125/8192	62,5/8192	31,25/8192	15,63/8192	7,81/8192	3,90/8192
C	0/4096	4000/4096	2000/4096	1000/4096	500/4096	250/4096	125/4096	62,5/4096	31,25/4096	15,63/4096	7,81/4096	3,90/4096
D	0/2048	4000/2048	2000/2048	1000/2048	500/2048	250/2048	125/2048	62,5/2048	31,25/2048	15,63/2048	7,81/2048	3,90/2048
E	0/1024	4000/1024	2000/1024	1000/1024	500/1024	250/1024	125/1024	62,5/1024	31,25/1024	15,63/1024	7,81/1024	3,90/1024
F	0/512	4000/512	2000/512	1000/512	500/512	250/512	125/512	62,5/512	31,25/512	15,63/512	7,81/512	3,90/512
G	0/256	4000/256	2000/256	1000/256	500/256	250/256	125/256	62,5/256	31,25/256	15,63/256	7,81/256	3,90/256
H	0/128	4000/128	2000/128	1000/128	500/128	250/128	125/128	62,5/128	31,25/128	15,63/128	7,81/128	3,90/128

- 1A Kontrol kuyucuğu (sadece besiyeri ve bakteri içerir): sarı renk
- 1 (B-H) Sadece NAC'ın seri dilüsyonu: yeşil renk
- A (2-12) Sadece antibiyotiğin (ampisilin ya da vankomisin) seri dilüsyonu: pembe renk
- Diğer kuyucuklar antibiyotik/NAC kombinasyonu konsantrasyonları: mavi renk

$FİK_{antibiyotik} = MBEK_{abkombinasyon}/MBEK_{antibiyotik}$

$FİK_{NAC} = MBEK_{NACkombinasyon}/MBEK_{NAC}$

$FİKİ = FİK_{antibiyotik} + FİK_{NAC}$

qRT-PCR ile *icaA, icaD* ve *sarA* Genlerinin Ekspresyonunun Belirlenmesi

icaA, icaD ve *sarA* genlerinin ekspresyonu üzerine NAC'ın etkisinin saptanması için bu genlerinin değişik koşullarda; *i)* NAC ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı, *ii)* NAC ve antibiyotikleri içeren besiyerinde üretilen kültür ortamındaki ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi için qRT-PCR yöntemi uygulandı.

RNA izolasyonu:

S. aureus ve S. epidermidis sıvı kültürlerinden, RNA izolasyon aşamasına geçildi. RNA izolasyonu için, Bio-Speedy (Kat.No.BS-NA-309-50) marka bakteriyel RNA izolasyon kiti optimize edilerek kullanıldı. Bu işlem için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı (199).

1. 1,5 veya 2,0 mL'lik boş bir mikrosantrifüj tüpüne 50 µL sıvı kültür aktarıldı.

2. Üzerine 100 µL Sodyum azid içeren 1XTE (Tris-EDTA) eklendi, son hızda 5 sn vortekslenip, ardından santrifüj ile 2000g'de 1-2 sn kısa süreli santrifüj (short spin) yapıldı.

3. 95 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı (Şekil 25).

4. Ardından ependorf tüplere 20 µL DNaz-I eklendi ve 5 sn vortekslenip, santrifüj ile 2000 g'de 1-2 sn kısa süreli santrifüj yapıldı. 37 ºC'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.

5. Ependorf tüplere 150 µL GIT (Guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCI, pH=8) eklendi. 5 sn vortekslenip, santrifüj ile 2000 g'de 1-2 sn kısa süreli santrifüj yapıldı ve 95 ºC'de 1 dk inkübasyona bırakıldı.

6. Ependorf tüplerin içeriğine 150 µL IP (izopropanol) eklenip, son hızda 1 dk vortekslendi ve santrifüj ile 2000 g'de 1-2 sn kısa süreli santrifüj yapıldı.

7. Temiz bir toplama tüpüne spin kolon yerleştirildi.

8. Tüm numune kolona aktarıldı. 14000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Toplama tüpündeki filtrat atıldı, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.

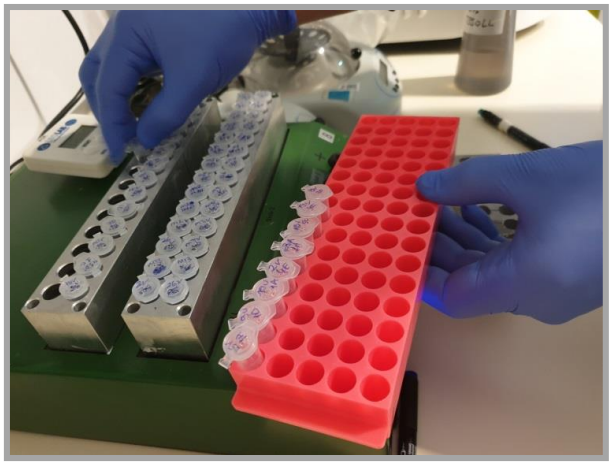
10. Kolona 500 µL WB1 (yıkama tamponu-1) yüklenip, 14000 g'de 1 dakika santrifüj uygulandı, filtrat atıldı, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.

11. Kolona 500 µL WB2 (yıkama tamponu -2) yüklenip, 14000 g'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Filtrat atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.

12. Kolon, boş halde iken 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek kurutuldu.

13. Kurutulmuş kolon, 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpü üzerine yerleştirildi. 100 µL EB (elüsyon tamponu), kolona yüklendi ve 1-2 dakika bekletildi.

14. 14000 g'de 1 dakika santrifüj uygulanarak RNA elüsyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA -20 °C'de saklandı.



Şekil 25. RNA izolasyonu için ependorfa alınan örneklerin 95 ºC'de 15 dk inkübasyona alınması

Kantitatif Real-Time PCR

S. aureus ve S. epidermidis türü bakterilerde biyofilm oluşumundan sorumlu olan *icaA ve icaD* (hücreler arası bağlanma proteini A ve D) *ve sarA* (*Staphylococcus* yardımcı düzenleyici protein A) genlerinin ekspresyon seviyesi qRT-PCR ile ölçüldü. Daha önceki literatürlerde tanımlanmış ve validasyonları gerçekleştirilmiş *S.aureus ve S. epidermidis* türlerinin *icaA, icaD* (200) *ve sarA* (201) genlerini hedefleyen primerler qRT-PCR'da kullanıldı. Gen ekspresyon analizlerinde referans (house keeping) gen olarak 16S rRNA geni kullanıldı (201,202). qRT-PCR için Roche Light Cycler Nano cihazı kullanıldı. cDNA izolasyonu ayrı bir işlem olarak yapılmamıştır. qRT-PCR işleminde, PCR döngüsüne ek olarak cDNA basamağı eklenerek elde edilmiştir (Tablo. 14) (Şekil 26).

Tablo 14. *S.aureus*ve *S.epidermidis* gen bölgeleri için bir reaksiyonluk qRT-PCR Karışımı

2x Reaksiyon Tamponu	10 µL
İleri primer	0,1 µL
Geri primer	0,1 µL
RT-RIN	0,6 µL
1x SybrGreen-I	0,12 µL
MGW	5,08 µL
Kalıp RNA	4 µL

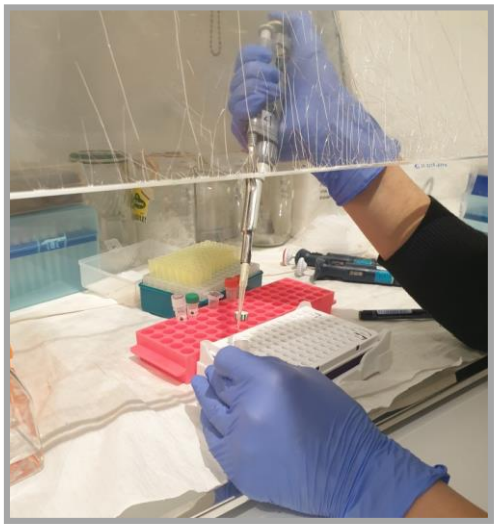
Çoğalma reaksiyonu, 45°C'de 30 dk cDNA sentezi ile başlatıldı. Ardından preinkübasyon için 1 döngü 95°C 5 dk, amplikasyon için; 40 döngü 15 sn 95°C, 30 sn

60°C'de (primer özellikleri Tablo 15'te ve Tablo 16'da verilmiştir) ve 25 sn 72°C koşullarında gerçekleştirildi. qRT-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapıldı (Şekil 27).

Tüm kalıp Cdna'nın sentezlendiği kalıp RNA'lar, qRT-PCR reaksiyonlarında, çoğalmanın genomik DNA kontaminasyonundan değil de cDNA'dan kaynaklandığını göstermek için negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm deneyler 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.



Şekil 26. qRT-PCR için kullanılan Roche Light Cycler Nano cihazı



Şekil 27. Örneklerin *icaA, icaD ve sarA* genlerinin ekspresyon seviyelerinin tespiti için qRT-PCR reaksiyonunun hazırlanması

Tablo 15. *Staphylococcus aurens* için qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri, Tm dereceleri ve elde edilen ürün boyutu

-Hücreler arası adezyon proteini A geni (icaA):
icaA_Staphylococcus aureus_F: TGCTGGCGCAGTCAATACTA
icaA_Staphylococcus aureus_R: TCTGGAACCAACATCCAACA
Tm:60°C
Ürün boyutu: 183 bp
-Hücreler arası adezyon proteini D geni (icaD):
icaD_Staphylococcus aureus_F: ACCCAACGCTAAAATCATCG
icaD_Staphylococcus aureus_R: GCGAAAATGCCCATAGTTTC
Tm: 59 °C
Ürün boyutu: 211 bp
-Staphylococcal accessory regulator geni (sarA):
sarA_Staphylococcus aureus_F: TGACATACATCAGCGAAAACAA
sarA_Staphylococcus aureus_R: TCTTTCATCATGCTCATTACGTT
Tm: 59 °C
Ürün boyutu: 152 bp

Tablo 16. *Staphylococcus epidermidis* için qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri, Tm dereceleri ve elde edilen ürün

-Hücreler arası adezyon proteini A geni (icaA)
icaA_Staphylococcus epidermidis_F: AGCGAAGTCAATCTCTTGCAG
icaA_Staphylococcus epidermidis_R: TCAGGCACTAACATCCAGCA
Tm: 60°C
Ürün boyutu: 199 bp
-Hücreler arası adezyon proteini D geni (icaD)
icaD_Staphylococcus epidermidis_F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG
icaD_Staphylococcus epidermidis_R: CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA
Tm: 60°C
Ürün boyutu: 198 bp
-Staphylococcal accessory regulator geni (sarA)
sarA_Staphylococcus epidermidis_F: TCTTTCATCGTGTTCATTACGTT
sarA_Staphylococcus epidermidis_R: TCAGCTTTGAAGAATTTGCAG
Tm: 58 °C
Ürün boyutu: 176 bp

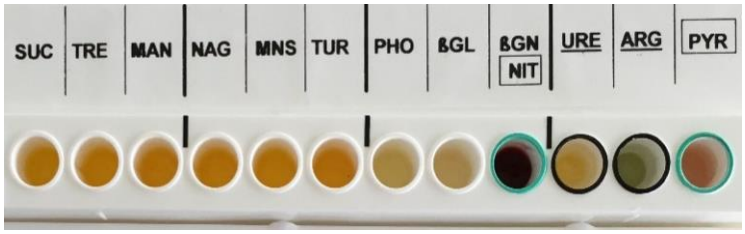
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

qRT-PCR yönteminde reaksiyon verimini belirlemek için kalıp DNA'lardan bir tanesinin seri dilüsyonu yapılıp reaksiyon verimi hesaplandı. Reaksiyon verimi 1.5-2.0 aralığında ve korelasyon faktörü (r^2) sürekli 0.9'un üzerinde olan sonuçlar karşılaştırma analizlerde kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hedef genlerin rRNA genine göre rölatif ifade seviyesi hesaplandı (202).

Kontrol ve deneme gruplarının (sinerji ve aditif etki tespit edilen konsantrasyonlar) karşılaştırılmasında Student-T testi kullanıldı (203). $p<0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi (203).

BULGULAR

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen 170 adet izolatın *S. aureus ve S. epidermidis* olduğu Gram boyama, katalaz testi ve Microgen® Staph-ID identifikasyon kiti ile doğrulandı (Şekil 28). Tüm örneklerin Gram boyamalarında, Gram pozitif koklar görüldü ve katalaz testi pozitif olarak tespit edildi.

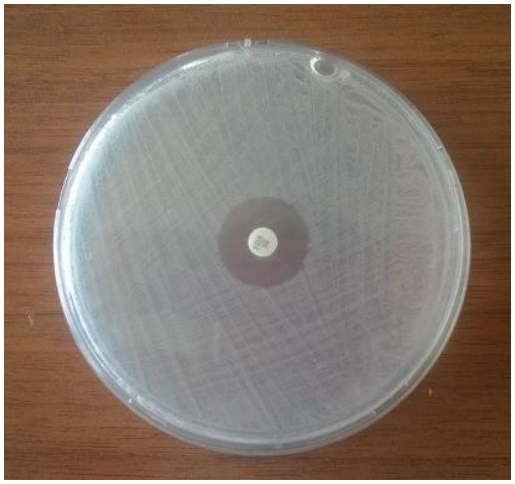


Şekil 28. Stafilokoklar için kullanılan Microgen® Staph-ID identifikasyon kiti test sonucu

Bu izolatların 86'sı (%50,59) S. *aureus* ve 84'ü (%49,41) *S. epidermidis* olarak tespit edildi (Tablo 17). *S. aureus* olduğu doğrulanan 86 izolata, sefoksitin disk testi uygulandı ve zon çapı 22 mm'nin altında olan 28 izolat MRSA olarak belirlendi (Şekil 29).

Tablo 17. Toplanan örnek sayısı ve dağılımları

Tanımlanan Örnek Adı	**Sayısı**
Metisilin Duyarlı *S. aureus* (MSSA)	n=58 (%34,12)
Metisislin Dirençli *S. aureus* (MRSA)	n=28 (%16,47)
S. epidermidis	n=84 (%49,41)
Toplam	n=170 (%100)



Şekil 29. Sefoksitin disk testi sonucu

Çalışmada kullanılan bakteriyel biyofilmlerden elde edilen OD değerlerine göre; izolatlar biyofilm üretmeyenler, zayıf, orta ve kuvvetli biyofilm üretenler olmak üzere dört kategoride sınıflandırıldı. Bu amaçla, negatif kontrol (biyofilm negatif *S.aureus* ATCC 29213) kuyucuklarından elde edilen ortalama değerlerin (OD) üzerine 3 standart değerin (SD) eklenmesiyle OD cut-off (ODc) değeri hesaplandı. Buna göre her bir bakteri için hazırlanmış olan üçer kuyucuktan elde edilen OD değerlerinin ortalaması sınır değerin üzerinde olan izolatlar biyofilm pozitif olarak kabul edildi. OD değeri sınır değerle bunun 2 katı arasında olanlar zayıf (+), 2-4 katı arasında olanlar orta (++), 4 katı üzerinde olanlar ise kuvvetli biyofilm pozitif (+++) olarak sınıflandırıldı. Sınır değer hesaplaması Tablo 18'de ve biyofilm yoğunluk kategorileri Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 18. ODc hesaplanması ve sınır değerlerin tespiti (197)

Örnek Numarası	OD 1	OD 2	OD 3	OD Ortalaması	Standart Sapma	3x Std	ODc	2xODc	4xODC
Negatif kontrol C2*	0,723	0,588	0,68	0,664	0,068966175	0,207	0,871	1,741	3,482

*C2: *S.aureus* ATCC 29213

Tablo 19. Biyofilm oluşturma yoğunluk sınıflaması (197)

OD ≤ ODc	**biyofilm negatif**
ODc < OD ≤ 2×ODc	**zayıf düzeyde biyofilm pozitif (+)**
2×ODc < OD ≤ 4×ODc	**orta düzeyde biyofilm pozitif (++)**
4×ODc < OD	**kuvvetli düzeyde biyofilm pozitif (+++)**

Çalışmaya alınan toplam 170 stafilokok izolatının 69'u (%40,59) mikroplak kristal viyole yöntemine göre biyofilm oluşturdu, 101'i (%59,41) ise oluşturmadı. Kantitatif olarak bakıldığında biyofilm oluşturan 69 bakteriden 42'si zayıf (%60,87), 22'si orta (%31,88), 5'i kuvvetli (%7,25) derecede biyofilm oluşturduğu gözlendi. Tablo 20'de çalışmaya alınan tüm bakterilerin OD değerleri ve biyofilm pozitiflik dereceleri görülmektedir. Çalışmaya biyofilm oluşturan 69 izolat ile devam edildi.

Tablo 20. Biyofilm pozitif örneklerin OD değerleri ve biyofilm dereceleri

Örnek Numarası	Bakteri adı	OD 1	OD 2	OD 3	OD Ortalaması	OD_{ort}-$OD_{negatif\ kontrol}$	Biyofilm Derecesi
1	MRSA	1,201	1,338	1,125	1,221	1,042	zayıf
2	MRSA	1,823	1,481	1,482	1,595	1,416	zayıf
3	MRSA	1,289	1,194	1,313	1,265	1,086	zayıf
4	MSSA	1,439	1,313	1,139	1,297	1,118	zayıf
8	MSSA	1,577	1,436	1,299	1,437	1,258	zayıf
9	MSSA	1,7	1,809	1,428	1,646	1,467	zayıf
11	*S.epidermidis*	1,423	1,233	1,454	1,370	1,191	zayıf
12	MSSA	1,104	1,109	1,06	1,091	0,912	zayıf
13	MRSA	1,067	1,084	1,106	1,086	0,907	zayıf
14	MSSA	1,066	1,111	1,144	1,107	0,928	zayıf
16	MSSA	1,122	1,343	1,476	1,314	1,135	zayıf
17	MSSA	1,464	1,615	1,523	1,534	1,355	zayıf
18	*S.epidermidis*	2,298	2,472	2,361	2,377	2,198	orta
19	*S.epidermidis*	2,168	1,974	1,849	1,997	1,818	orta
21	MRSA	1,833	1,705	1,6	1,713	1,534	zayıf
22	MRSA	1,479	1,422	1,291	1,397	1,218	zayıf
26	MSSA	1,62	1,533	1,624	1,592	1,413	zayıf
40	MSSA	1,499	1,671	1,594	1,588	1,409	zayıf
42	MSSA	3,82	3,72	3,73	3,757	3,578	kuvvetli
45	MSSA	3,898	3,473	3,466	3,612	3,433	orta
49	MSSA	1,332	1,25	1,436	1,339	1,160	zayıf
53	*S.epidermidis*	1,12	1,172	1,261	1,184	1,005	zayıf
55	MSSA	1,701	1,707	1,886	1,765	1,586	zayıf
56	*S.epidermidis*	1,764	1,868	1,677	1,770	1,591	zayıf
58	MSSA	1,298	1,268	1,271	1,279	1,100	zayıf
59	MSSA	1,355	1,38	1,434	1,390	1,211	zayıf
60	MSSA	1,389	1,445	1,545	1,460	1,281	zayıf
61	MRSA	1,545	1,445	1,389	1,460	1,281	zayıf
63	MSSA	1,624	1,541	1,716	1,627	1,448	zayıf
64	MRSA	1,375	1,29	1,439	1,368	1,189	zayıf
65	MSSA	1,045	1,037	1,2	1,094	0,915	zayıf

Tablo 20 (devamı). Biyofilm pozitif örneklerin OD değerleri ve biyofilm

Örnek Numarası	Bakteri adı	OD 1	OD 2	OD 3	OD Ortalaması	OD_{ort}-$OD_{Besiyeri}$	Biyofilm Derecesi
66	MSSA	2,164	2,092	2,462	2,239	2,060	orta
67	MSSA	2,65	2,239	2,328	2,406	2,227	orta
73	MSSA	2,168	2,409	2,329	2,302	2,123	orta
76	MSSA	1,717	1,552	1,846	1,705	1,526	zayıf
80	*S.epidermidis*	1,584	1,599	1,662	1,615	1,436	zayıf
83	MSSA	1,217	1,369	1,428	1,338	1,159	zayıf
89	MSSA	3,41	3,98	3,861	3,750	3,571	kuvvetli
91	MSSA	1,74	1,81	1,378	1,643	1,464	zayıf
92	MSSA	3,471	3,382	3,84	3,564	3,385	orta
94	MSSA	3,764	3,849	3,863	3,825	3,646	kuvvetli
95	MSSA	1,327	1,211	1,177	1,238	1,059	zayıf
109	*S.epidermidis*	2,388	2,051	2,049	2,163	1,984	orta
110	*S.epidermidis*	2,593	2,345	2,862	2,600	2,421	orta
112	*S.epidermidis*	3,99	3,89	3,767	3,882	3,703	kuvvetli
114	MSSA	3,092	2,95	2,39	2,811	2,632	orta
115	MRSA	2,702	2,686	2,307	2,565	2,386	orta
116	MSSA	2,202	2,102	2,086	2,130	1,951	orta
121	MRSA	4,366	4,46	4,635	4,487	4,308	kuvvetli
127	*S.epidermidis*	3,541	3,166	3,577	3,428	3,249	orta
128	MRSA	3,76	3,25	3,733	3,581	3,402	orta
129	*S.epidermidis*	3,274	2,862	3,297	3,144	2,965	orta
130	MSSA	1,701	1,47	1,661	1,611	1,432	zayıf
132	MSSA	1,888	1,975	1,883	1,915	1,736	zayıf
133	MSSA	2,102	1,986	1,723	1,937	1,758	orta
136	MSSA	1,627	1,301	1,207	1,378	1,199	zayıf
141	MSSA	1,521	1,39	1,546	1,486	1,307	zayıf
145	MSSA	1,27	1,285	1,367	1,307	1,128	zayıf
150	*S.epidermidis*	3,132	3,111	2,951	3,065	2,886	orta
151	*S.epidermidis*	3,086	2,806	2,87	2,921	2,742	orta
152	*S.epidermidis*	1,582	1,677	1,784	1,681	1,502	zayıf
154	*S.epidermidis*	2,729	2,253	2,965	2,649	2,470	orta
M1	MRSA	2,221	2,028	2,163	2,137	1,958	orta
M2	MRSA	1,756	1,953	1,756	1,822	1,643	zayıf
M3	MRSA	1,421	1,529	1,454	1,468	1,289	zayıf
M7	MRSA	1,691	1,709	1,984	1,795	1,616	zayıf
M8	MRSA	1,293	1,441	1,558	1,431	1,252	zayıf
M11	MRSA	1,596	2,006	2,28	1,961	1,782	orta
M13	MRSA	2,103	2,037	2,082	2,074	1,895	orta
C1	*S.aureus* ATCC 6538	3,095	2,394	2,729	2,560	2,381	orta
C7	*S.epidermidis*NTCC 11047	2,231	2,599	2,771	2,355	2176	orta

Çalışılan izolatlar içerisinde MSSA, MRSA ve *S.epidermidis* izolatlarına ait, biyofilm düzeylerinin dağılımı ve yüzdeleri Tablo 21'de gösterilmiştir. Buna göre; zayıf düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 25'i (%59,53) MSSA, 12'si (%28,57) MRSA, 5'i (%11,90) *S. epidermidis* olarak tespit edildi. Orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların, 8'i (%36,36) MSSA, 5'i (%22,73) MRSA, 9'u (%40,91) *S.epidermidis* olarak tespit edilidi. Kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların ise, 3'ü (%60) MSSA, 1'i (%20) MRSA ve 1'i (%20) ise *S. epidermidis* olarak saptandı (Tablo 21).

Tablo 21. Çalışılan izolatların biyofilm düzeylerinin dağılımı ve yüzdeleri

Bakteri adı	Zayıf düzeyde biyofilm	Orta düzeyde biyofilm	Kuvvetli düzeyli biyofilm
MSSA	n=25 (%59,53)	n=8 (%36,36)	n=3 (%60)
MRSA	n=12 (%28,57)	n=5 (%22,73)	n=1 (%20)
S. epidermidis	n=5 (%11,90)	n=9 (%40,91)	n=1 (%20)
Toplam	n=42 (%100)	n=22 (%100)	n=5 (%100)

Biyofilm yapma düzeylerini tür düzeyinde değerlendirdiğimizde ise; toplam biyofilm pozitif 36 MSSA izolatlarının 25'i zayıf, 8'i orta, 3'ü ise kuvvetli düzeyde biyofilm oluşturdu. Biyofilm pozitif 18 MRSA izolatlarının ise 12'si zayıf, 5'i orta ve 1'i kuvvetli düzeyde biyofilm oluşturdu. Son olarak, biyofilm pozitif 15 *S. epidermidis* izolatlarının 5'i zayıf, 9'u orta ve 1'i kuvvetli düzeyde biyofilm oluşturdu.

EUCAST bakteriler için sınır değerleri kılavuzunda *S. aureus* izolatlarında vankomisin için 2 mg/L'nin üzerindeki, MİK değerleri dirençli olarak kabul edilmektedir. *S.epidermidis* izolatlarında vankomisin için 4 mg/L'nin üzerindeki MİK değerleri dirençli olarak kabul edilmektedir (181). MRSA türleri beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir. Stafilokoklar için ampisilin sınır değeri 0.25 µg/mL'dir.Bu değere göre 0.25 µg/mL'den büyük değerler dirençli kabul edilmektedir (180).

Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda incelendi. MİK sonuçları Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Stafilokok izolatlarının ampisilin vankomisin ve NAC duyarlılık sonuçları

İzolat numarası	Bakteri	Ampisilin MİK (µg/mL)	Vankomisin MİK (µg/mL)	NAC MİK (µg/mL)
1	MRSA	16	1	2038
2	MRSA	16	1	2038
3	MRSA	8	1	4075
4	MSSA	0,5	0,5	2038
8	MSSA	8	0,5	2038
9	MSSA	1	1	4075
11	*S.epidermidis*	8	1	4075
12	MSSA	0,125	1	2038
13	MRSA	16	0,5	4075
14	MSSA	0,063	0,5	4075
16	MSSA	0,031	0,5	2038
17	MSSA	0,125	1	4075
18	*S.epidermidis*	0,125	0,5	2038
19	*S.epidermidis*	0125	1	4075
21	MRSA	8	0,5	4075
22	MRSA	16	0,5	4075
26	MSSA	0,125	1	4075
40	MSSA	1	0,5	4075
42	MSSA	0,125	0,5	2038
45	MSSA	0,5	0,25	2038
49	MSSA	0,125	0,5	4075
53	*S.epidermidis*	>16	1	2038
55	MSSA	0,5	1	2038
56	*S.epidermidis*	0,5	1	2038
58	MSSA	1	0,5	2038
59	MSSA	0,5	0,5	4075
60	MSSA	2	0,5	4075
61	MRSA	8	0,5	4075
63	MSSA	1	1	4075
64	MRSA	16	0,5	2038
65	MSSA	16	1	2038
66	MSSA	4	1	2038
67	MSSA	1	1	2038
73	MSSA	2	0,5	4075
76	MSSA	1	0,5	4075
80	*S.epidermidis*	1	1	4075
83	MSSA	0,5	0,5	4075
89	MSSA	0,5	1	4075
91	MSSA	1	0,5	2038
92	MSSA	2	1	2038
94	MSSA	0,25	1	4075
95	MSSA	0,125	0,5	4075
109	*S.epidermidis*	0,125	0,5	4075

Tablo 22 (devamı). Stafilokok izolatlarının ampisilin vankomisin ve NAC duyarlılık sonuçları

İzolat numarası	Bakteri	Ampisilin MİK (µg/mL)	Vankomisin MİK (µg/mL)	NAC MİK (µg/mL)
110	*S.epidermidis*	16	1	2038
112	*S.epidermidis*	0,125	0,5	2038
114	MSSA	0,5	0,5	4075
115	MRSA	8	0,5	4075
116	MSSA	0,5	1	2038
121	MRSA	8	0,5	2038
127	*S.epidermidis*	8	1	4075
128	MRSA	8	0,5	2038
129	*S.epidermidis*	8	0,5	4075
130	MSSA	0,063	0,5	2038
132	MSSA	0,5	1	2038
133	MSSA	2	0,5	4075
136	MSSA	1	0,5	4075
141	MSSA	>16	0,5	2038
145	MSSA	0,063	1	2038
150	*S.epidermidis*	2	2	2038
151	*S.epidermidis*	0,5	2	2038
152	*S.epidermidis*	16	2	2038
154	*S.epidermidis*	8	2	2038
M1	MRSA	>16	1	2038
M2	MRSA	16	1	4075
M3	MRSA	16	1	2038
M7	MRSA	>16	1	2038
M8	MRSA	>16	1	4075
M11	MRSA	16	0,5	4075
M13	MRSA	>16	0,5	2038
C1	*S.aureus* ATCC 6538	0,5	1	2038
C2	*S.aureus* ATCC 29213	0,5	1	2038
C7	*S.epidermidis* NTCC 11047	0,5	0,5	2038

Ampisilin ve vankomisinin MİK değerleri üzerine NAC'ın etkisinin tespit edilmesinde dama tahtası yöntemi kullanıldı (192).

Biyofim oluşturma derecesine göre, başta kuvvetli ve orta düzeyde kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlar seçilerek çalışmaya 50 izolat ile devam edildi.

Dama tahtası testinde, ampisilin, vankomisin ve NAC'ın farklı konsantrasyonları (µg/mL), 96 kuyucuklu plak üzerinde karşılaştırılarak kombinasyon etkinlikleri test edildi. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri

oranlandı ve FİK bulundu. Ardından kombinasyondaki ilaçların FİK değerleri toplandı ve FİKİ hesaplandı. Her antimikrobiyal maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı izolatlara karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edildi (Şekil 30) (192,193). Her bir örneğin tablosu ve hesaplaması yapılmıştır. Bu kısımda tablo örneği ve FİK hesaplaması için 83 numaralı örnek seçilmiştir. Bu örneğin, ampisilin ve NAC için MİK değerleri ve FİK hesaplaması Tablo 23'te; vankomisin ve NAC'ın MİK değerleri ve FİK hesaplaması Tablo 24'te gösterilmiştir. Çalışılan örneklerin, ampisilin ve NAC'ın konsantrasyonları, FİK hesaplaması ve etkileşim türleri Tablo 25'te verilmiştir. Aynı zamanda çalışılan örneklerin, vankomisin ve NAC'ın konsantrasyonları, FİK hesaplaması ve etkileşim türleri Tablo 26'da verilmiştir.

$FİK\ A = MİKA_{kombinasyon}/MİKA$

$FİK\ B = MİKB_{kombinasyon}/MİKB$

$FİKİ = FİK\ A + FİK\ B$

$FİKİ \leq 0,5$ ise sinerjik etki
$0,5 < FİKİ \leq 4$ ise aditif etki
$FİKİ > 4$ ise antagonistik etki

Şekil 30. Antimikrobiyal duyarlılık için FİK değerlerinin hesaplanması (A:ampisilin veya vankomisinin konsatrasyonu B: NAC'ın konsantrasyonu)

Tablo 23. 83 numaralı izolat için ampisilin ve NAC kombinasyonunun MİK değerleri ve FİK hesaplanması

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0	0,25/0	0,125/0	0,063/0	0,031/0	0,016/0
B	0/4075	16/4075	8/4075	4/4075	2/4075	1/4075	0,5/4075	0,25/4075	0,125/4075	0,063/4075	0,031/4075	0,016/4075
C	0/2038	16/2038	8/2038	4/2038	2/2038	1/2038	0,5/2038	0,25/2038	0,125/2038	0,063/2038	0,031/2038	0,016/2038
D	0/1018	16/1018	8/1018	4/1018	2/1018	1/1018	0,5/1018	0,25/1018	0,125/1018	0,063/1018	0,031/1018	0,016/1038
E	0/509	16/509	8/509	4/509	2/509	1/509	0,5/509	0,25/509	0,125/509	0,063/509	0,031/509	0,016/509
F	0/254	16/254	8/254	4/254	2/254	1/254	0,5/254	0,25/254	0,125/254	0,063/254	0,031/254	0,016/254
G	0/127	16/127	8/127	4/127	2/127	1/127	0,5/127	0,25/127	0,125/127	0,063/127	0,031/127	0,016/127
H	0/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64	0,25/64	0,125/64	0,063/64	0,031/64	0,016/64

$FİK_{amp} = MİK_{amp\ kombinasyon}/MİK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MİK_{nac\ kombinasyon}/MİK_{nac}$ FİKİ =0,125 /0,5 + 509/4075 = 0,375 ≤ 0,5 sinerjik etki	$FİK_{amp} = MİK_{amp\ kombinasyon}/MİK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MİK_{nac\ kombinasyon}/MİK_{nac}$ FİKİ=0,25/0,5+127/4075=0,531 ≤ 4 sinerjik etki	$FİK_{amp} = MİK_{amp\ kombinasyon}/MİK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MİK_{nac\ kombinasyon}/MİK_{nac}$ FİKİ=0,5/0,5+64/4075=1,016 ≤ 4 Aditif Etki

Tablo 24. 83 numaralı izolat için vankomisin ve NAC kombinasyonunun MİK değerleri ve FİK hesaplanması

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	16/0	8/0	4/0	2/0	1/0	0,5/0	0,25/0	0,125/0	0,063/0	0,031/0	0,016/0
B	0/4075	16/4075	8/4075	4/4075	2/4075	1/4075	0,5/4075	0,25/4075	0,125/4075	0,063/4075	0,031/4075	0,016/4075
C	0/2038	16/2038	8/2038	4/2038	2/2038	1/2038	0,5/2038	0,25/2038	0,125/2038	0,063/2038	0,031/2038	0,016/2038
D	0/1018	16/1018	8/1018	4/1018	2/1018	1/1018	0,5/1018	0,25/1018	0,125/1018	0,063/1018	0,031/1018	0,016/1038
E	0/509	16/509	8/509	4/509	2/509	1/509	0,5/509	0,25/509	0,125/509	0,063/509	0,031/509	0,016/509
F	0/254	16/254	8/254	4/254	2/254	1/254	0,5/254	0,25/254	0,125/254	0,063/254	0,031/254	0,016/254
G	0/127	16/127	8/127	4/127	2/127	1/127	0,5/127	0,25/127	0,125/127	0,063/127	0,031/127	0,016/127
H	0/64	16/64	8/64	4/64	2/64	1/64	0,5/64	0,25/64	0,125/64	0,063/64	0,031/64	0,016/64

$FİK_{van} = MİK_{van\ kombinasyon}/MİK_{van}$ $FİK_{NAC} = MİK_{nac\ kombinasyon}/MİK_{nac}$ FİKİ =1 /2+ 1018/4075 = 0,749 ≤ 4 aditif etki	$FİK_{van} = MİK_{van\ kombinasyon}/MİK_{van}$ $FİK_{NAC} = MİK_{nac\ kombinasyon}/MİK_{nac}$ FİKİ =2/2 + 64/4075 = 1,016 ≤ 4 aditif etki

Tablo 25. Ampisilin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

İzolat Numarası	Ampisilin MİK (µg/mL)	NAC MİK (µg/mL)	Kombinasyon Amp/NAC Konsantrasyonu	FİKİ Değeri	Etkileşim Türü
1	16	2038	16/1018	1,499	**ADİTİF**
2	16	2038	0,063/2038	0,99	**ADİTİF**
			8/1018	0,99	**ADİTİF**
			16/64	1,031	**ADİTİF**
4	0,5	2038	0,031/2038	1,062	**ADİTİF**
			0,5/64	1,031	**ADİTİF**
8	8	2038	4/1018	0,99	**ADİTİF**
			8/64	1,031	**ADİTİF**
9	1	4075	0,5/1018	0,75	**ADİTİF**
			1/64	1,016	**ADİTİF**
11	8	4075	8/64	1,031	**ADİTİF**
12	0,125	2038	0,063/2038	1,056	**ADİTİF**
13	16	4075	0,063/2038	0,504	**SİNERJİK**
			4/1018	0,499	**SİNERJİK**
			16/64	1,016	**ADİTİF**
18	0,125	2038	0,125/2038	2	**ADİTİF**
19	0,125	4075	0,063/2038	1,004	**ADİTİF**
			0,125/1018	1,249	**ADİTİF**
21	8	4075	4/1018	0,749	**ADİTİF**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
22	16	4075	8/1018	0,749	**ADİTİF**
			16/64	1,016	**ADİTİF**
26	0,125	4075	0,063/2038	1,016	**ADİTİF**
			0,125/64	1,016	**ADİTİF**
40	1	4075	0,031/2038	0,531	**SİNERJİK**
			1/1018	1,5	**ADİTİF**
42	0,125	2038	0,031/2038	1,248	**ADİTİF**
			0,25/64	1,031	**ADİTİF**
45	1	2038	0,5/1018	0,99	**ADİTİF**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
49	0,125	4075	0,031/2038	0,748	**ADİTİF**
			0,125/64	0,752	**ADİTİF**
53	>16	2038	0,125/2038	1,039	**ADİTİF**
			4/1018	1,125	**ADİTİF**
56	1	2038	0,031/2038	1,031	**ADİTİF**
			4/1018	1,031	**ADİTİF**
59	0,5	4075	0,031/2038	0,5	**SİNERJİK**
			0,5/64	1,016	**ADİTİF**
60	2	4075	0,125/2038	0,5	**SİNERJİK**
			2/64	1,016	**ADİTİF**
61	8	4075	4/1018	0,749	**ADİTİF**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
64	16	2038	16/1018	1,499	**ADİTİF**
65	16	2038	16/64	1,031	**ADİTİF**
66	4	2038	4/1018	0,99	**ADİTİF**
67	1	2038	0,5/64	0,531	**SİNERJİK**
73	2	4075	0,031/2038	0,516	**SİNERJİK**
			2/64	1,016	**ADİTİF**

Tablo 25. (devamı) Ampisilin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

76	1	4075	0,063/2038	0,531	**SİNERJİK**
			2/64	1,016	**ADİTİF**
80	1	4075	0,125/2038	0,625	**ADİTİF**
			1/64	1,016	**ADİTİF**
83	0,5	4075	0,125/509	0,375	**SİNERJİK**
			0,125/127	0,531	**SİNERJİK**
			0,5/64	1,016	**ADİTİF**
91	1	2038	0,125/2038	0,624	**ADİTİF**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
92	2	2038	0,031/2038	1,016	**ADİTİF**
			2/1018	1,499	**ADİTİF**
			4/64	2,031	**ADİTİF**
109	0,125	4075	0,125/64	1,016	**ADİTİF**
110	16	2038	0,31/1018	0,501	**SİNERJİK**
			0,063/1018	0,503	**SİNERJİK**
			16/64	1,031	**ADİTİF**
112	0,125	2038	0,031/2038	1,248	**ADİTİF**
			0,125/64	1,031	**ADİTİF**
115	8	4075	0,063/2038	0,507	**SİNERJİK**
			0,125/2038	0,51	**SİNERJİK**
			0,25/2038	0,53	**SİNERJİK**
			4/1018	0,749	**ADİTİF**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
121	8	2038	4/1018	0,99	**ADİTİF**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
127	8	4075	0,063/2038	0,507	**SİNERJİK**
			0,125/2038	0,51	**SİNERJİK**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
129	8	4075	0,031/2038	0,5	**SİNERJİK**
			0,063/2038	0,507	**SİNERJİK**
			0,125/2038	0,5	**SİNERJİK**
			4/1018	0,75	**ADİTİF**
			8/64	1,016	**ADİTİF**
130	0,125	2038	0,031/2038	1,248	**ADİTİF**
			0,125/64	1,031	**ADİTİF**
136	1	4075	0,063/2038	0,5	**SİNERJİK**
			1/64	1,016	**ADİTİF**
141	>16	2038	16/1018	0,99	**ADİTİF**
152	16	2038	8/64	0,53	**SİNERJİK**
M1	>16	2038	0,031/2038	1	**ADİTİF**
			8/1018	0,749	**ADİTİF**
			16/509	0,749	**ADİTİF**
M2	16	4075	8/509	0,625	**ADİTİF**
			16/64	1,016	**ADİTİF**
M3	16	2038	0,125/2038	1,008	**ADİTİF**
			8/1018	0,99	**ADİTİF**
			16/64	1,031	**ADİTİF**
M7	>16	2038	0,031/2038	1	**ADİTİF**
M8	>16	4075	0,125/2038	0,504	**SİNERJİK**
			0,25/2038	0,507	**SİNERJİK**
			0,5/2038	0,515	**SİNERJİK**
			1/2038	0,531	**SİNERJİK**
			8/1018	0,499	**SİNERJİK**
			16/64	0,516	**SİNERJİK**

Tablo 25. (devamı) Ampisilin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

M11	16	4075	0,125/2038	0,5	**SİNERJİK**
			0,5/2038	0,51	**SİNERJİK**
			8/1018	0,75	**ADİTİF**
			16/64	1,016	**ADİTİF**
M13	>16	2038	0,125/2038	1,004	**ADİTİF**
C1	0,5	2038	0,125/1018	0,75	**ADİTİF**
C2	0,5	2038	0,25/64	0,53	**SİNERJİK**
C7	0,5	2038	0,125/1018	0,75	**ADİTİF**

Tablo 26. Vankomisin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

İzolat Numarası	**Vankomisin MİK (µg/mL)**	**NAC MİK (µg/mL)**	**Kombinasyon Van/NAC Konsantrasyonu**	**FİKİ değeri**	**Etkileşim Türü**
1	1	2038	1/64	1,016	**ADİTİF**
2	1	2038	1/64	1,125	**ADİTİF**
4	1	2038	0,031/2038	1,031	**ADİTİF**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
8	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
9	1	4075	1/64	1,031	**ADİTİF**
11	1	4075	1/64	1,031	**ADİTİF**
12	1	2038	1/64	1,016	**ADİTİF**
13	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
18	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
19	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
21	0,5	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
22	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
26	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
40	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
42	0,5	2038	0,031/2038	1,062	**ADİTİF**
			0,5/64	1,031	**ADİTİF**
45	0,25	2038	0,5/64	1,031	**ADİTİF**
49	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
53	2	2038	0,25/2038	1,125	**ADİTİF**
			2/64	1,031	**ADİTİF**
56	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
59	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
60	1	4075	0,031/2038	0,53	**SİNERJİK**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
61	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
64	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
65	1	2038	0,5/1018	0,53	**SİNERJİK**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
66	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
67	1	2038	0,031/2038	1,031	**ADİTİF**
			0,5/64	0,53	**SİNERJİK**
73	1	4075	0,5/509	0,625	**ADİTİF**
			1/64	1,016	**ADİTİF**
76	0,5	4075	0,5/1018	0,749	**ADİTİF**
			1/64	1,016	**ADİTİF**

Tablo 26. (devamı) Vankomisin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

80	2	4075	2/64	1,016	**ADİTİF**
83	2	4075	1/1018	0,749	**ADİTİF**
			2/64	1,016	**ADİTİF**
91	0,5	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
92	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
109	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
110	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
112	0,5	2038	0,5/64	1,031	**ADİTİF**
115	0,5	4075	1/64	1,031	**ADİTİF**
121	0,5	2038	0,5/64	1,031	**ADİTİF**
127	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
129	0,5	4075	0,25/2038	0,75	**ADİTİF**
			0,5/254	1	**ADİTİF**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
130	1	2038	0,5/2038	1,5	**ADİTİF**
			1/64	1,031	**ADİTİF**
136	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
141	1	2038	1/64	1,016	**ADİTİF**
152	4	2038	4/64	1,031	**ADİTİF**
M1	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
M2	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
M3	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
M7	1	2038	1/64	1,016	**ADİTİF**
M8	1	4075	1/64	1,016	**ADİTİF**
M11	0,5	4075	0,5/64	1,016	**ADİTİF**
M13	0,5	2038	0,5/64	1,031	**ADİTİF**
C1	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
C2	1	2038	1/64	1,031	**ADİTİF**
C7	0,5	2038	0,25/1018	1	**ADİTİF**

Antibiyofilm aktivite deneyinde, kullanılacak olan bakteri inokulumunun standartizasyonunu sağlamak için, kontrol ve deney mikroplaklarında biyofilm oluşturulduktan sonra bakteri sayımı yapılmıştır. Bakteri sayımı için mikroplaklar 5 kez PBS çözeltisi ile yıkanmış ardından üzerine besiyeri eklenerek, sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Ardından sulandırma işlemi yapılarak, MHA agara yoğun ekim yapılmıştır. İzolat numaraları, sayım için kullanılan seyreltme oranı; bunu takiben elde edilen sayım sonuçları ve inokulum miktarları Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. İzolat numaraları ve biyofilmdeki bakteri inokulumu

İzolat Numarası	Bakteri	Seyreltme Oranı	Sayım Sonucu-Kontrol I	Sayım Sonucu-Kontrol II	İnokulum
1	MRSA	1/10000	690	580	**$6x10^6$**
2	MRSA	1/10000	253	255	**$2x10^6$**
4	MSSA	1/10000	587	498	**$5x10^6$**
8	MSSA	1/10000	562	405	**$5x10^6$**
9	MSSA	1/10000	496	390	**$4x10^6$**
11	*S.epidermidis*	1/10000	310	320	**$3x10^6$**
12	MSSA	1/10000	526	486	**$5x10^6$**
13	MRSA	1/10000	145	105	**$1x10^6$**
18	*S.epidermidis*	1/10000	305	304	**$3x10^6$**
19	*S.epidermidis*	1/10000	210	190	**$2x10^6$**
21	MRSA	1/10000	182	120	**$1x10^6$**
22	MRSA	1/10000	432	390	**$4x10^6$**
26	MSSA	1/10000	577	570	**$5x10^6$**
40	MSSA	1/10000	150	110	**$1x10^6$**
42	MSSA	1/10000	944	988	**$9x10^6$**
45	MSSA	1/10000	505	406	**$5x10^6$**
49	MSSA	1/10000	214	290	**$2x10^6$**
53	*S.epidermidis*	1/10000	820	790	**$8x10^6$**
56	*S.epidermidis*	1/10000	928	928	**$9x10^6$**
59	MSSA	1/10000	201	290	**$2x10^6$**
60	MSSA	1/10000	200	189	**$2x10^6$**
61	MRSA	1/10000	183	190	**$1x10^6$**
64	MRSA	1/10000	405	290	**$3x10^6$**
65	MSSA	1/10000	380	240	**$3x10^6$**
66	MSSA	1/10000	550	390	**$4x10^6$**
67	MSSA	1/10000	298	290	**$2x10^6$**
73	MSSA	1/10000	310	280	**$2x10^6$**
76	MSSA	1/10000	120	110	**$1x10^6$**
80	*S.epidermidis*	1/10000	600	488	**$5x10^6$**
83	MSSA	1/10000	698	598	**$6x10^6$**
91	MSSA	1/10000	920	990	**$9x10^6$**
92	MSSA	1/10000	414	402	**$4x10^6$**
109	*S.epidermidis*	1/10000	115	110	**$1x10^6$**
110	*S.epidermidis*	1/10000	445	370	**$4x10^6$**
112	*S.epidermidis*	1/10000	990	890	**$9x10^6$**
115	MRSA	1/10000	380	304	**$3x10^6$**
121	MRSA	1/10000	989	968	**$9x10^6$**
127	*S.epidermidis*	1/10000	580	578	**$5x10^6$**
129	*S.epidermidis*	1/10000	108	128	**$1x10^6$**
130	MSSA	1/10000	870	880	**$8x10^6$**
136	MSSA	1/10000	780	790	**$7x10^6$**
141	MSSA	1/10000	278	260	**$2x10^6$**
152	*S.epidermidis*	1/10000	408	290	**$3x10^6$**
M1	MRSA	1/10000	126	190	**$1x10^6$**
M2	MRSA	1/10000	795	658	**$7x10^6$**
M3	MRSA	1/10000	214	386	**$3x10^6$**
M7	MRSA	1/10000	562	590	**$5x10^6$**
M8	MRSA	1/10000	383	394	**$3x10^6$**
M11	MRSA	1/10000	296	268	**$2x10^6$**
M13	MRSA	1/10000	228	198	**$2x10^6$**
C1	*S.aureus* ATCC 6538	1/10000	920	894	**$9x10^6$**
C2	*S.aureus* ATCC 29213	-	-	-	-
C7	*S.epidermidis* NTCC 11047	1/10000	980	898	**$9x10^6$**

Ampisilin ve vankomisinin MBEK değerleri üzerine NAC'ın etkisinin tespit edilmesinde dama tahtası yöntemi kullanıldı (182).

İlaçların kombinasyondan elde edilen MBEK değerleriyle tek başlarına olan MBEK değerleri oranlandı ve FİK bulundu. Ardından kombinasyondakiilaçların FİK değerleri toplandı ve FİKİ hesaplandı. Her bir maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antibiyofilm madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı izolata karşı saptanan MBEK değerine bölünmesi ile elde edildi (182,193). Hesaplamanın formülü Şekil 31'de verilmiştir. Her bir örneğin tablosu ve hesaplaması yapılmıştır. Bu kısımda tablo örneği ve FİK hesaplaması için 136 numaralı örnek seçilmiştir. Bu örneğin ampisilin ve NAC için MBEK değerleri ve FİK hesaplaması Tablo 28'de; vankomisin ve NAC'ın MBEK değerleri ve FİK hesaplaması Tablo 29'da gösterilmiştir. Çalışılan örneklerin, antibiyofilm aktivite için, ampisilin ve NAC'ın konsantrasyonları, FİK hesaplaması ve etkileşim türleri Tablo 30'da verilmiştir. Aynı zamanda çalışılan örneklerin, antibiyofilm aktivite için, vankomisin ve NAC'ın konsantrasyonları, FİK hesaplaması ve etkileşim türleri Tablo 31'de verilmiştir.

$FİK\ A = MBEKA_{kombinasyon}/MBEKA$

$FİK\ B = MBEKB_{kombinasyon}/MBEKB$

$FİK = FİK\ A + FİK\ B$

$FİKİ \leq 0{,}5$ ise sinerjik etki
$0{,}5 < FİKİ \leq 4$ ise aditif etki
$FİKİ > 4$ ise antagonistik etki

Şekil 31. Antibiyofilm aktivite için FİK Değerlerinin Hesaplanması (A:ampisilin veya vankomisinin konsatrasyonu B: NAC'ın konsantrasyonu)

Tablo 28. 136 numaralı izolat için ampisilin ve NAC kombinasyonunun MBEK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	4000/0	2000/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	62,5/0	31,25/0	15,63/0	7,81/0	3,90/0
B	0/8192	4000/8192	2000/8192	1000/8192	500/8192	250/8192	125/8192	62,5/8192	31,25/8192	15,63/8192	7,81/8192	3,90/8192
C	0/4096	4000/4096	2000/4096	1000/4096	500/4096	250/4096	125/4096	62,5/4096	31,25/4096	15,63/4096	7,81/4096	3,90/4096
D	0/2048	4000/2048	2000/2048	1000/2048	500/2048	250/2048	125/2048	62,5/2048	31,25/2048	15,63/2048	7,81/2048	3,90/2048
E	0/1024	4000/1024	2000/1024	1000/1024	500/1024	250/1024	125/1024	62,5/1024	31,25/1024	15,63/1024	7,81/1024	3,90/1024
F	0/512	4000/512	2000/512	1000/512	500/512	250/512	125/512	62,5/512	31,25/512	15,63/512	7,81/512	3,90/512
G	0/256	4000/256	2000/256	1000/256	500/256	250/256	125/256	62,5/256	31,25/256	15,63/256	7,81/256	3,90/256
H	0/128	4000/128	2000/128	1000/128	500/128	250/128	125/128	62,5/128	31,25/128	15,63/128	7,81/128	3,90/128

$FİK_{amp} = MBEK_{amp\ kombinasyon}/MBEK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =62,5/1000+2048/8192 = 0,313≤ 0,5sinerjik etki	$FİK_{amp} = MBEK_{ampkombinasyon}/MBEK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =250/1000+512/8192 = 0,313 ≤ 0,5sinerjik etki	$FİK_{amp} = MBEK_{ampkombinasyon}/MBEK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =1000/1000+128/8192 = 1,016 ≤ 4 aditif etki
$FİK_{amp} = MBEK_{ampkombinasyon}/MBEK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =125/1000+1024/8192 = 0,25 ≤ 0,5sinerjik etki	$FİK_{amp} = MBEK_{ampkombinasyon}/MBEK_{amp}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =500/1000+256/8192 = 0,531 ≤ 0,5sinerjik etki	

Tablo 29. 136 numaralı izolat için vankomisin ve NAC kombinasyonunun MBEK değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	4000/0	2000/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	62,5/0	31,25/0	15,63/0	7,81/0	3,90/0
B	0/8192	4000/8192	2000/8192	1000/8192	500/8192	250/8192	125/8192	62,5/8192	31,25/8192	15,63/8192	7,81/8192	3,90/8192
C	0/4096	4000/4096	2000/4096	1000/4096	500/4096	250/4096	125/4096	62,5/4096	31,25/4096	15,63/4096	7,81/4096	3,90/4096
D	0/2048	4000/2048	2000/2048	1000/2048	500/2048	250/2048	125/2048	62,5/2048	31,25/2048	15,63/2048	7,81/2048	3,90/2048
E	0/1024	4000/1024	2000/1024	1000/1024	500/1024	250/1024	125/1024	62,5/1024	31,25/1024	15,63/1024	7,81/1024	3,90/1024
F	0/512	4000/512	2000/512	1000/512	500/512	250/512	125/512	62,5/512	31,25/512	15,63/512	7,81/512	3,90/512
G	0/256	4000/256	2000/256	1000/256	500/256	250/256	125/256	62,5/256	31,25/256	15,63/256	7,81/256	3,90/256
H	0/128	4000/128	2000/128	1000/128	500/128	250/128	125/128	62,5/128	31,25/128	15,63/128	7,81/128	3,90/128

$FİK_{van} = MBEK_{van\ kombinasyon}/MBEK_{van}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =1000/2000+512/8192 = 0,503≤ 0,5sinerjik etki	$FİK_{van} = MBEK_{van\ kombinasyon}/MBEK_{van}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =1000/2000+1024/8192 = 0,625 ≤ 4 adetif etki	$FİK_{van} = MBEK_{van\ kombinasyon}/MBEK_{van}$ $FİK_{NAC} = MBEK_{nac\ kombinasyon}/MBEK_{nac}$ FİKİ =2000/2000+128/8192 = 1,016 ≤ 4 adetif etki

Tablo 30. Ampisilin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

İzolat Numarası	Ampisilin MBEK (µg/mL)	NAC MBEK (µg/mL)	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	FİKİ	Etkileşim Türü
1	2000	4096	1000/2048	1	**ADİTİF**
			2000/128	1,031	**ADİTİF**
2	>4000	8192	4000/4096	1	**ADİTİF**
4	2000	4096	500/128	0,53	**SİNERJİK**
8	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
9	1000	4096	31,25/2048	0,531	**SİNERJİK**
			250/256	0,313	**SİNERJİK**
11	62,5	4096	62,5/128	1,031	**ADİTİF**
12	>4000	4096	500/2048	0,56	**SİNERJİK**
			2000/512	0,375	**SİNERJİK**
13	2000	8192	250/2048	0,503	**SİNERJİK**
			1000/512	0,56	**SİNERJİK**
18	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
19	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
21	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
22	1000	8192	1000/8192	2	**ADİTİF**
26	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
40	1000	8192	1000/128	1,061	**ADİTİF**
42	1000	4096	15,63/2048	0,52	**SİNERJİK**
			500/256	0,56	**SİNERJİK**
45	500	4096	250/512	0,625	**ADİTİF**
53	250	4096	125/1024	0,75	**ADİTİF**
56	>4000	4096	125/2048	0,516	**SİNERJİK**
			1000/256	0,19	**SİNERJİK**
59	500	4096	7,81/2048	0,516	**SİNERJİK**
			125/512	0,375	**SİNERJİK**
60	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
61	2000	4096	7,81/2048	0,503	**SİNERJİK**
64	1000	4096	125/2048	0,625	**ADİTİF**
66	>4000	2048	31,25/2048	1,004	**ADİTİF**
67	1000	4096	125/2048	0,625	**ADİTİF**
73	>4000	4096	2000/2048	0,75	**ADİTİF**
76	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**

Tablo 30. (devamı) Ampisilin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü

80	500	4096	250/2048	1	**ADİTİF**
83	31,25	4096	7,81/1024	0,499	**SİNERJİK**
			31,25/128	1,031	**ADİTİF**
91	>4000	4096	62,5/2048	0,507	**SİNERJİK**
92	>4000	4096	2000/2048	0,75	**ADİTİF**
109	1000	4096	500/1024	0,75	**ADİTİF**
			1000/128	1,031	**ADİTİF**
110	4000	4096	4000/4096	2	**ADİTİF**
112	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
115	4000	4096	62,5/2048	0,508	**SİNERJİK**
			500/256	0,19	**SİNERJİK**
121	>4000	4096	500/4096	1,125	**ADİTİF**
127	>4000	4096	4000/4096	2	**ADİTİF**
129	500	8192	62,5/1024	0,25	**SİNERJİK**
			250/256	0,531	**SİNERJİK**
130	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
136	1000	8192	62,5/2048	0,313	**SİNERJİK**
			125/1024	0,25	**SİNERJİK**
			250/512	0,313	**SİNERJİK**
			500/256	0,531	**SİNERJİK**
			1000/128	1,016	**ADİTİF**
141	>4000	4096	125/2048	0,516	**SİNERJİK**
152	125	4096	62,5/128	0,531	**SİNERJİK**
M1	>4000	4096	4000/4096	2	**ADİTİF**
M2	>4000	4096	4000/4096	2	**ADİTİF**
M3	>4000	4096	2000/4096	1,5	**ADİTİF**
M7	>4000	4096	500/2048	0,56	**SİNERJİK**
			4000/1024	0,75	**ADİTİF**
M8	>4000	8192	4000/8192	1,5	**ADİTİF**
M11	2000	4096	7,81/4096	1,004	**ADİTİF**
M13	>4000	8192	4000/8192	1,5	**ADİTİF**
C1	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
C2	-	-	-	-	-
C7	>4000	4096	15,63/2048	0,502	**SİNERJİK**
			125/128	0,048	**SİNERJİK**

Tablo 31. Vankomisin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK değerleri ve etkileşim türü

İzolat Numarası	Vankomisin MBEK (µg/mL)	NAC MBEK (µg/mL)	Kombinasyon Amp/NAC MBEK	FİKİ	Etkileşim Türü
2	4000	8192	2000/1024	0,625	**ADİTİF**
4	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
8	1000	4096	1000/128	1,031	**ADİTİF**
9	>4000	4096	4000/4096	1,5	**ADİTİF**
11	2000	4096	1000/256	0,56	**SİNERJİK**
			2000/128	1,031	**ADİTİF**
12	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
13	>4000	8192	2000/2048	0,5	**SİNERJİK**
18	1000	4096	7,81/2048	0,508	**SİNERJİK**
			62,5/1024	0,313	**SİNERJİK**
			500/512	0,625	**ADİTİF**
19	4000	4096	2000/512	0,625	**ADİTİF**
			4000/128	1,031	**ADİTİF**
21	4000	4096	500/8192	2,125	**ADİTİF**
			2000/4096	1,5	**ADİTİF**
			4000/128	1,031	**ADİTİF**
22	>4000	8192	4000/4096	1	**ADİTİF**
26	4000	4096	1000/2048	0,75	**ADİTİF**
			2000/256	0,56	**SİNERJİK**
42	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
61	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
80	500	4096	250/2048	1	**ADİTİF**
			500/128	1,031	**ADİTİF**
109	2000	4096	100/1024	0,75	**ADİTİF**
110	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
112	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
115	4000	4096	62,5/2048	0,52	**SİNERJİK**
			2000/1024	0,75	**ADİTİF**
121	2000	4096	31,25/2048	0,515	**SİNERJİK**
			1000/512	0,625	**ADETİF**
127	1000	4096	1000/128	1,031	**ADİTİF**
130	2000	4096	1000/1024	0,75	**ADİTİF**
			2000/128	1,031	**ADİTİF**

Tablo 31. (devamı) Vankomisin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİK değerleri ve etkileşim türü

136	2000	8192	1000/512	0,56	**SİNERJİK**
141	2000	4096	1000/1024	0,75	**SİNERJİK**
			2000/128	1,031	**ADİTİF**
M1	500	4096	62,5/2048	0,625	**ADİTİF**
M2	2000	8192	500/2048	0,5	**SİNERJİK**
			2000/1024	1,125	**ADİTİF**
M3	1000	4096	500/1024	0,75	**ADİTİF**
M7	2000	4096	2000/128	1,031	**ADİTİF**
M8	4000	8192	2000/2048	0,75	**ADİTİF**
M11	2000	4096	62,5/2048	0,531	**SİNERJİK**
			500/512	0,188	**SİNERJİK**
M13	4000	8192	2000/1024	0,625	**ADİTİF**
C1	2000	4096	2000/2048	1,5	**ADİTİF**
C2	-	-	-	-	**-**
C7	2000	4096	2000/2048	1,5	**ADİTİF**

Antibiyofilm aktivite için, FİK değerlerine göre etkileşim gözlenen kuyucuklardan ekim yapılarak, eradike olan bakteri miktarı tespit edilmiştir. Çalışılan bakterilerin ampisilin ve NAC kombinasyonlarındaki ekim sonuçları Tablo 32'de verilmiştir. Çalışılan izolatların, vankomisin ve NAC kombinasyonlarındaki ekim sonuçları Tablo 33'te verilmiştir. Kontrol kuyucuklarına göre etkileşim gözlenen konsantrasyonlardaki bakteri inokulumdaki azalma $\log_{10}$'a göre hesaplanmıştır.

Tablo 32. Ampisilin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve $\log_{10}$'na göre azalan bakteri inokulumu

İzolat Numarası	**Kontrol Kuyucuğu Bakteri Miktarı (CFU/mL)**	**Kombinasyon Amp/NAC Konsantrasyonu**	**Kombinasyon Kuyucuğu Bakteri Miktarı(CFU/mL)**	**AzalmaOranı**	**Etkileşim Türü**
1	$6x10^6$	1000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
		2000/128	10	**5 log**	**ADİTİF**
2	$2x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
4	$5x10^6$	500/128	0	**6 log**	**SİNERJİK**

Tablo 32. (devamı) Ampisilin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu

8	$5x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
9	$4x10^6$	31,25/2048	60	**5 log**	**SİNERJİK**
		250/256	60	**5 log**	**SİNERJİK**
11	$3x10^6$	62,5/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
12	$5x10^6$	500/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		2000/512	0	**6 log**	**SİNERJİK**
13	$1x10^6$	250/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		1000/512	48	**5 log**	**SİNERJİK**
18	$3x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
19	$2x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
21	$1x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
22	$4x10^6$	1000/8192	0	**6 log**	**ADİTİF**
26	$5x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
40	$1x10^6$	1000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
42	$9x10^6$	15,63/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		500/256	3	**6 log**	**SİNERJİK**
45	$5x10^6$	250/512	87	**5 log**	**ADİTİF**
53	$8x10^6$	125/1024	0	**6 log**	**ADİTİF**
56	$9x10^6$	125/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		1000/256	75	**5 log**	**SİNERJİK**
59	$2x10^6$	7,81/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		125/512	23	**5 log**	**SİNERJİK**
60	$2x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
61	$1x10^6$	7,81/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
64	$3x10^6$	125/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
66	$4x10^6$	31,25/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
67	$2x10^6$	125/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
73	$2x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
76	$1x10^6$	4000/4096	95	**5 log**	**ADİTİF**
80	$5x10^6$	250/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
83	$6x10^6$	7,81/1024	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		31,25/128	90	**5 log**	**ADİTİF**
91	$9x10^6$	62,5/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
92	$4x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**

Tablo 32. (devamı) Ampisilin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu

109	$1x10^6$	500/1024	0	**6 log**	**ADİTİF**
		1000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
110	$4x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
112	$9x10^6$	4000/4096	10	**6 log**	**ADİTİF**
115	$3x10^6$	62,5/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		500/256	0	**6 log**	**SİNERJİK**
121	$9x10^6$	500/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
127	$5x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
129	$1x10^6$	62,5/1024	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		250/256	0	**6 log**	**SİNERJİK**
130	$8x10^6$	4000/4096	23	**5 log**	**ADİTİF**
136	$7x10^6$	62,5/2048	68	**5 log**	**SİNERJİK**
		125/1024	58	**5 log**	**SİNERJİK**
		250/512	51	**5 log**	**SİNERJİK**
		500/256	31	**5 log**	**SİNERJİK**
		1000/128	48	**5 log**	**ADİTİF**
141	$2x10^6$	125/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
152	$3x10^6$	62,5/128	0	**6 log**	**SİNERJİK**
M1	$1x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
M2	$7x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
M3	$3x10^6$	2000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
M7	$5x10^6$	500/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		4000/1024	0	**6 log**	**ADİTİF**
M8	$3x10^6$	4000/8192	0	**6 log**	**ADİTİF**
M11	$2x10^6$	7,81/4096	0	6 log	**ADİTİF**
M13	$2x10^6$	4000/8192	0	**6 log**	**ADİTİF**
C1	$9x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
C2	-	-	-	-	-
C7	$9x10^6$	15,63/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		125/128	90	**5 log**	**SİNERJİK**

Tablo 33. Vankomisin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu

İzolat Numarası	Kontrol Kuyucuğu Bakteri İnokulumu	Kombinasyon Van/NAC Konsantrasyonu	Kombinasyon Kuyucuğu Bakteri İnokulumu	Azalan Bakteri İnokulumu	Etkileşim Türü
2	$2x10^6$	2000/1024	19	**5 log**	**ADİTİF**
4	$5x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
8	$5x10^6$	1000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
9	$4x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
11	$3x10^6$	1000/256	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
12	$5x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
13	$1x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
18	$3x10^6$	7,81/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		62,5/1024	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		500/512	90	**5 log**	**ADİTİF**
19	$2x10^6$	2000/512	0	**6 log**	**ADİTİF**
		4000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
21	$1x10^6$	500/8192	0	**6 log**	**ADİTİF**
		2000/4096	11	**5 log**	**ADİTİF**
		4000/128	24	**5 log**	**ADİTİF**
22	$4x10^6$	4000/4096	0	**6 log**	**ADİTİF**
26	$5x10^6$	1000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
		2000/256	0	**6 log**	**SİNERJİK**
42	$9x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
61	$1x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
80	$5x10^6$	250/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
		500/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
109	$1x10^6$	100/1024	0	**6 log**	**ADİTİF**
110	$4x10^6$	2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
112	$9x10^6$	2000/128	48	**5 log**	**ADİTİF**
115	$3x10^6$	62,5/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		2000/1024	0	**6 log**	**ADİTİF**
121	$9x10^6$	31,25/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		1000/512	23	**5 log**	**ADİTİF**

Tablo 33. (devamı) Vankomisin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu

127	$5x10^6$	1000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
130	$8x10^6$	1000/1024	18	**5 log**	**ADİTİF**
		2000/128	30	**5 log**	**ADİTİF**
136	$7x10^6$	1000/512	0	**6 log**	**SİNERJİK**
141	$2x10^6$	1000/1024	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		2000/128	0	**6 log**	**ADİTİF**
M1	$1x10^6$	62,5/2048	15	**5 log**	**ADİTİF**
M2	$7x10^6$	500/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		2000/1024	39	**5 log**	**ADİTİF**
M3	$3x10^6$	500/1024	14	**5 log**	**ADİTİF**
M7	$5x10^6$	2000/128	26	**5 log**	**ADİTİF**
M8	$3x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
M11	$2x10^6$	7,81/2048	0	**6 log**	**SİNERJİK**
		500/512	21	**5 log**	**SİNERJİK**
M13	$2x10^6$	2000/1024	14	**5 log**	**ADİTİF**
C1	$9x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**
C2	-	-	-		-
C7	$9x10^6$	2000/2048	0	**6 log**	**ADİTİF**

icaA, icaD ve *sarA* genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine NAC'ın etkisinin saptanması için bu genlerinin değişik koşullarda ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir: *i)*NAC ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı (kontrol), *ii)* NAC ve antibiyotikleri içeren besiyerinde üretilen kültür ortamı

Kontrol kuyucuğu ve ampisilinile NAC arasında sinerjik etkitespit edilen kuyucuklardaki örneklerin qRT-PCR sonuçları, Tablo 34'te verilmiştir. Tablo 34'te verilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan, rRNA genine rölatif ekspresyon seviyeleri Tablo 35'te verilmiştir. Kontrol kuyucuğunda elde edilen gen ekspresyon seviyesi değerleri kullanılarak normalizasyon yapılmış ve değerler oranlanarak tekrar hesaplanmıştır (Tablo 36). Tablo 36'da verilen değerler kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (Tablo 37). Kontrolün rölatif gen ekspresyon seviyesinin, ampisilin ve NAC'ın sinerjik etki gösterdiği konsantrasyonlardaki rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olması beklenmektedir. Kontrol grubunda *icaD* gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir ($t=1,805$; $df=50$; $p<0,05$). İki grup

arasında *icaA* gen ekspresyonu seviyesi farklıdır (t=0,488; df=50; p>0,05). İki grup arasında *sarA* gen ekspresyonu seviyesi farklıdır (t=0,368; df=50; p>0,05).

Tablo 34. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması

	Ct Sayıları				Ct Sayıları			
	Kontrol kuyucuğu				Ampisilin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk			
Örnek Adı	16S rRNA	icaD	icaA	SarA	16S rRNA	icaD	icaA	SarA
61 AMP	21,00	22,56	23,08	23,75	17,67	18,46	18,93	19,48
141 AMP	21,06	22,74	23,12	24,06	20,83	21,69	22,18	21,82
115 AMP A	19,67	20,84	21,06	21,77	20,28	21,28	21,74	22,19
115 AMP B	19,67	20,84	21,07	21,78	20,38	21,36	21,62	22,34
9 AMP A	20,78	22,74	23,57	23,63	21,46	23,58	24,19	23,38
9 AMP B	20,78	22,74	23,58	23,64	22,05	24,49	24,64	23,50
59 AMP A	18,85	18,78	19,51	19,80	22,20	23,71	24,42	24,91
59 AMP B	18,85	18,78	19,51	19,80	19,04	19,06	19,13	18,61
13 AMP A	18,66	19,26	16,68	17,37	27,53	25,89	20,51	20,17
13 AMP B	18,66	19,26	16,69	17,37	25,28	22,11	22,12	21,39
136 AMP A	21,17	19,60	19,12	19,48	20,58	21,82	22,19	21,48
136 AMP B	21,17	19,60	19,13	19,48	21,07	22,04	22,32	23,49
136 AMP C	21,17	19,60	19,14	19,48	20,42	21,88	22,58	23,41
136 AMP D	21,17	19,60	19,15	19,48	20,72	22,08	22,47	22,94
42 AMP	24,82	16,23	21,55	20,97	23,94	18,54	18,84	18,07
83 AMP	20,82	22,49	23,09	23,06	28,05	32,98	36,04	35,34
91 AMP	21,01	22,47	22,87	23,37	25,13	25,85	25,70	24,96
M7 AMP	18,54	20,04	20,57	19,62	23,66	21,13	22,87	23,00
12 AMP A	18,36	18,57	21,47	18,66	22,42	20,40	21,79	21,54
12 AMP B	18,36	18,57	21,47	18,66	23,71	22,47	22,95	21,92
129 AMP A	20,88	23,64	40,00	29,67	20,92	23,72	40,00	27,24
129 AMP B	20,88	23,64	40,00	29,67	23,97	23,43	40,00	32,29
56 AMP A	18,64	24,86	40,00	35,80	23,96	24,60	40,00	36,31
56 AMP B	18,64	24,86	40,00	35,80	21,19	23,88	40,13	38,28
C7 AMP A	18,18	22,35	40,00	37,79	25,69	22,65	40,00	33,64
C7 AMP B	18,18	22,35	40,00	37,79	22,75	22,61	38,78	35,81

Tablo 35. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri

	RQ			RQ		
	Kontrol kuyucuğu			Ampisilin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
61 AMP	0,339	0,237	0,149	0,578	0,418	0,285
141 AMP	0,312	0,240	0,125	0,551	0,392	0,503
115 AMP A	0,444	0,382	0,233	0,500	0,363	0,266
115 AMP B	0,444	0,379	0,232	0,507	0,423	0,257
9 AMP A	0,257	0,145	0,139	0,230	0,151	0,264
9 AMP B	0,257	0,144	0,138	0,184	0,166	0,366
59 AMP A	1,050	0,633	0,518	0,351	0,215	0,153
59 AMP B	1,050	0,633	0,518	0,986	0,940	1,347
13 AMP A	0,660	3,945	2,445	3,117	129,787	164,279
13 AMP B	0,660	3,918	2,445	9,000	8,938	14,825
136 AMP A	2,969	4,141	3,227	0,423	0,328	0,536
136 AMP B	2,969	4,112	3,227	0,511	0,420	0,187
136 AMP C	2,969	4,084	3,227	0,363	0,224	0,126
136 AMP D	2,969	4,056	3,227	0,390	0,297302	0,215
42 AMP	385,343	9,646	14,420	42,224	34,297	58,485
83 AMP	0,314	0,207	0,212	0,033	0,004	0,006
91 AMP	0,363	0,275	0,195	0,607	0,674	1,125
M7 AMP	0,354	0,245	0,473	5,776	1,729	1,580
12 AMP A	0,865	0,116	0,812	4,056	1,548	1,840
12 AMP B	0,865	0,116	0,812	2,362	1,693	3,458
129 AMP A	0,148	0,000	0,002	0,144	0,000	0,013
129 AMP B	0,148	0,000	0,002	1,454	0,000	0,003
56 AMP A	0,013	0,000	0,000	0,642	0,000	0,000
56 AMP B	0,013	0,000	0,000	0,155	0,000	0,000
C7 AMP A	0,056	0,000	0,000	8,225	0,000	0,004
C7 AMP B	0,056	0,000	0,000	1,102	0,000	0,000

Tablo 36. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları

	Normalize Ekspresyon Seviyesi			Oran		
	Kontrol kuyucuğu			Ampisilin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
61 AMP	1,000	1,000	1,000	1,705	1,765	1,919
141 AMP	1,000	1,000	1,000	1,765	1,636	4,028
115 AMP A	1,000	1,000	1,000	1,125	0,953	1,141
115 AMP B	1,000	1,000	1,000	1,141	1,117	1,110
9 AMP A	1,000	1,000	1,000	0,895	1,042	1,905
9 AMP B	1,000	1,000	1,000	0,717	1,157	2,657
59 AMP A	1,000	1,000	1,000	0,334	0,339	0,295
59 AMP B	1,000	1,000	1,000	0,940	1,485	2,603
13 AMP A	1,000	1,000	1,000	4,724	32,900	67,182
13 AMP B	1,000	1,000	1,000	13,642	2,282	6,063
136 AMP A	1,000	1,000	1,000	0,143	0,079	0,166
136 AMP B	1,000	1,000	1,000	0,172	0,102	0,058
136 AMP C	1,000	1,000	1,000	0,122	0,055	0,039
136 AMP D	1,000	1,000	1,000	0,131	0,073	0,067
42 AMP	1,000	1,000	1,000	0,110	3,555	4,056
83 AMP	1,000	1,000	1,000	0,104	0,019	0,030
91 AMP	1,000	1,000	1,000	1,670	2,445	5,776
M7 AMP	1,000	1,000	1,000	16,336	7,062	3,340
12 AMP A	1,000	1,000	1,000	4,691	13,361	2,266
12 AMP B	1,000	1,000	1,000	2,732	14,621	4,257
129 AMP A	1,000	1,000	1,000	0,973	1,028	5,540
129 AMP B	1,000	1,000	1,000	9,849	8,515	1,385
56 AMP A	1,000	1,000	1,000	47,835	39,947	28,051
56 AMP B	1,000	1,000	1,000	11,551	5,352	1,050
C7 AMP A	1,000	1,000	1,000	148,056	182,278	3236,009
C7 AMP B	1,000	1,000	1,000	19,835	55,330	93,701

Tablo 37. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, ampisilin ile sinerji oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi

Hipotez	t	df	t-Table	*p	Sonuç
Kontrol grubunda icaD gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,805	50	2	p<0,05	Kabul
İki grup arasında icaA gen ekspresyon seviyesi farklıdır.	0,488	50	2	p≥0,05	Red
İki grup arasında sarA gen ekspresyon seviyesi farklıdır.	0,368	50	2	p≥0,05	Red

*p<0,05 ise anlamlı; p≥0,05 ise anlamsız

Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin qRT-PCR sonuçları, Tablo 38'de verilmiştir. Tablo 38'de verilen

sonuçlar kullanılarak hesaplanan, rRNA genine rölatif ekspresyon seviyeleri Tablo 39'te verilmiştir. Kontrol kuyucuğunda elde edilen değerler kullanılarak normalizasyon yapılmış ve değerler oranlanarak tekrar hesaplanmıştır (Tablo 40). Tablo 40'da verilen değerler kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (Tablo 41). Kontrolün rölatif gen ekspresyon seviyesinin, ampisilin ve NAC'ın aditif etki gösterdiği konsantrasyonlardaki rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olması beklenmektedir. Kontrol grubunda *icaD* gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir ($t=1,958$; $df=34$; $p<0,05$). Kontrol grubunda *icaA* gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir ($t=1,468$; $df=34$; $p<0,05$). Kontrol grubunda *sarA* gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir($t=1,327$; $df=34$; $p<0,05$).

Tablo 38. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması

	Ct Sayıları				Ct Sayıları			
	Kontrol kuyucuğu				Ampisilin ve NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuk			
Örnek Adı	16S rRNA	icaD	icaA	SarA	16S rRNA	icaD	icaA	SarA
45 AMP	24,48	34,81	28,91	35,00	17,18	22,33	23,13	21,40
M11 AMP	24,77	20,76	26,64	27,30	16,78	20,09	23,64	23,44
64 AMP	21,55	23,68	24,02	25,19	19,57	20,57	20,87	20,44
66 AMP	19,74	20,78	20,89	20,52	17,75	18,69	18,97	17,75
M3 AM	23,47	19,72	25,58	26,11	19,47	21,93	21,22	20,63
67 AMP	19,74	21,29	21,91	22,29	21,93	20,34	20,90	20,49
21 AMP	26,63	22,45	19,42	20,23	18,83	20,40	23,82	23,85
13 AMP C	18,66	19,26	16,70	17,37	19,61	18,84	21,75	21,05
136 AMP E	21,17	19,60	19,16	19,48	22,52	22,49	23,02	22,51
42 AMP	24,82	16,23	21,55	20,97	26,82	27,16	19,63	19,67
83 AMP	20,82	22,49	23,09	23,06	17,71	18,60	18,72	18,72
M7 AMP	18,54	20,04	20,57	19,62	19,66	19,79	22,22	22,82
M8 AMP	23,87	22,12	20,55	19,77	23,78	21,66	26,78	27,50
C1 AMP	22,94	20,49	20,82	20,07	22,21	22,31	23,12	23,07
80 AMP	21,61	23,68	40,00	33,52	20,98	23,86	40,00	34,24
53 AMP	17,99	24,11	34,26	24,87	21,51	23,95	32,82	27,29
18 AMP	20,47	20,43	31,71	22,61	21,67	22,26	31,35	24,47
19 AMP A	18,03	23,32	28,05	34,66	21,95	21,64	43,87	36,23
19 AMP B	18,03	23,32	28,05	34,66	16,96	24,86	40,00	35,25

Tablo 39. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri

	RQ			RQ		
	Kontrol kuyucuğu			Ampisilin ve NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
45 AMP	0,001	0,046	0,001	0,028	0,016	0,054
M11 AMP	16,111	0,274	0,173	0,101	0,009	0,010
64 AMP	0,228	0,180	0,080	0,500	0,406	0,547
66 AMP	0,486	0,451	0,582	0,521	0,429	1,000
M3 AM	13,454	0,232	0,160	0,182	0,297	0,448
67 AMP	0,342	0,222	0,171	3,010	2,042	2,713
21 AMP	18,126	148,056	84,449	0,337	0,031	0,031
13 AMP C	0,660	3,891	2,445	1,705	0,227	0,369
136 AMP E	2,969	4,028	3,227	1,021	0,707	1,007
42 AMP	385,343	9,646	14,420	0,790	146,018	142,025
83 AMP	0,314	0,207	0,212	0,540	0,497	0,497
M7 AMP	0,354	0,245	0,473	0,914	0,170	0,112
M8 AMP	3,364	9,987	17,148	4,347	0,125	0,076
C1 AMP	5,464	4,347	7,311	0,933	0,532185	0,551
80 AMP	0,238	0,000	0,000	0,136	0,000	0,000
53 AMP	0,014	0,000	0,008	0,184	0,000	0,018
18 AMP	1,028	0,000	0,227	0,664	0,001	0,144
19 AMP A	0,026	0,001	0,000	1,240	0,000	0,000
19 AMP B	0,026	0,001	0,000	0,004	0,000	0,000

Tablo 40. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları

	Normalize Ekspresyon Seviyesi			Oran		
	Kontrol kuyucuğu			Ampisilin ve NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
45 AMP	1,000	1,000	1,000	36,252	0,349	78,793
M11 AMP	1,000	1,000	1,000	0,006	0,031	0,057
64 AMP	1,000	1,000	1,000	2,189	2,250	6,821
66 AMP	1,000	1,000	1,000	1,072	0,953	1,717
M3 AM	1,000	1,000	1,000	0,014	1,283	2,789
67 AMP	1,000	1,000	1,000	8,815	9,190	15,889
21 AMP	1,000	1,000	1,000	0,019	0,000	0,000
13 AMP C	1,000	1,000	1,000	2,585	0,058	0,151
136 AMP E	1,000	1,000	1,000	0,344	0,176	0,312
42 AMP	1,000	1,000	1,000	0,002	15,137	9,849
83 AMP	1,000	1,000	1,000	1,717	2,395	2,346
M7 AMP	1,000	1,000	1,000	2,585	0,693	0,237
M8 AMP	1,000	1,000	1,000	1,292	0,013	0,004
C1 AMP	1,000	1,000	1,000	0,171	0,122	0,075
80 AMP	1,000	1,000	1,000	0,570	0,646	0,392
53 AMP	1,000	1,000	1,000	12,817	31,125	2,144
18 AMP	1,000	1,000	1,000	0,646	2,949	0,633
19 AMP A	1,000	1,000	1,000	48,503	0,000	5,098
19 AMP B	1,000	1,000	1,000	0,164	0,000	0,316

Tablo 41. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, ampisilin ile aditif etki oluşturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi

Hipotez	t	df	t-Table	*p	Sonuç
Kontrol grubunda icaD gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,958	34	1,697	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda icaA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,468	34	1,697	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda sarA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,327	34	1,697	p<0,05	Kabul

* p<0,05 ise anlamlı; p≥0,05 ise anlamsız

Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin qRT-PCR sonuçları, Tablo 42'de verilmiştir. Tablo 42'de verilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan, rRNA genine rölatif ekspresyon seviyeleri Tablo 43'te verilmiştir. Kontrol kuyucuğunda elde edilen gen ekspresyon seviyesi değerleri kullanılarak normalizasyon yapılmış ve değerler oranlanarak tekrar hesaplanmıştır (Tablo 44). Tablo 44'te verilen değerler kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (Tablo 45). Kontrolün rölatif gen ekspresyon seviyesinin, vankomisin ve NAC'ın sinerjik etki gösterdiği konsantrasyonlardaki rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olması beklenmektedir. Kontrol grubunda *icaD* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir (t=2,024; df=22; p<0,05). Kontrol grubunda *icaA* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir (t=1,827; df=22; p<0,05). Kontrol grubunda *sarA* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir (t=1,898; df=22; p<0,05).

Tablo 42. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması

	Ct Sayıları				Ct Sayıları			
	Kontrol kuyucuğu				Vankomisin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk			
Örnek Adı	16S rRNA	icaA	icaD	SarA	16S rRNA	icaA	icaD	SarA
115 VAN	19,23	20,06	19,56	19,62	26,21	21,64	21,10	21,03
121 VAN	23,18	23,72	22,56	22,51	28,38	23,91	22,89	22,94
136 VAN	21,17	19,12	19,12	19,12	19,56	24,86	24,10	22,48
26 VAN	26,10	19,05	18,28	19,02	23,48	22,53	22,10	21,42
M2 VAN	25,53	22,08	21,81	21,48	20,60	22,09	21,54	21,26
M11 VAN A	24,77	26,64	26,64	26,64	22,24	24,61	23,35	23,25
M11 VAN B	24,77	26,64	26,64	26,64	24,94	21,57	21,03	21,59
13 VAN	18,66	19,26	19,26	19,26	25,34	25,68	24,90	24,61
C1 VAN	18,18	24,03	24,25	24,47	18,20	19,21	20,26	20,26
18 VAN A	20,47	20,43	31,71	22,61	20,65	22,40	40,00	24,43
18 VAN B	20,47	20,43	31,71	22,61	22,96	27,77	40,00	28,48
C7 VAN	25,14	22,35	40,00	37,79	18,42	21,20	40,00	22,80

Tablo 43. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen eksprseyon seviyeleri

	RQ			RQ		
	Kontrol kuyucuğu			Vankomisin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
115 VAN	0,563	0,796	0,763	23,752	34,535	36,252
121 VAN	0,688	1,537	1,591	22,162	44,942	43,411
136 VAN	4,141	4,141	4,141	0,025	0,043	0,132
26 VAN	132,514	225,972	135,298	1,932	2,603	4,170
M2 VAN	10,928	13,177	16,564	0,356	0,521	0,633
M11 VAN A	0,274	0,274	0,274	0,193	0,463	0,497
M11 VAN B	0,274	0,274	0,274	10,339	15,032	10,196
13 VAN	0,660	0,660	0,660	0,790	1,357	1,659
C1 VAN	0,017	0,015	0,013	0,497	0,240	0,240
18 VAN A	1,028	0,000	0,227	0,297	0,000	0,073
18 VAN B	1,028	0,000	0,227	0,036	0,000	0,022
C7 VAN	6,916	0,000	0,000	0,146	0,000	0,048

Tablo 44. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları

	Normalize Ekspresyon Seviyesi			Oran		
	Kontrol kuyucuğu			Vankomisin ve NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuk		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
115 VAN	1,000	1,000	1,000	42,224	43,411	47,505
121 VAN	1,000	1,000	1,000	32,223	29,243	27,284
136 VAN	1,000	1,000	1,000	0,006	0,010	0,032
26 VAN	1,000	1,000	1,000	0,015	0,012	0,031
M2 VAN	1,000	1,000	1,000	0,033	0,040	0,038
M11 VAN A	1,000	1,000	1,000	0,707	1,693	1,815
M11 VAN B	1,000	1,000	1,000	37,792	54,948	37,271
13 VAN	1,000	1,000	1,000	1,197	2,056	2,514
C1 VAN	1,000	1,000	1,000	28,641	16,111	18,765
18 VAN A	1,000	1,000	1,000	0,289	0,004	0,321
18 VAN B	1,000	1,000	1,000	0,035	0,018	0,096
C7 VAN	1,000	1,000	1,000	0,021	0,009	308,687

Tablo 45. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, vankomisin ile sinerji oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem

Hipotez	**t**	**df**	**t-Table**	***p**	**Sonuç**
Kontrol grubunda icaD gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	2,024	22	1,717	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda icaA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,827	22	1,717	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda sarA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,898	22	1,717	p<0,05	Kabul

* p<0,05 ise anlamlı; p≥0,05 ise anlamsız

Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin qRT-PCR sonuçları, Tablo 46'da verilmiştir. Tablo 46'da verilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan, rRNA genine rölatif ekspresyon seviyeleri Tablo 47'de verilmiştir. Kontrol kuyucuğunda elde edilen değerler kullanılarak normalizasyon yapılmış ve değerler oranlanarak tekrar hesaplanmıştır (Tablo 48). Tablo 48'de verilen değerler kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır (Tablo 49). Kontrolün rölatif gen ekspresyon seviyesinin, vankomisin ve NAC'ın aditif etki gösterdiği konsantrasyonlardaki rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olması beklenmektedir. Kontrol grubunda *icaD* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir ($t=2,136$; $df=22$; $p<0,05$). Kontrol grubunda *icaA* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir ($t=1,973$; $df=22$; $p<0,05$). Kontrol grubunda *sarA* gen ekspresyonu seviyesi daha yüksektir ($t=2,235$; $df=22$; $p<0,05$).

Tablo 46. Kontrol kuyucuğu ve vankomisinile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması

	Cq Sayıları				Cq Sayıları			
	Kontrol				Aditif vankomisin grubu			
Örnek Adı	16S rRNA	icaA	icaD	SarA	16S rRNA	icaA	icaD	SarA
M 1 VAN	19,01	26,21	24,81	25,37	22,51	19,95	19,03	19,71
M13 VAN	21,30	23,58	23,83	23,31	26,69	31,74	31,23	29,12
M7 VAN	18,54	20,04	20,04	20,04	21,34	28,25	27,41	26,11
115 VAN	19,23	20,06	19,56	19,62	19,90	21,62	20,79	21,47
2 VAN	19,27	19,27	19,58	19,58	16,80	24,98	24,38	23,51
121 VAN	23,18	23,72	22,56	22,51	19,21	22,31	20,87	22,07
M8 VAN	23,87	22,12	22,12	22,12	22,52	25,22	24,52	23,61
M3 VAN	23,47	19,72	19,72	19,72	26,58	22,28	22,12	22,51
26 VAN	26,10	19,05	18,28	19,02	18,68	21,42	21,67	21,48
M2 VAN	25,53	22,08	21,81	21,48	21,07	21,57	21,27	21,35
109 VAN	24,14	24,17	40,00	22,61	20,37	21,51	40,00	25,30
18 VAN	20,47	20,43	31,71	22,61	18,42	22,20	40,00	24,80

Tablo 47. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri

	RQ			RQ		
	Kontrol			Aditif vankomisin grubu		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
M 1 VAN	0,007	0,018	0,012	5,897	11,158	6,964
M13 VAN	0,206	0,173	0,248	0,030	0,043	0,186
M7 VAN	0,354	0,354	0,354	0,008	0,015	0,037
115 VAN	0,563	0,796	0,763	0,304	0,540	0,337
2 VAN	1,000	0,807	0,807	0,003	0,005	0,010
121 VAN	0,688	1,537	1,591	0,117	0,316	0,138
M8 VAN	3,364	3,364	3,364	0,154	0,250	0,470
M3 VAN	13,454	13,454	13,454	19,698	22,009	16,795
26 VAN	132,514	225,972	135,298	0,150	0,126	0,144
M2 VAN	10,928	13,177	16,564	0,707	0,871	0,824
109 VAN	0,979	0,000	2,888	0,454	0,000	0,033
18 VAN	1,028	0,000	0,227	0,073	0,000	0,012

Tablo 48. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında aditif etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları

	Normalize Ekspresyon Seviyesi			Oran		
	Kontrol			Aditif vankomisin grubu		
Örnek Adı	icaA	icaD	SarA	icaA	icaD	SarA
M 1 VAN	1,000	1,000	1,000	867,067	621,668	572,051
M13 VAN	1,000	1,000	1,000	0,147	0,248	0,747
M7 VAN	1,000	1,000	1,000	0,024	0,042	0,104
115 VAN	1,000	1,000	1,000	0,540	0,678	0,441
2 VAN	1,000	1,000	1,000	0,003	0,006	0,012
121 VAN	1,000	1,000	1,000	0,170	0,206	0,087
M8 VAN	1,000	1,000	1,000	0,046	0,074	0,140
M3 VAN	1,000	1,000	1,000	1,464	1,636	1,248
26 VAN	1,000	1,000	1,000	0,001	0,001	0,001
M2 VAN	1,000	1,000	1,000	0,065	0,066	0,050
109 VAN	1,000	1,000	1,000	0,463	0,073	0,011
18 VAN	1,000	1,000	1,000	0,071	0,001	0,053

Tablo 49. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, vankomisin ile aditif etki oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi

Hipotez	t	df	t-Table	*p	Sonuç
Kontrol grubunda icaD gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	2,136	22	1,717	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda icaA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	1,973	22	1,717	p<0,05	Kabul
Kontrol grubunda sarA gen ekspresyon seviyesi daha yüksektir.	2,235	22	1,717	p<0,05	Kabul

* p<0,05 ise anlamlı; p≥0,05 ise anlamsız

TARTIŞMA

Staphylococcus aureus ve S. epidermidis hastane kökenli enfeksiyonların en sık etkenlerinden olmaları, enfeksiyonların çoğunlukla biyofilm kaynaklı olmaları nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sorun olmaktadır (5). Biyofilm, madde ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde, antibiyotik etkinliğini güçleştirmektedir (6,7). Biyofilm oluşumu ve tedavide yarattığı sorunlar bilinmesine karşın, laboratuvar uygulamalarında biyofilm oluşturmuş mikroorganizmalara karşı etkili olan, en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonun tespitinde standart bir yöntem bulunmamaktadır. Biyofilmler, antibiyotik etkisine dirençli ve antifagositik etkileri olması nedeniyle sıklıkla tedavisi zor, kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır (1-3). Tüm enfeksiyon hastalıklarının en az %65'i biyofilm oluşturan bakteriler ile ilişkilidir (7). Özellikle hastalarda kullanılan medikal cihazlar üzerinde (kullanılan prostetik cihazlar, kateterler, implantlar gibi) mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak, yabancı cisim enfeksiyonlarına sıklıkla neden olmaktadır (4). Enfeksiyonlardan izole edilmiş izolatlarda, biyofilm formlarının MBEK değerleri, planktonik formların MİK değerlerine göre çok daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu durum, enfeksiyonların tedavisinde çok daha yüksek dozlarda antibiyotik kullanımı gerektirmekte ve antibiyotik direncin artmasında etkili olmaktadır (7).

Son yıllarda biyofilm mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı, bu etkenlerin tedavisi için umut veren bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde, birçok molekülün antibiyofilm aktivitesi araştırılmaktadır. Bu moleküllerden birisi de NAC molekülüdür. NAC, bir tiyol bileşiği olup L-sistein ve glutatyonun öncüsü olan önemli bir mukolitik maddedir. NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltmakta etkili olduğu bilinmektedir (8). NAC'ın,

P. aeruginosa, K. pneumoniae, S. epidermidis, S. aureus ve *E. coli* gibi, Gram negatif ve Gram pozitif bakteri biyofilmlerini etkili bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir (8,9).

Çalışmamızda; stafilokokların biyofilm yapma yeteneklerinin, bu bakterilerin tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin MBEK değerlerinin ve NAC molekülü varlığındaki değişiminin ortaya konması amaçlanmıştır. Böylece; NAC ile birlikte antibiyotiklerin, stafilokok izolatlarına karşı antibiyofilm etkinliği ve biyofilm ilişkili genlerin ekspresyonlarını nasıl değiştirdiği gösterilerek yeni tedavi yaklaşımları için yol gösterici bir sonuç elde edilmesi amaçlanmıştır.

Stafilokların sahip olduğu ana virülans faktörlerden biri, polimerik yüzeylerde biyofilm oluşturarak adheransı ve kolonizasyonu sağlama özelliğidir (93,95). Bu nedenle, stafiloklarda biyofilm oluşumu farklı araştırmacılar tarafından, farklı yöntemler kullanılarak çalışılmıştır. Bu yöntemlerden en fazla kullanılanı, mikroplak kristal viyole yöntemidir. Vasudevan ve ark.'nın (115) yaptıkları çalışmada, mikroplak yöntemi kullanılarak, 35 *S. aureus* izolatının 24'ü (%73.53) biyofilm pozitif olarak saptanmıştır. Arciola ve ark. da (204) yaptıkları çalışmada, protez enfeksiyonlarından izole edilen 15 *S.aureus* izolatının 11'ini (%73.0) ve 15 *S.epidermidis* izolatının 9'unu (%60.0) biyofilm pozitif bulmuşlardır. Mathur ve ark. (205), mikroplak kristal viyole yöntemi ile stafilokok izolatlarının % 14.4 güçlü, % 39.4 orta ve % 46.0 zayıf biyofilm oluşturduklarını tespit etmiştir.

Çalışmamızda ise, mikroplak kristal viyole yöntemi kullanılarak, 170 stafilokok izolatının 69'unun (%40.59) biyofilm oluşturduğu, 101'inin (%59.41) ise biyofilm negatif olduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşturan 69 bakteriden 42'si zayıf (%60.87), 22'si orta (%31.88), 5'i kuvvetli (%7.25) derecede biyofilm yapmıştır. Zayıf düzeyde biyofilm oluşturan izolatların 25'i (%59.53) MSSA, 12'si (%28.57) MRSA, 5'i (%11.90) *S. epidermidis* olarak tespit edilmiştir. Orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların, 8'i (%36.36) MSSA, 5'i (%22.73) MRSA, 9'u (%40.91) *S.epidermidis* olarak tespit edilmiştir. Kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların ise, 3'ü (%60) MSSA, 1'i (%20) MRSA ve 1'i (%20) ise *S. epidermidis* olarak tespit edilmiştir.

Stafilokoklarda antibiyotik direnci, penisilin direnci ile başlayıp, çoklu antibiyotik direncine kadar uzanmıştır. Stafiloklarda gelişen antibiyotik direnci, tüm dünyada giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Antibiyotiklere karşı hızla direnç kazanan stafilokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre antibiyotik seçimi önem arz etmektedir (206). EUCAST bakteriler için sınır değerleri kılavuzunda *S. aureus* izolatlarında vankomisin için 2 mg/L'nin üzerindeki MİK değerleri ve *S.epidermidis* izolatlarında vankomisin için 4 mg/L'nin üzerindeki MİK değerleri dirençli

olarak kabul edilmektedir. MRSA türleri beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir. Stafilokoklar için ampisilin direnç sınır değeri 0.25 μg/mL'dir. (181). Çalışmamızda kullanılan 50 stafilokok izolatının 41 (%82) tanesi ampisiline dirençli olarak bulunmuştur. Ampisilin direnci stafilokoklarda oldukça sık rastlanan ve tedavilerinde günümüzde pek tercih edilmeyen bir antibiyotiktir. Bu nedenle çalışmamızda bu antibiyotiğin etkinliğini arttırmak ve tedaviye tekrar kazandırmak amacıyla, NAC ile kombine etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya göre ampisiline dirençli 41 stafilokok izolatının 25'i (%60.98) uygun NAC konsantrasyonları (2038 μg/mL ve 4075 μg/mL) varlığında duyarlı hale gelmiştir ve ampisilin MİK değerlerinde 4-256 kat düşüş tespit edilmiştir. Ampisiline dirençli 9 (%8) izolatın MİK değerlerinde azalma tespit edilse de; hala direnç sınır değerinin üzerindedir. Çalışmamıza dahil edilen 50 stafilokok izolatının 16'sına (%32) ampisilin ve NAC'ın sinerjik etkili olduğu tespit edilmiştir.

Vankomisin ise stafiloklarda dirençli olanlarda tercih edilmektedir. MRSA suşlarının giderek yaygınlaşması nedeni ile yaşamı tehdit eden ciddi stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin, 1980 yıllarında itibaren tek seçenek olarak kullanılmıştır. İlk olarak Fransa'da, ardından Japonya'da ve daha sonra ABD'de orta duyarlılıkta vankomisin direnci bildirilmiştir (206,207). Bu durumu takiben, 2002 yılına gelindiğinde ilk kez vankomisin dirençli *S.aureus* ortaya çıkmıştır (208,209). Vankomisin direncinin rapor edilmesi bu antibiyotiğin de kontrollü kullanımının sağlanmasının önem arz ettiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, vankomisinin MİK değerlerini düşüren NAC kombinasyonlarının tespit edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda kullanılan stafilokok izolatlarının hepsi vankomisine duyarlıdır. İzolatlarda, "vankomisin ve NAC" varlığında (2038 μg/mL ve 4075 μg/mL), vankomisin MİK değerlerinde 2-32 kat düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmamıza dahil edilen 50 stafilokok izolatının 3'üne (%6) vankomisin ve NAC'ın sinerjik etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antibiyotik olmayan ve MİK değeri tek başına yüksek olan NAC molekülünün, ampisilin ve vankomisin ile birlikte, antibiyotiklerin MİK değerlerini düşürmede etkili bir kimyasal ajan olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızla benzer olarak, NAC'ın farklı antibiyotikler (rifampisin, tigesiklin, siprofloksasin) ile kombine etkisinin hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde doza bağlı olarak üremeyi engellediği ve antibiyotiklerin MİK değerlerinde düşüşe neden olduğu farklı çalışmalar ile de bildirilmiştir (152-155,210).

Bazı yapılan çalışmalar, NAC'ın, bazı solunum patojenlerinin solunum epitel hücrelerine yapışmasını engelleme yeteneğini de göstermiştir. Riise ve ark. (163), dört bileşiğin (NAC, lidokain, hidrokortizon ve terbutalin) orofarengeal epitel hücrelerinde

bakteriyel tutunum üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada; NAC, *H.influenzae*'nın (kullanılan 4 izolatın 3'ü) çoğunda ve tüm *S. pneumoniae* (n=3) izolatlarının bakteriyel yapışmasını inhibe edilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Zengh ve ark.'nın (164) yaptıkları çalışmada, NAC veya S-karboksimetilsisteinin *Moraxella catarrhalis* biyofilmini azalttığı ve epitele bağlanmada konsantrasyona bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildiğini birdirmiştir.

Stafiloklarda biyofilm, enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik etkinliğini güçleştiren en önemli nedenlerden biridir. Matriksin fizikokimyasal özellikleri, mikroçevrede ve biyofilmdeki bakterilerde meydana gelen değişiklikler, matriksin antibiyotiği parçalayabilecek enzimlere sahip olması, biyofilmde farklı mikroorganizmaların bulunması gibi birçok etkenin sonucu olarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların öldürülmesi için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonu, planktonik haldeki türdeşlerinin tedavisi için gereken antibiyotik konsantrasyonunun 1000-15000 kat arasında artmaktadır (7,72,75,79). Bu çalışmalarla benzer şekilde, çalışmamızdaki biyofilm oluşturmuş stafiloklarda da; ampisilin, vankomisinin MBEK değerleri, MİK değerlerinden yaklaşık 1000 kat daha yüksek saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen stafilokların ampisilin MBEK değerleri 31,25->4000 μg/mL aralığında tespit edilmiştir. Vankomisin MBEK değerleri ise, 500->4000 mg/mL aralığında dağılım göstermiştir.

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için, antibiyotiklerle birlikte biyofilm mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı gereklidir (149,150). Bu moleküllerden biri olan NAC'ın antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesinin anlaşılması bu nedenle önem taşımaktadır. NAC'ın antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi ilgili bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlar: i) sistein kullanımının rekabetçi inhibisyonu, ii) NAC sülfidril grubunun bakteriyel proteinlerle reaksiyonu, iii) dolaylı etkilerle hücre içi redoks dengesinin bozulmasının hücre metabolizması ve hücre içi sinyal iletim yolları üzerinde etkisi şeklindedir (166). Buna ek olarak, NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltmakta etkili olduğu da bilinmektedir (160-166). NAC'ın bakteriyel biyofilm oluşumuna etkisi, ilk defa *S. epidermidis*'te 1997 yılında gösterilmiştir. Bu araştırmada, *S. epidermidis* biyofilm formasyonu üzerine NAC'ın farklı konsantasyonlarının etkisi değerlendirilmiş ve biyofilm formasyonunda NAC konsantrasyonuna bağlı bir azalma (>250 μg/mL konsantrasyonlarda) rapor edilmiştir. Ayrıca, 2000 μg/mL NAC'ın matrix formasyonu üzerindeki inhibitör etkisi TEM ile de gözlemlenmiştir (149). Olofsson ve ark. (8) da, NAC'ın biyofilmdeki EPS makromolekülleri arasındaki disülfit köprülerini açarak, bakteriyel biyofilmi büyük ölçüde

azalttığını ve biyofilm bütünlüğünü olumsuz yönde etkilediğini belirtmiştir. *E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae, S. epidermidis* ve *S. aureus* gibi, Gram negatif ve Gram pozitif bakteri biyofilmlerini etkili bir şekilde azalttığı da yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (154-168). Zhao ve ark. (155), 500 µg/mL NAC konsantrasyonunda, *P. aeruginosa* biyofilmlerinde bozulma başladığını göstermiştir. NAC'ın bu bakteriler için 10.000 µg/mL konsantrasyonunda maksimum etki gösterdiğini; 1000 µg/mL ve 500 µg/mL NAC konsantrasyonlarında biyofilmdeki polisakkarit üretiminin de sırasıyla %27,64 ve %44,59 olduğu belirtilmiştir.

NAC'ın bu etkisi, biyofilm kaynaklı antibiyotik direncin engellenmesi ve bu enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklerin etkinliğinin arttırılması için çeşitli araştırmalarda kullanılmıştır. Aslam ve ark. (150) yaptıkları çalışmada, "NAC ve tigesiklin" kombinasyonları, stafilokok izolatlarında denenmiştir. Özellikle NAC ve tigesiklinin birlikte kullanıldığı konsantrasyonlarda, MRSA ve *S. epidermidis* izolatları için biyofilm oluşumunda ve antibiyotiğin MİK değerlerinde azalma ve sinerjik etki tespit edilmiştir. El-Feky ve ark. (167) ise, üretral stend yüzeylerinde biyofilm oluşturulmuş *S. aureus, S. epidermidis, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* and *Proteus vulgaris* üzerine siprofloksasin ve NAC'ın tek başına ve birlikte etkilerini araştırmıştır ve siprofloksasinin NAC ile kombine edildiğinde biyofilm formlarını %94-100 oranında inhibe ettiğini SEM ile göstermişlerdir. Lea ve ark. da (161), otitis media hastalarından izole edilen 15 adet *P. aeruginosa* izolatı üzerinde sadece siprofloksasin, 'siprofloksasin ve deksametazon', sadece NAC ve 'NAC ve siprofloksasin' etkilerini değerlendirmiştir. Bu çalışmada, *P.aeruginosa* izolatları, 'siprofloksasin ve deksametazon' ve yalnızca siprofloksasin varlığında büyüdüğü halde, yalnızca NAC (>5000 µg/mL) veya siprofloksasin ile kombinasyon halinde kullanıldığında, 15 izolatta sessil veya planktonik durumda hiçbir üreme olmamıştır. NAC'ın tek başına ve bazı antibiyotiklerle sinerjik olarak etkileşim halinde kullanılması tedavi etkinliğini arttırmıştır (161). Marchese ve ark. da (168), 2 µg/mL fosfomisin ve 2000 µg/mL NAC kombinasyonun *E.coli* olgun biyofilmlerini %60.73 oranında azalttığını belirtmişlerdir. Moon ve ark. (171), ampisilin ve metranidazolün NAC ile kombinasyonunun *Prevotella intermedia* biyofilmi üzerine sinerjik etkili olduğunu ancak siprofloksasin ve tetrasiklin için aynı etkinin tespit edilemediğini belirtmişlerdir (171). Efrati ve ark. (211) biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda NAC'ın vankomisinin etkinliğini arttırabileceğini savunmuştur. Gomes ve ark. (157), "farnesol ve NAC" kombinasyonunun *S. epidermidis'*in planktonik formlarına da biyofilm formları da sinerjik bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte başka bir çalışmada NAC ve

tigesiklin kombinasyonun MRSA ve *S. epidermidis* için canlı biyofilmlerde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (150).

Genel olarak yapılan çalışmalarda, çeşitli antibiyotiklerin bakterilerin planktonik formlarına etki ettikleri konsantrasyonlarda biyofilm formlarına etki etmedikleri gösterilmiş ve birçok antibiyotiğin NAC ile birlikte kullanımının antibiyofilm etkiyi artırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmalarla benzer olarak, antibiyofilm etkinin tespit edildiği çalışmamızda, 50 stafilokok izolatının 16'sına (%32) ampisilin ve NAC'ın sinerjik etkili olduğu tespit edilmiştir. Ampisilinin bu 16 izolata karşı MBEK değeri, 128-2048 µg/mL NAC varlığında 64-256 kat azalmıştır. Vankomisin ve NAC birlikte kullanıldığında ise 31 stafilokok izolatının 10'una (%32,26) sinerjik etki tespit edilmiştir. Vankomisinin bu 10 izolata karşı MBEK değeri, 256-2048 µg/mL NAC varlığında 4-512 kat azalmıştır. Çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalar ile uyumludur.

Çalışmamızda, FİK değerleri hesaplanan ve sinerji ya da aditif etki tespit edilen kuyucuklardan ekim yapılarak bakteri miktarı da tespit edilmiştir. Çalışılan 50 bakterinin 45'inin "ampisilin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında üreme olmamış ve bakteri miktarında 6 log azalma tespit edilmiştir. Kalan 5 bakteride ise, "ampisilin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında 5 log azalma saptanmıştır. Aynı şekilde, çalışılan 31 bakterinin 24'ünün "vankomisin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında üreme olmamış ve 6 log azalma tespit edilmiştir. Kalan 7 bakteride, "vankomisin ve NAC" MBEK konsantrasyonlarını içeren kuyucuklardan yapılan ekim sonuçlarında 5 log azalma saptanmıştır. Gomes ve arkadaşları da çalışmamıza benzer olarak; farnesol ve NAC'ın kombine etksinin *S. epidermidis* izolatlarının biyofilmlerine etkisini belirlerken, MBEK konsantrasyonlarını içerenkuyucuklardan ekim yapmış ve bakteri miktarında 4 log azalma tespit etmişlerdir (157).

S. epidermidis biyofilminde *ica* lokusun klinik önemi oldukça fazladır. Bununla birlikte *S. aureus* klinik izolatlarının çoğunda bulunduğu bildirilmiştir (129). Örneğin, yapılmış bir çalışmada, kan kültüründen izole edilen *S. epidermidis* türlerinin %85'inin, *ica* genleri içerdiği tespit edilmiştir (132). Yapılan bir başka çalışmada, *ica* lokusundaki genlerin, eklem protezi enfeksiyonlarında stafilokoklar için genetik marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (133). Başka bir çalışmada da *S. epidermidis* izolatlarının, *ica* operonu taşıdıkları belirtilmiştir (131). Brezilya'da yapılan bir araştırmada 94 tane *S. aureus* izolatının, 93'ünün biyofilm pozitif olduğu fenotipik yöntemlerle ortaya konmuş, 90 izolatının *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduğu moleküler yöntemler ile tespit edilmiştir (135). Ülkemizde yapılan bir

çalışmada ise, klinik örneklerden izole edilen 152 adet *S. aureus* izolatının, 136'sında *icaA* ve *icaD* genlerinin bulunduğu, 74'ünün fenotipik olarak biyofilm pozitif olduğu rapor edilmiştir (134). Çalışmalar sonucunda, *ica* operonun bulunması ile biyofilm üretiminin fenotipik olarak gözlemlenmesi arasında bir ilişki olduğu savunulsa da, bu ilişkinin kompleks mekanizmalar içerdiği de vurgulanmaktadır. Özellikle bu lokusta meydana gelen nokta mutasyonları, PIA oluşumunu negatif regülasyonuna neden olabilmekte ve stres, in vivo ve in vitro ortam farklılığı gibi durumlar biyofilmin gen ekspresyon seviyelerini etkileyebilmektedir (137,138). Çalışmamızdaki 50 (%100) stafilokok izolatının tamamında *icaA* ve *icaD* genleri tespit edilmiştir.

Stafilokokkal biyofilm gelişiminde *icaADBC* lokusunun dışında *ica* bağımsız moleküler yolakların varlığı da ortaya konmuştur (138,139). Bu mekanizmaların temelinde hücre yüzey adezinlerinin matrikse bağlanmasındaki farklılıklar ve farklı biyofilm proteinleri etkilidir. Bu mekanizmalardan en önemlisi ve en iyi aydınlatılmış olanı, *bap* sentezidir. *sarA* geni, *bap* geni için bir aktivatör ve bap aracılı biyofilm oluşumunda arttırıcı etkisi olan bir regulatör olarak işlev görmektedir (138). Özellikle, MRSA izolatlarında, *sarA* geninin mutasyonunun biyofilm oluşum kapasitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (139). Çalışmamızdaki 50 (%100) stafilokok izolatlarının tamamında *sarA* geni tespit edilmiştir. Çalışmamızda da, Tsang ve ark. (141) çalışmasına benzer olarak, MRSA izolatlarında bu genin ekspresyon seviyesinin diğer stafiloklardan daha yüksek oranda olduğu da gözlenmiştir.

Çalışmamızda *ica* aracılı biyofilm yolağındaki genlerden *icaA* ve *icaD*, regülatör genlerden de *sarA* geni seçilmiştir. *icaA, icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine NAC'ın etkisinin saptanması için bu genlerin, NAC ve antibiyotik içermeyen besiyerinde üretilen kültür ortamı (kontrol) ile NAC ve antibiyotikleri içeren besiyerinde üretilen kültür ortamındaki ekspresyon seviyelerinin farkı araştırılmıştır. Çalışmamızda, ampisilin ve NAC'ın sinerjik etki gösterdiği konsantrasyonları içeren kuyucuklarda, *icaD* geninin ekspresyon seviyesinin kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu grupta, *icaA* ve *sarA* geni ekspresyon seviyelerinde kontrole göre arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Biyofilm oluşumu farklı ortam koşullarına hassas ve planktonik formlara kıyasla daha kompleks bir yapıdır. Bu nedenle daha önce de belirttiğimiz gibi inokulum miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi birçok parametre biyofilm içerisindeki mikroorganizmaları etkilemektedir. Stabil olmayan bu süreç içerisinde moleküler teknikler için örnek alınırken de gen ekspresyon seviyelerinde bazı farklılıklar meydana gelebilir. Bu nedenle konvansiyonel yöntemlerle saptamış olduğumuz sonuçlar genel olarak moleküler yöntemle paralel gitse de sadece ampisilin ve NAC birlikteliğinde *icaA* ve *sarA* gen

ekspresyon seviyelrinde anlamlı bir farklılık gözlenememiş olmasının bu sebepten kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; ampisilin ve NAC ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda, vankomisin ve NAC ile sinerjik etki gösteren kuyucuklarda ve vankomisin ile aditif etki tespit edilen kuyucuklarda, *icaA, icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrole göre bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu gruplarda konvansiyonel yöntemler ve moleküler yöntemle elde edilen sonuçlar birbirini desteklemektedir.

NAC molekülünün antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında antibiyotiklerin MİK değerleri, MBEK değerleri ve biyofilm oluşumunda rol oynayan gen ekspresyonlarının seviyeleri üzerine öngörmüş olduğumuz etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Özellikle tedavisi zor olan, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde, NAC molekülünün antibiyotiklerle birlikte kullanılmasının tedaviyi kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızın sonucu olarak stafilokoklarda gösterilmiş olan bu etki sonucunda, NAC molekülünün kombine ilaç tedavisi için yeni bir alternatif olabileceği söylenebilir.

Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, NAC molekülünün diğer mikroorganizmalar ve antimikrobiyal ajanlar ile birlikte çalışılmasının da, tedaviye yeni yaklaşımlar açısından, umut vaad edici olduğu düşünülmektedir.

SONUÇ

1. NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında bu antibiyotiklerin stafilokoklara etki eden MİK değerlerini düşürdüğü tespit edilmiştir.
2. NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında bu antibiyotiklerin stafilokok biyofilmine etki eden MBEK değerlerini düşürdüğü tespit edilmiştir.
3. NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında stafilokoklarda biyofilm oluşumunda etkili olan genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak;

Özellikle tedavisi zor olan, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde, NAC molekülünün antibiyotiklerle birlikte kullanılmasının tedaviyi kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızın sonucu olarak stafilokoklarda gösterilmiş olan bu etki sonucunda, NAC molekülünün kombine ilaç tedavisi için yeni bir alternatif olabileceği söylenebilir. Ayrıca NAC molekülünün diğer mikroorganizmalar ve antimikrobiyal ajanlar ile de birlikte çalışılmasının tedaviye yeni yaklaşımlar kazandırması açısından umut vaad edici olduğu düşünülmektedir

ÖZET

Biyofilmler, antibiyotik etkisine dirençli ve antifagositik etkileri olması nedeniyle sıklıkla tedavisi zor, kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. *Staphylococcus aureus ve S. epidermidis* hastane kökenli enfeksiyonların en sık etkenlerinden olmaları, enfeksiyonların çoğunlukla biyofilm kaynaklı olmaları nedeniyle oldukça önemli etkenlerdir.

Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 adet *S. aureus ve S. epidermidis* izolatının, biyofilm yapma yeteneklerinin, stafilokok tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonlarının (MBEK) ve biyofilm oluşumu ile ilgili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyelerinin, N-asetilsistein (NAC) molekülü varlığındaki değişimin ortaya konması amaçlandı. Çalışmada, mikroplak kristal viyole yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, dama tahtası yöntemi ve qRT-PCR tekniği kullanıldı. Kontrol ve deneme gruplarının (sinerji ve aditif etki tespit edilen konsantrasyonlar) karşılaştırılmasında Student-T testi kullanıldı; $p<0,05$ değeri anlamlılık sınır değeri kabul edildi.

Çalışmamızda, NAC molekülünün ampisilin ve vankomisin ile birlikte kullanıldığında bu antibiyotiklerin stafilokoklara etki eden MİK değerlerini ve stafilokok biyofilmine etki eden MBEK değerlerini düşürdüğü ve ayrıca stafilokoklarda biyofilm oluşumunda etkili olan *icaA, icaD* ve *sarA* genlerinin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, NAC molekülünün kombine ilaç tedavisi için yeni bir alternatif olabileceği söylenebilir. Ayrıca NAC molekülünün diğer mikroorganizmalar ve

antimikrobiyal ajanlar ile de birlikte çalışılmasının tedaviye yeni yaklaşımlar kazandırması açısından umut vaad edici olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: N-asetilsistein (NAC), *Staphylococcus*, antibiyofilm aktivite, ampisilin, vankomisin.

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEIN ON ANTIBIOFILM EFFICIENCY OF ANTIBIOTICS IN STAPHYLOCOCCUS ISOLATES

SUMMARY

Biofilms are often responsible for difficult to treat chronic infections due to their antibiotic and antiphagocytic effects. *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* are quite important agents because of their biofilm forming capability and being one of the most common hospital-originated infections.

In this study, it is aimed to reveal that; biofilm forming capability of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains which are isolated from various clinical samples obtained from Trakya University Health Research and Application Center Hospital, the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) of antibiotics used in staphylococcal treatment and, expression levels of genes thought to be related to biofilm forming in the presence of N-acetylcysteine (NAC) molecule. In this study, microplate crystal violet method, microdilution method, checkerboard method and qRT-PCR technique were used**.** The Student-T test was used to compare the control and experimental groups (concentrations detected with synergy and additive effect); $p<0.05$ was accepted as the limit value of significance.

In our study, when NAC molecule was used together with ampicillin and vancomycin, MIC values of antibiotics to these staphylococci and MBEC values that affect staphylococcus biofilm have decreased. Also the expression levels of *icaA, icaD* and *sarA* which were effective in biofilm formation in staphylococci have changed.

In conclusion, we may say that; NAC molecule may be a new alternative for combined drug therapy as a result of this effect shown in staphylococci in our study. In addition, it is thought that working with NAC molecule together with other microorganisms and antimicrobial agents is promising in terms of providing new approaches to treatment.

Keywords: N-acetylcysteine (NAC), *Staphylococcus*, antibiofilm activity, ampicillin, vancomycin.

KAYNAKLAR

1. Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. Gıda Dergisi 2009;34(3):165–173.

2. Çiftçi İ, Çetinkaya Z, Aktepe OC, Arslan F, Altındiş M. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duryarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2005;35:98–102.

3. Jones CJ, Newsom D, Kelly B, Irie Y. ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 2014;10(3):1–17.

4. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol 2007;5(1):48–56.

5. Murray PR, EJ Baron, Jorgensen JJ, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. ASM Press: Washington DC; 2009. p.390-411.

6. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW,Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunology&Medical Microbiology 2007;52(1):13-22.

7. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. Cardiovascular Pathology 2006;15(5):264-270.

8. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. Appl Environ Microbiol 2003;69(8):4814-4822.

9. Eroshenko D, Polyudovaatyana T, Korobov V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. Microbial Pathogenesis 2017;105:145-152.

10. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram-Positif Coccus. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 2017;5:670-732.

11. Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2004:495-523.

12. Cengiz AT, Ustaçelebi S, Mutlu G, Emir T, Cengiz AT,Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Günes Kitabevi, 1999:339-347.

13. Akan M. *Staphylococcus* infeksiyonları. In: Aydın N, Paracıkoğlu J. (Editörler). Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara:İlke-Emek Yayınları; 2006. s.6-12.

14. Cunha BA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. Clin Microbiol Infect Dis 2005;11:33-42.

15. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Ankara:Medisan Yayınları, 2011:235-254.

16. Kloss WE, Bannerman TL. Staphlococcus and Micrococcus. 7th ed. Washington DC: ASM Press, 1999:264-277.

17. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir:Barış Yayınları, 2000:s.240-266.

18. Coşkun A, Ulaş M. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1999:46-73.

19. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus.* In: Mandell GL, Bennet, JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia:Churchill Livingstone; 2000. p.2069-2092.

20. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. Molecular Microbiology 2017;104(3):365‑376.

21. Lawrence DW, Barth RL, Andrew AJ, Reller ME, Ahmad N, Pottinger P,Weissman S, et al. Sherris Medical Microbiology. 7 th ed. New York: McGraw-Hill Education , 2019:390-420.

22. Sudağidan M, Cavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Investigation of the virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from biomaterial surfaces. Mikrobiyol Bul 2008;42(1):29-39.

23. Naber CK. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. Clin Infect Dis 2009;4:231-7.

24. Sancak B. *Staphylococcus*. Özkuyumcu C (Editör). Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. 1. Baskı. Ankara:Güneş Kitabevi; 2009:s.43-50.

25. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015;28(3):603-61.

26. Dubin G. Extracellular proteases of Staphylococcus spp. Biol Chem 2002;383:1075-1086.

27. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 1998;12:484–488.

28. Baird D, Collee JG, Marmion SP, Simmons A. *Staphylococcus* cluster forming Gram positive cocci. Pract Med Microbiol 1996;245-262.

29. Yıldırım N, Sezen Y, Ardıç N, İleri Ç. Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Koagülaz-Negatif Stafilokokların Slime Faktör Üretimlerinin ve Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 2008;22(4):209–214.

30. Güleç GU, Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda makrolid linkozamid streptogramin b direnci için fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması (tez). Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2010.

31. Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acidnet charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces. Infect Immun 2001;69(5):3423-6.

32. Kong EF, Johnson JK, Jabra-Rizk MA. Community-Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. PLoS Pathog 2016;12:10-17.

33. Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pathogenesis. Infect Immun 2011;79(5):1927-35.

34. https://bio.libretexts.org/Ancillary_Materials/Experiments/Microbiology_Labs_I/22A%3A_Identification_of_Staphylococcus_Species (Erişim tarihi: 01.07.2019)

35. Sultan N. Stafilokoklar ve benzer Gram-pozitif koklar. Başustaoğlu A.C. (Ed.). Tıbbi Mikrobiyoloji. 6 th ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2014. s.209-223.

36. Levinson W. (Çeviri: B. Şener, B. Esen) Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. 14 th ed. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2017:230-310.

37. Vazquez V, Liang X, Horndahl JK, Ganesh VK, Smeds E, Foster TJ, Hook M. Fibrinogen is a ligand for the Staphylococcus aureus microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp). The Journal of biological chemistry 2011;286:29797–29805.

38. Ponnuraj K, Bowden MG, Davis S, Gurusiddappa S, Moore D, ChoeD, Xu Y, et al. A dock, lock and latch structuralmodel for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. Cell 2003;115:217-28.

39. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 1998;339:520-32.

40. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of Staphylococcus species strains based on partial kat (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species. J Clin Microbiol 2010;48(1):192-201.

41. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. J Clin Microbiol 2003;41(9):4465-7.

42. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. Current Opinion in Microbiology 2014;17:32-37.

43. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. Staphylococcus aureus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). Staphylococcal Toxic Shock. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p.2321-51.

44. Müştak HK, Esendal ÖM. Staphylococcus Ekzotoksinleri. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2008;19:69-73.

45. Vuong C, Otto M. Staphylococcus epidermidis infections. Microbes and Infection 2002; 4:481-9.

46. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000;61,1-10.

47. Ulusal mikrobiyoloji standartları, Staphylococcus aureus tanımlama ve AMD Testleri. Mikrobiyolojik Tanımlama. AMD-MT-01;2014.

48. Husain F. Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of Staphylococcus aureus. Med Phys 2014;19(5):1307–131.

49. Çelik İ, Cihangiroğlu M, Sevim E, Çabalak M, Akbulut A. Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen Koagülaz Pozitif ve Negatif Stafilokoklarda metisilin direnci ve slime pozitifliği. Fırat Tıp Dergisi 2005;10(3):123-126.

50. Donlan R. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8:881-890.

51. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms survival mechanisms of clinically relevantmicroorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15:167-193.

52. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:3-9.

53. Camara, M. Quorum sensing: a cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioral changes in bacterial populations. Membrane Computing 2006;42-48.

54. Jefferson KK. What Drives Bacteria To Produce a Biofilm. FEMS Microbiology Letters 2004;236:163–173.

55. Allison DG. The biofilm matrix. Biofouling 2003;19(2):139-150.

56. Arnold J, Silvers S. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poultry science 2000;79 (8):1215-1221.

57. Altun HU, Şener B. Biyofilm İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2008;39:82-88.

58. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology 2000;54(1):49-79.

59. Stickler D. Biofilms. Curr Op in Microbiol 1999;2:270-275.

60. Sakarya S. Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans vetedavisindeki rolü. Klimik Dergisi 2005;18(1):3-8.

61. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:3-9.

62. Ophir T, Gutnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection ofmicroorganisms from desiccation. Appl Environ Microbiol 1994;60(2):740-5.

63. Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay tomonitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 2000;66:1851-1856.

64. Hussain M, Wilcox MH. The slime of coagulase-negative staphylococci:biochemistry and relation to adherence. Microbiol Rev 1993;10:191-207.

65. Vasudevan R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. J Microbiol Exp 2014;1:3-5.

66. Kumar A, Prasad R. Biyofilms. JK Science 2006;8(1):14-17.

67. Schluter P, Nadell CD, Bassler BC, Foster KR. Adhesion as a weapon in microbial competition. The ISME Journal 2015;9,139-149.

68. Diana M, Ariafar MN, Akçelik N. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. Turk Hij Den Biyol Derg 2016;73:71-80.

69. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2018;48(1):1-13.

70. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: acommon cause of persistent infections. Science 1999;284(5418):1318.

71. Akan E, Kınık Ö. Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi 2014;14,42-51.

72. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:999-1007.

73. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. Cardiovascular Pathology 2006;15 (5),264-270.

74. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to moleculargenetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64 (4):847-67.

75. Uludağ Altun H, Şener B. Biyofilm, infeksiyonlar ve antibiyotik direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2008;39:82-8.

76. Yassien M, Khardori N. Interaction between biyofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;40:79-89.

77. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biyofilms. Microbes and Infect 2003;5:1213-9.

78. Güvense NC, Ekmekcioğlu S. Biyofilm kontrolünde biyositler ve etkitarzları. Mikrobiyoloji Dergisi 2016;14:1-19.

79. Kaynak Onurdağ F, Ozgen S, Abbasoğlu U, Gürcan IS. Comparison of two different methods for the investigation of in vitro susceptibilities of planktonic and biofilm forming Candida species to antifungal agents. Mikrobiyol Bul 2010;44(4):619-31.

80. Battin TJ, Besemer K, Bengtsson MM, Romani AM, Packman A I. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. Nature Reviews Microbiology 2016;14,251-253.

81. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. Antibiofilm polysaccharides. Environmental Microbiology 2012;15,334–346.

82. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: From ecology to moleculargenetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64:847-67.

83. İstanbulluoğlu H, Oğur R, Tekbaş ÖF. Su sistemlerinde mikrofilm (biyofilm)tabakası. TSK Koruyu Hekimlik Bülteni 2010;9:553-5.

84. Türetgen İ. Su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun incelenmesi (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2005.

85. Brooks JD, Flint SH. Biofilms in the food industry: problems and potentials solutions. Int J Food Sci Technol 2008;43:2163-76.

86. Simões M, Simões L C, Vieira M J. A review of current and emergent biofilmcontrol strategies. Food Science and Technology 2010;43:573-83.

87. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, afcus on the bacterial outer surface. J Appl Microbiol 2010;109:1117-31.

88. Ceyhan N. Klinikte biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri. İnfeksiyon Dergisi 2008;22:227-40.

89. https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/biofilmbook/contents/chapters/chapter003/section003/blue/page002.html (Erişim tarihi: 10.07.2019).

90. https://www.wqpmag.com/scaling-back-bacteria (Erişim tarihi: 10.07.2019)

91. Öztürk BŞ, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul BM. Biyofilmler ve Yabacı Cisim İnfeksiyonları. Klimik Dergisi 2008;21(3):79–86.

92. Güven N, Kaynak Onurdağ F. İlaç, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılan bazı koruyucuların antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2014;48(1):94-105.

93. Thurlow LR, Hanke M, Fritz T. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent phagocytosis. The Journal of Immunology 2011;186,6585–6596.

94. Sarıgöl E, Ekizoğlu M, Pehlivana SB, Bodur E, Sağıroğlu M, Çalış S. A thermosensitive gel loaded with an enzyme and an antibiotic drug for the treatment of periprosthetic joint infection. Journal of Drug Delivery Science and Technology 2018;43,423–429.

95. Hogan S, NT Stevens, Humphreys H, O'Gara JP, O'NeillE. Current and future approaches to the prevention and treatment of staphylococcal medical device-related infections. Current Pharmaceutical Design 2015;21,100-113.

96. Ünal D, Tayfur M. Biyofilm. Güncel Gastroenteroloji 2017;21/2:108-114.

97. Romeo T. Bacterial Biofilms. Berlin:Springer-Verlag Heidelberg, 2008:207-228.

98. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic andphenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biyofilm formation and MSCRAMMs. Veterinary Microbiology 2004;103:241-7.

99. Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2006;70:192-221.

100. McCrea KW, Hartford O, Davis S. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 2000;146:1535-1546.

101. Peschel A, Vuong C, Otto M, Gotz F. The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2845-2847.

102. Navarre WW, Schneewind O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. Mol Microbiol 1994; 14:115–121.

103. Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, Hook M, et al. A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. EMBO Journal 2005;24:4224–4236.

104. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, Foster TJ, O'Gara JP. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. Journal of bacteriology 2008; 190:3835-3850.

105. McCourt J, O'Halloran DP, McCarthy H, O'Gara JP, Geoghegan JA. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. FEMS Microbiol Lett 2014; 353:157-164.

106. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol 2014;12:49-62.

107. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysinmediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to apolystyrene surface. Molecular Microbiology 1997;24(5):1013-24.

108. Heilmann C, Thumm, G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekötter A, Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 2003;149:2769-78.

109. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus* . J Infect Dis 2000;182:1688-1693.

110. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis.* Antimic-rob Agents Chemother 2000;44:3357-63.

111. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, Ali AM, et al. Prevalence of Adhesion and Regulation of Biofilm-Related Genes in Different Clones of *Staphylococcus aureus*. J Biomed Biotechnol 2012:976-72.

112. Pei L, Flock JI. Functional study of antibodies against a fibrogeninbindingprotein in *Staphylococcus epidermidis* adherence to polyethylene catheters. JID 2001;184:52-5.

113. Cramton S, Gerke C, Schnell NF, Nicholson WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun 1999;67:5427-33.

114. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA, icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries 2009;3:352-51.

115. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol 2003;92:179-85.

116. Rohde H, Knobloch JKM, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. J Clin Microbiol 2001; 39:4595-6.

117. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ,Blevins JS, et al. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. Journal of Bacterıology 2004;186(14):4665-4684.

118. Fitzpatrick F, Humphreys H, James P, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-ındependent biofilm development mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical ısolates. Journal of Clınıcal Mıcrobıology 2005; 4(43):1973-76.

119. Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr1 A. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellularadhesin. FEMS Microbiol Lett 2006;255:11-16.

120. O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiol Lett 2007;270:179-188

121. McKenney D, Hübner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect Immun 1998;66(10):4711-20.

122. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakon N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol. Microbiol 1996;20,1083-1091.

123. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001;39(6):2151-6.

124. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. Environmental Biotechnology 2002;13:228-33.

125. Yüksekdağ ZN, Baltacı N. *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2013;43(3):77-83.

126. Derek EM, Kenneth WB. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. Mol Microbiol 2017;104(3):365-376.

127. Alexandra E. Paharik and Alexander R. Horswill. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. Microbiol Spectr 2016;4(2):101-128.

128. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm:structuraland regülatöry aspects. Frontiersin Cellular and Infection Microbiology 2015;7:1-10.

129. Büttner H, Mack D, Rohde H, Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. Frontiersin Cellular and Infection Microbiology 2015;14:1-15.

130. Nathan K, Archer, Mark J. Mazaitis, Costerton JW, Jeff GL, Powers ME,Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease. Bioscience 2011;2(5):445-459.

131. Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect Immun 1997;65(3):890-6.

132. Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Ryden C, Elsolh N. Screening for *Stphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin–flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. J Infect Dis 2000;182:351-355.

133. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercelluler adhesin /hemaglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associatedinfection in a rat model. Infect Immun 1999;67:2656-2659.

134. Şahin R. *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması (tez). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2007.

135. de Castro Melo P, Ferreira LM, Filho AN, Zafalon LF, Vicente HI, de Souza V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Braz J Microbiol 2013;44:119-24.

136. Atshan SS, Shamsudin MN. Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicilin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Ann Microbiol 2011; 61:825-31.

137. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production, in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Vet Res Commun 2010; 34:81-9.

138. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 2001;183:2888-96.

139. Trotonda MP, Manna AC, Ambrose L, Lasa CI, Penade S. *sarA* Positively Controls Bap-Dependent Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacterıology 2005;5790(5798):187-16.

140. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. Chem& Biology 2002;9:859-71.

141. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS. Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus sarA* mutants. PLoS One 2008;3(10):e3361.

142. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, Novick RP. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology 2008;154(8):2265-74.

143. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2000;182:1688-1693.

144. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nature reviews Microbiology 2013;11:667-673.

145. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry andbiological activities of N-acetylcysteine. Biochim Biophys Acta 2013;1830:4117-4129.

146. Blasi F, Page C, Rossolini GM, Pallecchi L, Matera MG, Rogliani P, Cazzola M. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: implications for thetreatment of respiratory tract infections. Respir Med 2016;117:190 -197.

147. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. Clin Pharmacokinet 1991;20:123-134.

148. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcysteine (Erişim tarihi: 01.08.2019)

149. Perez-Gıraldo C, Rodriguez-Benıto A, Moran Fj, Hurtado C, Blanco Mt, Gomez-Garcia AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother 1997;39:643-646.

150. Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche R. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilmembedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob. Agents Chemother 2007;51,1556-1558.

151. Abdi Ali A, Mohammadi-Mehr M, Alaei YA. Bactericidal activity of various antibiotics against biyofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents 2006;27:196-200.

152. Parry MF, Neu HC. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. J Clin Microbiol 1977;5:58-61.

153. Domenech M, Garcia E. N-acetyl-l-cysteine and cysteamine as new strategies against mixed biofilms of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2017;61(2):1992-16.

154. Schwandt LQ, Van-Weıssenbruch R, Stokroos I, Van Der Meı HC, Busscher HJ, Albers FW. Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. Acta Otolaryngol 2004;124:726-731.

155. Zhao T, Lıu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 2010;10:140.

156. Bulut F, Merıc F, Yorgancılar E, Nergız Y, Akkus M, Nergız S, Nasır Y. Effects of N-acetyl-cysteine and acetylsalicylic acid on the tonsil bacterial biofilm tissues by light and electron microscopy. European Review for Medical and Pharmacol Sciences 2014;18: 3720-3725.

157. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol In Combınatıon Wıth N-Acetylcysteıne Agaınst *Staphylococcus epıdermıdıs* Planktonıc And Bıofilm Cells. Brazilian Journal of Microbiology 2012;235-242:1517-8382.

158. Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. Int J Artif Organs 2011;34(9):752-758.

159. Huynh HQ, Couper RT, Tran CD, Moore L, Kelso R, Butler RN. N-acetylcysteine, a novel treatment for *Helicobacter pylori* infection. Dig Dis Sci 2004;49:1853-1861.

160. Dınıcola S, De Grazıa S, Carlomagno G, Pıntuccı JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review, European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2014;18:2942-2948.

161. Lea J, Conlin AE, Sekirov I, Restelli V, Ayakar KG, Turnbull L, et al. In vitro efficacy of N-acetylcysteine on bacteria associated with chronic suppurative otitis media. J Otolaryngol Head Neck Surg 2014;7(43):20-28.

162. Del Prado G, Ruiz V, Naves P. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, NF acetylcysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. Diagn Microbiol Infect Dis 2010;67:311-318.

163. Riise G C, Qvarfordt I, Larsson S, Eliasson V, Andersson BA. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. Respiration 2000;67(5):552-558.

164. Zheng CH, Ahmed K, Rikitomi N, Martinez G, Nagatake T. The effects of Scarboxymethylcysteine and N-acetylcysteine on the adherence of *Moraxella catarrhalis* to human pharyngeal epithelial cells. Microbiol Immunol 1999;43:107-113.

165. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol 2007;7:355-359.

166. Palaniswamy U, Lakkam SR, Arya S, Aravelli S. Effectiveness of N-acetyl cysteine, 2% chlorhexidine, and their combination as intracanal medicaments on Enterococcus faecalis biofilm. J Conserv Dent 2016;19(1): 17–20.

167. El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. Pol J Microbiol 2009;58(3):261-267.

168. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. Int J Antimicrob Agents 2003;22(2):95-100.

169. Mohsen A, Gomaa A, Mohamed F, Ragab R, Eid M, Ahmed AH, et al. Antibacterialanti-biofilm activity of some non-steroidal anti-inflammatorydrugs and N-acetylcysteine against some biofilm producing uropathogens. Am J Epidemiol Infect Dis 2015;3(1)1-9.

170. Drago L, De Vecchi E, Mattina R, Romano CL. Activity of N-acetyl-L-cysteineagainst biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials. Int J Artif Organs 2013;36 (1):39-46.

171. Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY. In vitro effects of N-acetyl cysteinealone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. J Microbiol 2015;53(5):321-329.

172. Roveta A, Debbia E, Schito G, Marchese A. Comparison of the activity of Nacetylcysteine, ambroxol, bromexine and sobrerol on *Staphylococcus aureus* biofilms. GIMMOC 2004;8(1):12-19.

173. Bozzolasco M, Debbia EA, Schito GC. Rilevanza dei biofilm batterici nelleinfezioni respiratorie: problematiche terapeutiche e possibili soluzioni. GIMMOCVI 2002;3:203-215.

174. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R.Combinedeffect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Enferm Infec Microbiol Clin 2013;3(10):655-659.

175. Kirmusaoglu S, Yurdugül S, Koçoglu ME. The effect of N-acetylcysteine on growth and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* strains. Turk J Med Sci 2012;42(4):689-694.

176. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. J Med Microbiol 2009;58(7):936-944.

177. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of Enterococcus faecalis. J Endod 2012;38:81-85.

178. El-Baky RMA, El Ela DMMA, Gad GFM. N-acetylcysteine inhibits anderadicates *Candida albicans* biofilms. Am J Infect Dis Microbiol 2014;2(5):122-130.

179. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. Critical Reviews In Microbiology 2017: 43(3):313-351.

180. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th Informational Supplement. CLSI M100-S28, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 2018.

181. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.

182. Kırmusaoğlu S. Biofilm and screening antibiofilm activity of agents. Intech Open, 2019.

183. Harrison JJ, Raymond JT, Howard C. High-throughput (HTP) Assay For Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. BMC Microbiology 2005;5(53):1-11.

184. Cerca N, Martnis S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005;56(2): 331-336.

185. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37:1771-6.

186. Güven N. İlaç, Kozmetik ve Gıda Ürünlerinde Kullanılan Bazı Koruyucuların Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Etkisinin Araştırılması (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2013.

187. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T, Coltella L, Berlutti F. Biotimerassay a new method for couting *Staphylococcus* spp.in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. Journal of Microbiological Methods 2008;75:478-84.

188. Fassel TA, Edmiston CE. Evaluating adherent bacteria and biofilm using electron microscopy. In: Yuehuei H, Friedman RJ (Eds.). Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. New Jersey: Humana Press Inc; 2000. p.235-248.

189. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology 1985;22:996-1006.

190. Christensen GD, Simpson WA,Anglen JO, Gainor BJ. Methods forevaluating attached bacteria andbiofilms. In: An YH, Friedman RJ (Eds.). Handbook of BacterialAdhesion: Principles Methods, andApplications. Totowa: Humana Press; 2000. p.213-233.

191. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura GD, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilmin microtiter plates: Overview oftesting conditions and practical recommendations for assessment ofbiofilm production by staphylococci. APMIS 2007;115(8):891-899.

192. Özseven GA, Çetin SE, Özseven L. Dama Tahtası Sinerji Testi Sonuçlarının Farklı Yöntemlerle Yorumlanması Sonuçlarımızı Etkiliyor mu. Mikrobiyol. Bul. 2012;46(3):410-20.

193. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of Methods of Interpretation of Checkerboard Synergy Testing. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2002;44: 363-366.

194. Kayiş U. *Acinetobacter spp.* İzolatlarında Dışa Atım Pompası (Dap) İnhibitörlerinin Siprofloksasinin Etkinliği Üzerine Etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2016.

195. Günel T. Gen aktarımının kantitatif analizi "real-time PCR". Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 2007;27:763-767.

196. Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. TAF Prev Med Bull 2014;13(5):421-426.

197. Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000;40(2):175–9.

198. Döşler S, Gürler B. Antimikrobik Etkili Katyonik Peptitlerin Tek Başına ve Kombinasyon Halindeki Etkilerinin Araştırılması. ANKEM Derg 2006;20(3):173-179.

199. Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-159.

200. Gad GFM, Aziz AAA, Ibrahem RA. In-vitro adhesion of *Staphylococcus spp*. to certain orthopedic biomaterials and expression of adhesion genes. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2012;02(06):145-149.

201. Juhlin A, Svensson S, Thomsen P, Trobo M. Staphylococcal biofilm gene expression on biomaterials-A methodological study. J Biomed Mater Res Part A 2017;105(12):3400-3412.

202. Livak K J, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. Method 2001;25(4):402-408.

203. Ruxton GD. The un equal varience t-test is underreused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U-test. Behavioral Ecology 2006;(2):688-690.

204. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR metho for thedetection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* inperiprosthesis infections. Diagn Mol Pathol 2001;10:130-137.

205. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilmformation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three differentscreening methods. Indian J Med Microbiol 2006;24:25-29.

206. Arıbaş ET, Özcan M, Altındiş M. Klinik örneklerden izole edilen stafilokokların antibiyotik direnç oranları. İnfek Derg 2001;15:73-7.

207. Diaz GCA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a metaanalysis. Clin Infect Dis 2005;41(3):327-33.

208. Deresinski S. Counterpoint:Vancomycin and *Staphylococcus aureus*-an antibiotic enters obsolescence. Clin Infect Dis 2007;44(12):1543-8.

209. Hota B, Blom DW, Lyle EA. Weinstein RA, Hayden MK. Interventional evaluation of environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci: failure of personnel product or procedure. J Hosp Infect 2009;71(2):123-31.

210. Gocer H, Emir D, Onger ME, Dabak N. Effects of bone cement loaded with teicoplanin, N-acetylcysteine or their combination on *Staphylococcus aureus* biofilm formation:an in vitro study. Eklem Hastalik Cerrahisi 2017;28(1):13-18.

211. Efrati S, Berman S, Siman-Tov Y, Lotan R, Averbukh Z, Weissgarten J, et al. N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis. Nephrol Dial Transplant 2007;22:1873-1881.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Gram boyama yöntemi ile boyanmış Stafilokokların mikroskobik görünümü (x100) . **5**

Şekil 2. *S. aureus* (solda) ve *S.epidermidis* (sağda) koloni morfolojisi (%5 koyun kanlı agar) **5**

Şekil 3. *S. aureus'*un hücre duvar yapısı **7**

Şekil 4. Biyofilmin oluşum evreleri **15**

Şekil 5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile biyofilm oluşumunun mikrografisi A. Oluşmuş olgun biyofilm B. Biyofilm oluşan yüzey ve tutunan bakteri hücreleri C. Biyofilme bağlı bir bakteri hücresi **15**

Şekil 6. Biyofilmin çeşitli teçhizatlar üzerinde neden olduğu hasarlar **18**

Şekil 7. Stafilokokların intravasküler medikal cihazlarda biyofilm oluşturma modeli..... **20**

Şekil 8. Stafilokoklarda biyofilm oluşumu ve bu evrelerde görevli proteinler **21**

Şekil 9. Stafilokoklarda biyofilm oluşumunun SEM görüntüsü görüntüsü A. Biyofilm oluşturmuş bakteriler B. Eritrosit **22**

Şekil 10. Stafilokoklarda PIA yapısı ve sentezi a.PIA yapısının SEM görüntüsü b. PIA'nın kimyasal yapısı c. PIA'nın sentez aşamaları (1.polimerizasyon 2. Sentez sonrası hücre duvarına taşıma 3. PIA deasetilaz enzimi ile deasitilasyon) **23**

Şekil 11. Stafilokoklarda *bap* proteinin yapısı **24**

Şekil 12. Çıkıntılı kapaklı mikroplak **31**

Şekil 13. Microgen® Staph-ID kiti renk tablosu **40**

Şekil 14. %5 glukoz içeren triptik soy agarda üremiş stafilokok kolonileri **41**

Şekil 15. Kristal viyole-mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespiti..... **42**

Şekil 16. Mikrodilüsyon yöntemi için McFarland 0,5 standart yoğunluğunda..... **44**

Şekil 17. Mikrodilüsyon yöntemi ile bakterilerin MİK değerlerinin belirlenmesi **44**
Şekil 18. Dama tahtası yönteminde sonuçların değerlendirilmesi **45**
Şekil 19. Sonikasyon işlemi sonrası üremiş bakteri kolonileri **47**
Şekil 20. Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi için bakterilerin biyofilm oluşturma işlemine alınması..... **48**
Şekil 21. Kullanılan maddelerin kombinasyonlarının antibiyofilm etkisinin **49**
Şekil 22. Sonikatör içerisine yerleştirilen plaklar **50**
Şekil 23. Sonikasyon işlemi sonrası plaklarda bulunan bakteri sayısının tespiti için 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranında sulandırılmış örneklerin MHA besiyerine ekimi ve bakteri sayım işlemleri..... **50**
Şekil 24. Kontrol plaklarında biyofilm oluşumunun kristal viyole doğrulanması **51**
Şekil 25. RNA izolasyonu için ependorfa alınan örneklerin 95 ºC'de 15 dk inkübasyona alınması..... **54**
Şekil 26. qRT-PCR için kullanılan Roche Light Cycler Nano cihazı **55**
Şekil 27. Örneklerin *icaA, icaD ve sarA* genlerinin ekspresyon seviyelerinin tespiti için qRT-PCR reaksiyonunun hazırlanması..... **55**
Şekil 28. Stafilokoklar için kullanılan Microgen® Staph-ID identifikasyon kiti test sonucu . **58**
Şekil 29. Sefoksitin disk testi sonucu..... **59**
Şekil 30. Antimikrobiyal duyarlılık için FİK değerlerinin hesaplanması (A:ampisilin veya vankomisinin konsatrasyonu B: NAC'ın konsantrasyonu) **65**
Şekil 31. Antibiyofilm aktivite için FİK Değerlerinin Hesaplanması..... **73**

TABLOLAR

Tablo 1. *Staphylococcus* cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması **5**
Tablo 2. Klinik öneme sahip *Staphylococcus* türleri için önemli testler ve sonuçları **6**
Tablo 3. *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in virülans faktörleri ve biyolojik etkileri..... **11**
Tablo 4. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ve etken mikroorganizmalar **19**
Tablo 5. NAC'ın Uluslararası İlaç Kütüphanesi bilgileri **26**
Tablo 6. Bakteriyel ve fungal patojenlere karşı NAC'ınantibiyofilm aktivitesini gösteren in-vitro çalışmalar **28**
Tablo 7. Biyofilm tespitinde kullanılan yöntemler ve amaçları **29**
Tablo 8. Antibiyofilm ajanlarının etkisini saptamada kullanılan yöntemler, uygulamaları ve amaçları **35**
Tablo 9. Bakteri izolatlarının numaraları izole edildikleri hasta grupları ve örnekleri **38**

Tablo 10. Microgen® Staph-ID kiti referans substratları ve reaksiyon değerlendirmesi **39**
Tablo 11. Sınır değer (ODc) ve biyofilm yoğunluk kategorileri **42**
Tablo 12. Antimikrobiyal duyarlılık için dama tahtası testinde kullanılan antibiyotik (ampisilin veya vankomisin) ve NAC'ın kullanılan konsantrasyonları (μg/mL) ve FİK hesaplanması **46**
Tablo 13. Antibiyofilm aktivite için dama tahtası testinde kullanılan antibiyotiğin (ampisilin veya vankomisin) ile NAC'ın kullanılan konsantrasyonları (μg/mL) ve FİK hesaplanması ... **52**
Tablo 14. *S.aureus* ve *S.epidermidis* gen bölgeleri için bir reaksiyonluk qRT-PCR Karışımı **54**
Tablo 15. *Staphylococcus aurens* için qRT-PCR' da kullanılan primer dizileri, Tm dereceleri ve elde edilen ürün boyutu **56**
Tablo 16. *Staphylococcus epidermidis* için qRT-PCR' da kullanılan primer dizileri, Tm dereceleri ve elde edilen ürün **56**
Tablo 17. Toplanan örnek sayısı ve dağılımları **58**
Tablo 18. ODc hesaplanması ve sınır değerlerin tespiti **59**
Tablo 19. Biyofilm oluşturma yoğunluk sınıflaması **59**
Tablo 20. Biyofilm pozitif örneklerin OD değerleri ve biyofilm dereceleri **60**
Tablo 21. Çalışılan izolatların biyofilm düzeylerinin dağılımı ve yüzdeleri **62**
Tablo 22. Stafilokokizolatlarının ampisilin vankomisin ve NAC duyarlılık sonuçları **63**
Tablo 23. 83 numaralı izolat için ampisilin ve NAC kombinasyonunun MİK değerleri ve FİKİ hesaplanması **66**
Tablo 24. 83 numaralı izolat için vankomisin ve NAC kombinasyonunun MİK değerleri ve FİK hesaplanması **67**
Tablo 25. Ampisilin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü **68**
Tablo 26. Vankomisin ve NAC'ın MİK değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü **70**
Tablo 27. İzolat numaraları ve biyofilmdeki bakteri inokulumu **72**
Tablo 28. 136 numaralı izolat için ampisilin ve NAC kombinasyonunun MBEK değerleri ... **74**
Tablo 29. 136 numaralı izolat için vankomisin ve NAC kombinasyonunun MBEK değerleri **75**
Tablo 30. Ampisilin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü **76**
Tablo 31. Vankomisin ve NAC'ın MBEK Değerleri, Dama Tahtası Sonuçları, FİKİ değerleri ve etkileşim türü **78**

Tablo 32. Ampisilin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu **79**
Tablo 33. Vankomisin ve NAC konsantrasyonlarına göre etkileşim gözlenen kuyulardaki bakteri sayım sonuçları ve log_{10}'na göre azalan bakteri inokulumu **82**
Tablo 34. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması **84**
Tablo 35. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri **85**
Tablo 36. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında sinerjik etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları **86**
Tablo 37. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, ampisilin ile sinerji oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi **86**
Tablo 38. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması **87**
Tablo 39. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri **88**
Tablo 40. Kontrol kuyucuğu ve ampisilin ile NAC arasında aditif etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları **88**
Tablo 41. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, ampisilin ile aditif etki oluşturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi **89**
Tablo 42. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması **89**
Tablo 43. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri **90**
Tablo 44. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında sinerjik etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları **90**
Tablo 45. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, vankomisin ile sinerji oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem **90**
Tablo 46. Kontrol kuyucuğu ve vankomisinile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklardaki örneklerin Ct değerleri ortalaması **91**

Tablo 47. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında aditif etki tespit edilen kuyucuklara ait örneklerin rRNA'ya rölatif gen ekspresyon seviyeleri.....**91**
Tablo 48. Kontrol kuyucuğu ve vankomisin ile NAC arasında aditif etki oluşturan örneklerin normalize gen ekspresyon seviyeleri ve oranları.....**92**
Tablo 49. Kontrol kuyucuğu rölatif gen ekspresyon seviyelerinin, vankomisin ile aditif etki oluturan kuyucukların rölatif gen ekspresyon seviyelerine oranının 1'den büyük olmasının istatistiksel önem analizi.....**92**

ÖZGEÇMİŞ

10.12.1988 tarihinde Çorlu'da doğdum. Lisans eğitimimi 2011 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Yüksek lisans eğitimi ise 2013 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji programında tamamladım. 2013 yılında İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümünde araştırma görevlisi olarak işe başladım. 2014 yılında ÖYP programı ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora programına yerleştim. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda 2014 yılından beri araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.

EKLER

Ek 1

T.C.
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı : 17085178-600 -E.204810 13/02/2018
Konu : Çalışma hk.

SAĞLIK ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 13/02/2018 tarihli ve 204487 sayılı yazı,

İlgi yazı gereği, Tez danışmanlığını Prof.Dr.Fatma KAYNAK ONURDAĞ ve ikinci tez danışmanlığını Yrd. Doç. Dr. Canan ERYILDIZ' ın yürütmüş olduğu, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 1138311253 numaralı öğrencisi Gülcan KUYUCUKLU'nun, "Stafilokok İzolatlarında Antibiyotiklerin Antibiyofilm Etkinliği Üzerine N-asetilsisteinin Etkisi" konulu doktora tez çalışmasında yararlanmak üzere, hastanemizden izole edilen stafilokokların kullanılması uygun görülmüştür.

Bilgilerinize saygıyla arz ederim.

e-imzalıdır
Yrd. Doç. Dr. Canan ERYILDIZ
Anabilim Dalı Başkanı V.

13/02/2018 Sekreter Gülder BEŞDALLI

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Balkan Yerleşkesi 22030 Edirne
Telefon:2842357653 Faks2842357652
E-Posta:dekanlik@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://tipfak.trakya.edu.tr/
Bilgi için: Gülder BEŞDALLI
Unvanı: Sekreter

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.