T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

# KİSTİK FİBROZİSLİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGİNOSA SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞUMU VE TEDAVİDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER İLE İLİŞKİSİ

ZEYNEP GÜNGÖRDÜ DALAR

DANIŞMAN
PROF. DR. NEVRİYE GÖNÜLLÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

# İTHAF

*Hayata adımımı attığım ilk andan bu zamana kadar hayat yolculuğumda hep yanımda olan, sevgisi ve desteği ile bana her zaman güven veren canım Annem'e ithaf ediyorum.*

# TEŞEKKÜR

Eğitimim ve öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya,

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca kıymetli bilgi, birikim, tecrübeleri ile bana yol gösteren, deneyimleri ile ışık tutan, hoşgörüsünü, güleryüzünü, yakın ilgisini, teşvik ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye,

Lisanüstü eğitimime başladığım günden itibaren yüreklendirici sözleriyle bana akademik yolda yürüme şevki kazandıran, değerli bilgi ve deneyimlerinden her zaman faydalandığım, kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN'a,

Yüksek lisans eğitimimden bu yana yetişmemde emekleri geçen kürsümüzün çok değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK'e, Sayın Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ'a, Sayın Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye, Sayın Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a, Sayın Prof. Dr. Sevgi ERGİN'e, Sayın Doç. Dr. Erdal POLAT'a, Sayın Doç. Dr. A. Suat SARIBAŞ'a ve Sayın Doç. Dr. Mert Ahmet Kuşkucu'ya,

Yüksek lisansa başlamak üzere kürsümüze adım attığım ilk günden beri engin bilgileriyle beni aydınlatan ve her zaman çalışmaya teşvik eden, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji eğitimim boyunca, her konuda bilgisine hayran olduğum, akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e,

Tez izleme komitesinde yer alarak, değerli görüşleriyle çalışmama katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Özden BORAL'a,

Bilim insanı olarak örnek aldığım, kendisiyle birlikte çalışma fırsatı bulduğum için çok şanslı olduğum, her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Doç. Dr. Barış Ata BORSA'ya,

Doktora eğitimim süresince çalıştığım Altınbaş Üniversitesi'nde bana destek olan ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ÖZBEK'e ve Dr. Tuğçe Naime GEDİK KAPANCIK'a, güler yüzü, candan yardımları ve dostluğu ile sevgili çalışma arkadaşım Dr. Nazlı EZER ÖZER'e,

Hep sevgi, sıcaklık ve dostluğunu hissettiğim, bana güvenen, inanan, destek olan ve cesaretlendiren, her zaman hayatımda yer alacak olan Dr. Fulya KÜÇÜKCANKURT'a,

Doktora eğitimime başladıktan sonra yollarımızın kesiştiği, hedeflerimi gerçekleştirmemde beni yüreklendiren, benimle aynı yöne bakan ve aynı değerlere sahip, en önemlisi dostlukları ile her zaman yanımda olan, sevinçlerimi ve üzüntülerimi paylaştığım Dr. Zeynep TANER'e, Dr. Harika Öykü DİNÇ'e, M.Sc. Yağmur Eylül DOĞANTÜRK'e, Dr. Aykut KURT'a ve M.Sc. Okan AYDOĞAN'a,

Tezimin çalışmaları sırasında, özellikle örneklerin toplanması aşamasında bana candan yardımcı olan Canan ŞİRİN'e, Dr. Sinem ÖZDEMİR'e ve M.Sc. Huriye YILDIZ'a, güleryüzünü ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen M.Sc. Nigar MİRALİZADE'ye, teknik desteklerinden ötürü Erol GÜNDÜZ'e, evraklarımın

takibinde, resmi işlemlerde yardımlarını esirgemeyen Tuba SOYSAL'a ve Fatmagül AKTEMUR'a ve tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanları ve emekçilerine,

Eğitim ve öğretim hayatımın tüm basamaklarında desteklerini her daim arkama alarak başarılara adım attığım, iyi ve kötü günümde hep yanımda olan başta kıymetli annem olmak üzere varlıkları ile bana her zaman güç veren ve beni her konuda destekleyen ailemin tüm fertlerine,

Bu zorlu yolda sabır ve sevgiyle hep yanımda olan, çalışmalarımı anlayışla karşılayan, beni cesaretlendiren ve teşvik eden, varlığının hayatımı anlamlı kıldığı sevgili eşim Alper DALAR'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34669.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR ..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XV
ABSTRACT ..... XVİ
ZUSAMMENFASSUNG ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 3
2.1. Kistik Fibrozis ..... 3
2.1.1. Tanım ..... 3
2.1.2. Tarihçe ..... 3
2.1.3. Epidemiyoloji ..... 4
2.1.4. Prognoz ..... 4
2.1.5. Patogenez ..... 5
2.2. KF'de Solunum Yolu Enfeksiyonları ..... 6
2.3. KF Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Patogenez ..... 7
2.4. *Pseudomonas aeruginosa* ..... 8
2.4.1. Tarihçe ..... 8
2.4.2. Genel Özellikleri ..... 9
2.4.3. Epidemiyoloji ve Bulaş ..... 9
2.4.4. Virulans Faktörleri ..... 10
2.4.4.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri ..... 10
2.4.4.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri ..... 11
2.4.5. Laboratuvar Tanısı ..... 14
2.4.6. Antibiyotik Tedavisi ..... 15
2.4.7. Antimikrobiyal Direnç ..... 15

2.4.7.1. İntrensek Direnç ..... 15
2.4.7.2. Kazanılmış Direnç ..... 17
2.4.7.3. Adaptif Direnç ..... 18
2.5. KF Hastalarında *P.aeruginosa* ..... 18
2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri ..... 21
2.6.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ..... 21
2.6.2. Beta Laktam Antibiyotikler ..... 22
2.6.2.1. Sefalosporinler ..... 22
2.6.2.2. Karbapenemler ..... 22
2.6.2.3. Monobaktamlar ..... 22
2.6.3. Makrolidler ..... 23
2.6.4. Aminoglikozidler ..... 23
2.6.5. Kinolonlar ..... 24
2.6.6. Polimiksinler ..... 24
2.7. Biyofilm ..... 25
2.7.1. Tarihçe ..... 25
2.7.2. Yapısı ..... 25
2.7.3. Oluşumu ve Evreleri ..... 26
2.7.4. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri ..... 28
2.7.5. Biyofilm Tanı Yöntemleri ..... 28
2.7.6. QS ve Biyofilm ..... 30
2.7.7. Biyofilmlerde Antimikrobiyal Direnç ..... 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 34
3.1. Gereçler ..... 34
3.1.1. Standart Suşlar ..... 34
3.1.1.1. *P.aeruginosa* ATTC 27853 ..... 34
3.1.1.2. *P.aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 47085 ..... 34
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ..... 34
3.1.2.1. MacConkey Agar Besiyeri ..... 34
3.1.2.2. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri ..... 35
3.1.2.3. Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri ..... 35
3.1.2.4. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KA-MHB) Besiyeri ..... 35
3.1.2.5. Gliserollü Brucella Broth Besiyeri ..... 35

3.1.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar .....35
3.1.3.1. *P.aeruginosa'nın* Tanımlanması için Kullanılan Ayıraçlar .....35
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....36
3.1.5. Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler .....36
3.1.6. Kullanılan Araç ve Gereçler .....37
3.1.7. Kullanılan Cihazlar ve Aletler .....38
3.2. Yöntemler .....38
3.2.1. *P.aeruginosa* Suşlarının Toplanması .....38
3.2.2. *P.aeruginosa* Suşlarının Tanımlanması ve Muhafaza Edilmesi .....39
3.2.3. Standart Suşların Muhafaza Edilmesi .....39
3.2.4. Biyofilm Deneyleri .....40
3.2.4.1. Peg Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturma Yönteminin Denenmesi .....41
3.2.4.2. Mikroplağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi .....41
3.2.4.3. *P.aeruginosa* Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi .....46
3.2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri .....47
3.2.5.1. Antimikrobiyal İlaçlar .....47
3.2.5.2. Antimikrobiyal Tozların Tartılması .....47
3.2.5.3. Stok Çözeltilerin Hazırlanması .....48
3.2.5.4. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılacak Besiyerinin Hazırlanması 49
3.2.5.5. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi .....49
3.2.5.6. İnokülumun Hazırlanması, İnokülasyon ve İnkübasyon .....51
3.2.5.7. MİK Değerlerinin Belirlenmesi: .....51
3.2.6. MBEK Değerlerinin Belirlenmesi .....52
3.2.6.1. İnokülumun Hazırlanması, İnokülasyon ve İnkübasyon .....52
3.2.6.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi İçin Antibiyotik Seri Sulandırım Yapılmış Plağın Hazırlanması .....53
3.2.6.3. Biyofilmle Antibiyotiklerin Seri Sulandırım Yapılmış Mikroplağın Karşılaştırılması: .....54
3.2.6.4. MBEK Değerlerinin Belirlenmesi .....54
3.2.7. İstatistiksel Analiz .....55
4. BULGULAR .....56
4.1. *P.aeruginosa* Suşlarının Fenotipik Özellikleri .....56
4.2. Mikroplağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi Sonuçları .....57

4.3. *P.aeruginosa* Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi Deney Sonuçları...60
4.4. MİK Sonuçlarının Belirlenmesi.....63
4.5. MBEK Sonuçlarının Belirlenmesi.....64
4.6. MİK ve MBEK Değerlerinin Karşılaştırılması.....65
5. TARTIŞMA.....71
6. KAYNAKLAR.....91
7. ETİK KURUL KARARI.....110
8. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....111
9. ÖZGEÇMİŞ.....112

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Dilüsyon mikroplak örneği. ..... 45
Tablo 3-2: Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar. ..... 48
Tablo 3-3: Antibiyotik sulandırım tablosu. ..... 49
Tablo 3-4: Çalışılan MİK aralıkları. ..... 50
Tablo 3-5: *P.aeruginosa* ATCC 27853 için kabul edilebilir Mik sınır değerleri (87). ..... 51
Tablo 3-6: *P.aeruginosa*' ya ait MİK değerleri (87). ..... 52
Tablo 3-7: Çalışılan MBEK aralıkları. ..... 53
Tablo 4-1: Satırlarda eşit biyofilm oluşumuna ait veriler. ..... 59
Tablo 4-2: MİK ve MBEK değerlerine göre dirençli suş sayıları ve yüzdeleri. ..... 66
Tablo 4-3: *P.aeruginosa* Suşlarına ait $MİK_{50}$, $MİK_{90}$, $MBEK_{50}$, $MBEK_{90}$ ve MİK-MBEK aralığı (µg/ml). ..... 66
Tablo 4-4: KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında tüm antibiyotiklere ait MİK ve MBEK değerleri ..... 67

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: KFTR proteininin yapısı ..... 5
Şekil 2-2: KF'de solunum yollarında üreyen mikroorganizmaların yaşa göre dağılımı .. 7
Şekil 2-3: *P.aeruginosa*'nın solunum yolu epitel hücrelerine adezyonu için gerekli virülans mekanizmaları ..... 14
Şekil 2-4: KF'de *P.aeruginosa*'ya göre seçilecek antibiyotik tedavisi ve dozları (138). 21
Şekil 2-5: Biyofilm oluşum basamakları ..... 27
Şekil 2-6: *P.aeruginosa* biyofilm oluşumu ..... 31
Şekil 3-1: TSA'ya ekim yapılmış *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu. ..... 39
Şekil 3-2: TSA'ya ekim yapılmış *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşu. ..... 40
Şekil 3-3: Biyofilm oluşturulan pegleri içeren kapaklı mikroplak ve alt kısımda yer alan düz tabanlı mikroplak. ..... 40
Şekil 3-4: Çalkalamalı etüvde inkübasyon aşaması. ..... 42
Şekil 3-5: TSA spot ekim plak örneği. ..... 43
Şekil 3-6: Çalkalamalı etüvde inkübasyon aşaması sonrası mikroplağın ve kapağın alttan görüntüsü. ..... 43
Şekil 3-7: Ultrasonik banyoda sonikasyon aşaması. ..... 45
Şekil 3-8: Steril U tabanlı mikroplaklar (128-0,25 µg/ml gentamisin mikroplak örneği) ..... 50
Şekil 3-9: Steril U tabanlı mikroplaklar (128-0,001 µg/ml levofloksasin mikroplak örneği). ..... 50
Şekil 4-1: *P.aeruginosa* suşlarının mukoid, non-mukoid koloni yapısına göre dağılımları. ..... 56
Şekil 4-2: MacConkey agara ekim yapılmış mukoid *P.aeruginosa* suşları. ..... 57
Şekil 4-3: MacConkey agara ekim yapılmış non-mukoid *P.aeruginosa* suşları. ..... 57
Şekil 4-4: Biyofilm canlı hücre sayısının belirlenmesi A) Negatif kontrol: Steril TSB besiyeri B) Biyofilm kontrol ..... 58
Şekil 4-5: Satırlara ait VCC sonuçları. ..... 59
Şekil 4-6: Kv ile boyanmış peglerin üstten görüntüsü (1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085) ..... 60

Şekil 4-7: Kv ile boyanmış peglerin üstten görüntüsü (1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085) ..... 61
Şekil 4-8: Kv ile boyanmış peglerin yandan görüntüsü (1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085) ..... 61
Şekil 4-9: Kv ile boyanmış peglerin yandan görüntüsü (1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085) ..... 62
Şekil 4-10: Mikroorganizmalarin biyofilm oluşturma dereceleri. ..... 62
Şekil 4-11: Kuyucuklarda üremenin gözlenmesi (0,25-128 µg/ml Tobramisin mikroplak örneği). ..... 63
Şekil 4-12: Kuyucuklarda üremenin gözlenmesi (0,001-128 µg/ml Levofloksasin mikroplak örneği). ..... 64
Şekil 4-13: MBEK mikroplağına ait örnek görüntü (TSB besiyeri) 1. Sütun sterilite kontrol, 12. sütun üreme kontrol, 2-11 sütunlar antibiyotik dilüsyonları. ..... 65
Şekil 4-14: MİK ve MBEK Değerlerinin Karşılaştırılması ..... 65

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | | |
|---|---|---|
| ABC | : | ATP-Binding Cassette |
| AHL | : | Açil Homoserin Lakton |
| ATCC | : | American Type Culture Collection |
| BİK | : | Biyofilm İnhibitör Konsantrasyonu |
| CDC | : | Center for Disease Control |
| CFU | : | Colony Forming Unit |
| CLSI | : | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| DNA | : | Deoksiribo Nükleik Asit |
| eDNA | : | Ekstrasellüler DNA |
| EPS | : | Ekzopolisakkarit |
| EUCAST | : | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| ExoS | : | Ekzotoksin S |
| ExoT | : | Ekzotoksin T |
| ExoU | : | Ekzotoksin U |
| ExoY | : | Ekzotoksin Y |
| GSBL | : | Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz |
| KA-MHB | : | Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth |
| KF | : | Kistik Fibrozis |
| KFTR | : | Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör |
| KOB | : | Koloni Oluşturan Birim |
| LPS | : | Lipopolisakkarit |
| MBEK | : | Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu |
| MBL | : | Metallo-Beta-Laktamaz |
| mg/L | : | Miligram/Litre |
| MİK | : | Minimum İnhibitör Konsantrasyonu |
| PBP | : | Penisilin Bağlayan Protein |
| PCR | : | Polymerase Chain Reaction |
| QS | : | Quorum Sensing |
| Rpm | : | Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı) |
| TSA | : | Triptik Soy Agar |
| TSB | : | Triptik Soy Broth |
| UKKS | : | Ulusal Kistik Fibrozis Hasta Kayıt Sistemi |
| VCC | : | Viable Cell Count (Canlı Hücre Sayısı) |
| µg/ml | : | Mikrogram/mililitre |
| µm | : | Mikrometre |

# ÖZET

Güngördü Dalar, Z. (2022). Kistik Fibrozisli Hastalardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Biyofilm Oluşumu ve Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ile İlişkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kistik Fibrozis (KF), sindirim sistemi, endokrin ve solunum sistemi gibi birçok sistem ile ilişkili yüksek mortaliteye sahip beyaz ırkta sık görülen otozomal resesif genetik bir hastalıktır. Tekrarlayan pulmoner hastalık, morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. KF hastalarında görülen P.aeruginosa'ya bağlı kronik solunum yolu enfeksiyonları, biyofilm oluşumu ile karakterize enfeksiyonlara en iyi örneklerden biridir. Akciğer enfeksiyonlarının önlenmesine veya tedavi edilmesine yönelik antimikrobiyal tedaviler hastaların yaşam sürelerinin artışında önemli rol oynamaktadır. Ancak, rutin in vitro antimikrobiyal duyarlılık testleri, sadece planktonik hücrelere ait duyarlılığı belirleyebilmekte, biyofilm varlığında ise yeterli olmamaktadır.

Çalışmamızda, KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen P.aeruginosa suşlarının biyofilm oluşumu, 96 kuyucuklu mikroplaklarda ve bu plağa uygun pegleri (çıkıntıları) içeren kapaklarla değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşturan suşların, güncel tedavide kullanılan beta-laktam, aminoglikozid, makrolid, kinolon ve polimiksin grubu antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ve biyofilm ortamında minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonları (MBEK) belirlenmiştir.

KF'li hastalardan izole edilen 110 P.aeruginosa suşunun 70'i (%64) mukoid koloni yapısında olup, non-mukoid suşlardan daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Suşların 92 tanesi (%21'i zayıf, %36'sı orta, %27'si güçlü) biyofilm oluşturmuştur. Siprofloksin, amikasin, tobramisin ve azitromisin biyofilm üzerine en etkili antibiyotikler olarak belirlenmiştir. Seftazidim, meropenem, aztreonam, levofloksasin ve kolistine karşı suşların, biyofilm ortamında tamamen dirençli hale geldiği görülmüştür. Biyofilm ortamında tüm antibiyotiklerde antimikrobiyal direncin belirgin olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0,0001$).

Sonuç olarak, izole edilen mikroorganizmanın biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi ve daha sonra bu dikkate alınarak antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması için MBEK değerlerinin belirlenmesinin tedavi başarısı açısından daha faydalı bir yaklaşım olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kistik Fibrozis, Pseudomonas aeruginosa, Biyofilm, Antimikrobiyal Duyarlılık, Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34669.

# ABSTRACT

Gungordu Dalar, Z. (2022). Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis and Its Relationship with Antibiotics Used in the Treatment. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Microbiolgy. Doctoral Thesis. Istanbul.

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease frequently seen in the white race with high mortality associated with many systems such as the digestive, endocrine and respiratory systems. Recurrent pulmonary disease is the most important cause of morbidity and mortality. Chronic respiratory tract infections due to P.aeruginosa seen in CF patients are one of the best examples of infections characterized by biofilm formation. Antimicrobial treatments for the prevention or treatment of lung infections play an important role in increasing the life expectancy of patients. However, routine in vitro antimicrobial susceptibility tests can only determine the susceptibility of planktonic cells and are not sufficient in the presence of biofilms.

In our study, biofilm formation of P.aeruginosa strains isolated from respiratory tract samples of patients with CF, were evaluated in 96-well microplates and containing peg lids suitable for this plate. The minimum inhibitory concentrations (MIC) in planktonic cells and the minimum biofilm eradication concentrations (MBEC) on the biofilm formation were determined against the beta-lactam, aminoglycoside, macrolide, quinolone and polymyxin group antibiotics used in the current treatment of biofilm-forming strains.

From the 110 P.aeruginosa strains isolated from patients with CF, 70 (64%) of them have the mucoid colony structure, with a higher rate than non-mucoid strains. 92 of the strains (21% weak, 36% medium, 27% strong) formed a biofilm. Ciprofloxin, amikacin, tobramycin and azithromycin were determined as the most effective antibiotics on biofilms. It was observed that the strains became completely resistant on the biofilm formation against ceftazidime, meropenem, aztreonam, levofloxacin and colistin. It was determined that antimicrobial resistance increased significantly in all antibiotics in biofilms ($p<0.0001$).

As a result, we believe that determining the biofilm formation feature of the isolated microorganism and then determining the MBEC for the antimicrobial susceptibility of the isolated microorganism will be a more beneficial approach in terms of treatment success.

Key Words: Cystic Fibrosis, Pseudomonas aeruginosa, Biofilm, Antimicrobial Susceptibility, Minimum Inhibition Concentration, Minimum Biofilm Eradication Concentration.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 34669.

## ZUSAMMENFASSUNG

Gungordu Dalar, Z. (2022) Biofilmbildung auf Pseudomonas aeruginosa, die von Patientinnen und Patienten mit Mukoviszidose (zystiche Fibrose) isoliert worden und deren Zusammenhang mit therapeutischen Antibiotika. Istanbul Universität-Cerrahpasa Promotionsinstitut, Medizinische Mikrobiologie, Dissertation, Istanbul.

Zystische Fibrose (ZF) ist eine autosomal resessive Stoffwechselerkrankung, die häufiger in der hellhäutigen Bevölkerung vorkommt und hat einer hohen Mortalität. Die rezidivierende Atemwegserkrankung ist die wichtigste Ursache der Morbidität und Mortalität. Die chronischen Atemwegsinfektionen im Rahmen von P.aeruginosa bei ZF ist ein klassisches Beispiel für Infektionen, die mit Biofilmbildung assoziiert sind. Die prophylaktische und therapeutische antimikrobielle Maßnahmen spielen eine große Rolle bei der Lebensverlängerung der Patienten/-innen. Die üblichen in vitro Antibiogramm-Sensibilitätstestungen zeigen jedoch nur die Sensibilität der planktonischen Zellen und die sind im Fall einer Biofilmentstehung nicht genug aussagekräftig.

Unsere Studie untersucht die Biofilmentstehung auf der P.aeruginosa mit 96-Loch Mikrotiterplatte und dazu passenden Deckel. Pseudomonas aeruginosa-Proben wurden von Menschen mit ZF mittels Atemwegsabstriche gewonnen und isoliert. Die aktuell therapeutisch relevante Antibiotika wie; ß-Lactamasen, Aminoglykoside, Makrolide, Chinolone und Polymyxine wurden auf den Agarplatten mit Biofilmbildung mittels Mikroverdünnung mit der Fragestellung Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) untersucht und die minimale Biofilm eradizierende Konzentrationen (MBEK) wurden bestimmt.

70 (64%) von 110 P.aeruginosa zeigten mukoide Kolonisierung, damit mehr als non-mukoid kolonisierten. 92 der Stämmen zeigten eine Biofilmbildung, darunter 21% schwach, 36% mittel, 27% stark. Ciprofloxacin, Amikacin, Tobramycin und Azithromycin waren die effektivsten Antibiotika gegen Biofilmbildung. Gegen Ceftazidim, Meropenem, Aztreonam, Levofloxacin und Colistin konnte man eine Resistenzbildung auf Biofilm-Agarplatten feststellen. Bei Biofilmenstehung war antimikrobielle Ressistenzbildung gegen alle Antibiotika signifikant erhöht ($p<0,0001$).

Als Schlussfolgerung können wir die Bestimmung der Biofilmbildung auf isolierten Mikroorganismen empfehlen und in Betracht der Biofilmbildung eine antimikrobielle Resistenzbestimmung incl. MBEK kann die Therapieerfolgsraten steigern.

Schlüsselwörter: Zystische Fibrose, Pseudomonas aeruginosa, Biofilm, Antimikrobielle Sensitivität, Minimale-Hemm-Konzentration, Minimale-Biofilm-Eradizierende-Konzentration

Diese Studie wurde durch das Zentrum der Forschung, Istanbul-Universität unterstützt. Projekt-Nr: 34669.

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kistik fibrozis (KF), otozomal resesif kalıtımsal özellik gösteren ve beyaz ırkta daha sık görülen bir hastalıktır. Hastalık, epitel hücrelerinin yüzeye bakan uç kısımlarında sodyum klor kanalı işlevi gören 'Kistik Fibrozis Transmembran Regülator (KFTR)' proteinin sentezini sağlayan 7. kromozomun q22-31 kısmında bulunan genin mutasyona uğraması sonucu oluşmaktadır. F508del, en yaygın saptanan mutasyon olup, sonucunda hücre zarlarından klor ve sodyumun ve bu sebeple suyun geçişinin bozulmasına neden olmaktadır. Mukus salgılayan bezlerde, sekresyonların yoğunluğunun artması ile birlikle tıkanma ve bez fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Başta solunum sistemi ve gastrointestinal sistem olmakla birlikte hepatobiliyer sistem ve genitoüriner sistem hastalıktan etkilenmektedir (1, 2).

KF hastalarında, birçok sistem etkilenmesine karşın, hastalarının %98'inden fazlasında solunum yolu hastalığı görülmekte ve ölümlerin %90'ından fazlası akciğer yetmezliğiyle ilişkilidir. Akciğerdeki koyu ve yapışkan yapıdaki mukusun atılmasındaki yetersizlik nedeniyle tekrarlayan akciğer enfeksiyonları meydana gelir ve enfeksiyonlara bağlı nötrofilik inflamasyon da akciğer hasarının artmasına katkıda bulunmaktadır. Solunum yollarına bağlı enfeksiyonlarında çoğunlukla; *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Burkholderia cepacia complex* sorumlu mikroorganizmalardır (3). Ülkemiz, Ulusal Kistik Fibrozis Kayıt Sistemi 2020 yılı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa (İÜ-C) verilerine bakıldığında da kronik *P.aeruginosa* kolonizasyonu olan hasta sayısı %19,07 olarak belirlenmiştir (4).

KF akciğerinde, *P.aeruginosa* gibi bakterilerin biyofilm veya polimikrobiyal toplulukta bulunduğu bilinmektedir (5). Kronik olarak kolonize olmuş *P.aeruginosa* varlığı akciğerlerin fonksiyonu ve klinik seyri kötüleştirdiği düşünüldüğünde, biyofilm yapısının tespit edilmesi de tedavisi kadar önemlidir. Mikrobiyal biyofilmler ile ilişkili kronik enfeksiyonların artarak görülmesi, biyofilm direncini anlamaya yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların planktonik hücrelere kıyasla antimikrobiyallere ve dezenfektanlara 100-1000 kat daha dirençli olması ve uygulanan tedavi sonrasında relaps oranlarının yüksek olması, yol açtığı biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların önemini daha da arttırmaktadır (6).

Biyofilm oluşturan bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonlarda, biyofilm içerisindeki bakteriyi öldürebilecek antimikrobiyal tedavinin planlanması bakterinin eradika edilebilmesi için önemlidir. Günümüzde KF hastalarında tedavi başarısızlıklarının sebeplerinden biri, rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin, sadece planktonik hücreye ait duyarlılık konsantrasyonlarını belirleyebilmesidir. Rutin antimikrobiyal duyarlılık testi sonucuna göre bakterinin duyarlı olarak belirlendiği antibiyotik ile tedavi sonrası rekürrens gelişebilmektedir.

Çalışmamızda, KF'li hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* suşlarının güncel tedavide kullanılan beta-laktam, aminoglikozid, makrolid, kinolon ve polimiksin grubu antibiyotiklerin önce planktonik hücrelerde antimikrobiyal duyarlılıkları araştırılarak, minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, ardından *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulduktan sonra biyofilm içerisindeki bakterilerde (sesil) antibiyotiklere karşı minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEK) belirlenmesi amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Kistik Fibrozis

### 2.1.1. Tanım

KF hastalığı otozomal resesif olup, insidansı popülasyonlar arasında farklılık gösteren ve beyaz ırkta daha sıklıkla görülen genetik bir hastalıktır. KFTR genindeki mutasyon sonucu klor kanalı bozularak klor miktarı yükselmekte ve sekresyonlar dehidrate olarak; Ter bezleri, pankreas, safra yolları, sindirim, solunum ve üreme sistemi gibi birçok organın fonksiyonu etkilenmektedir (1,7).

Daha önceleri, ‘‘ilk yıllar içerisinde ölümcül seyreden çocuk hastalığı’’ şeklinde tanımlanan KF, zamanla hastalıkla ilgili bilgilerin artması ve tedavide uygulanan yeni yöntemler sayesinde hastaların yaşam sürelerinde uzamaya neden olarak, KF’i yalnızca çocuk hastalıklarından çıkarıp, yetişkinlerde de görülen bir hastalık haline getirmiştir (8).

### 2.1.2. Tarihçe

17. yüzyılda söylendiği bilinen Alman deyişindeki ‘‘alnından öpüldüğünde tuz tadı alınan çocuklar ne acıdır ki büyülenip yakında ölecektir’’ ifadesinin, KF ile ilgili ilk bilgi olduğu düşünülmektedir. Hastalığın ilk tanımlanması, 1938’de Dorothy Hansine Andersen ile olmuştur. Andersen, pankreasta genişlemiş safra kanalları ve fibrozis varlığını, ‘pankreasın kistik fibrozisi’ olarak isimlendirdiği KF’nin ilk defa sendromik doğasını tanımlayan kişidir. 1945’te Sidney Farber hastalığın solunum ve sindirim sitemindeki koyu mukus salgısı ile ilişkili olduğunu bildirmiş, mukovisidoz olarak isimlendirmiştir (9). Andersen ve Hodges, 1946’da pankreatik fibrozisli bebeklerin kardeşleri ve tüm akrabalarını incelemiş ve KF’nin genetik bir hastalık olabileceğini düşünmüşlerdir (10). 1953’te Di Sant’Agnese ve ark., pankreasın kistik fibrozisi bulunan 43 hastanın terinde klor, sodyum ve potasyumun sağlıklı insanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu belirlemişlerdir. 1959’da Gibson ve Cooke, KF tanısı için pilokarpin iyontoforez yöntemiyle hastaların terinde elektrolit düzeyini ölçmüşlerdir (11). Shwachman ve ark. 1965 yılında, erişkin yaşa gelmiş ve evlenmiş 7 KF hastasının çocuklarının olmadığını gözlemlemişlerdir (9). Schwachman ve Mahmoodian 1967’de hastalığın tanısına yönelik çalışmalar yürütmüşlerdir (12). 1980’li yıllarda, Knowles ve ark. solunum yolu epitelindeki iyon transport farklılıklarını belirlemişlerdir (13). Norris ve ark., otopsi örneklerinin histolojik verilerine dayanarak, pankreatik kanalların düzgün

çalışamamasının epitel bezlerin bozulmuş sekresyonlarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (9, 14). 1985'te Tsui ve ark., KF ilgili genin 7. kromozomda olduğunu gözlemlemişlerdir (15). 1989'da ise Kerem ve ark. klinik olarak KF tanısı almış çocukların aileleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, KF'ye neden olan mutasyonun bulunduğu geni tespit etmiş ve 'Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator' olarak isimlendirmişlerdir (16). KF geni, 7. kromozomun q22-31 bölgesinde bulunmakta ve en yaygın saptanan mutasyon fenilalanin amino asidini kodlayan 508. kodonun (F508 del) delesyonudur. Bu zamana kadar, 1604 mutasyon saptanmış ve gruplandırma; KFTR proteininin sentezlenip sentezlenmemesi ve klor kanalının aktivitesine göre yapılmıştır (2). 1999'da Freedman ve ark., asiner dokudaki disfonksiyonun fosfolipitlerdeki serbest yağ asitlerinin kullanılmasında bozukluk nedeniyle olabileceğini ileri sürmüşlerdir (17).

### 2.1.3. Epidemiyoloji

KF hastalığının görülme sıklığı etnik gruplara göre değişiklik göstermekle birlikte en sık görüldüğü popülasyonlar; Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'daki beyaz ırktır. Irklara ve ülkelere göre hastalığın sıklığı değişmektedir. En sık görüldüğü topluluktan biri olan Kuzey Avrupa'daki sıklığı 1/25 olup, canlı doğan 3000-3,500 de bir bebekte saptanmaktadır (19). Asyada, Latin Amerikalı'larda ve Afrikalı Amerikalı'larda daha az sıklıkta olduğu bildirilmektedir. Hastalığın insidansı Fransa'da 1/4600, İtalya'da 1/4238, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki beyaz ırkta 1/3200 ve İngiltere'de 1/2415 olarak bulunmuştur (19-22). Türkiye'de yapılmış geniş çaplı çalışmalar olmamakla birlikte, ter testiyle tanı konulan hastalık prevalansının yaklaşık 1/3000 olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde, ilk kez 2015 yılında uygulanmaya başlanan 'yenidoğan taraması' ile KF'nin erken tanısı hedeflenmiştir (23).

Ülkemizde 'Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları ve Kistik Fibrozis Derneği' tarafından, 'Ulusal Kistik Fibrozis Hasta Kayıt Sistemi' (UKKS) uygulaması kurulmuştur. 2020 yılı içerisinde 1709 KF hastasının klinik ve demografik verileri sisteme girilmiştir. Bu amaçla ülkedeki hastalara ait verilerin karşılaştırılma imkanı doğmuştur. Ülkemizde gerçek KF hasta sayısının belirlenebilmesi için daha çok merkezin sisteme katılması gerekmektedir (4).

### 2.1.4. Prognoz

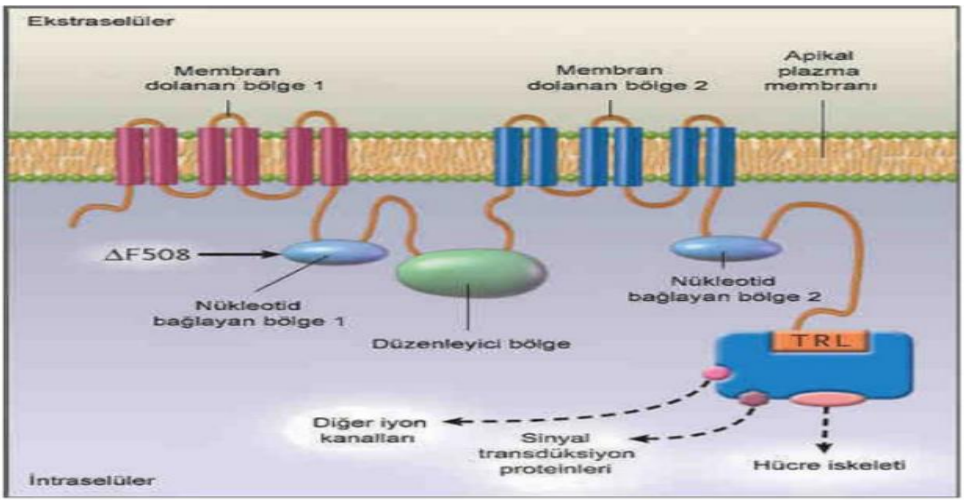
1980'lere kadar KF hastası çocuklar adolesan dönemine kadar nadiren yaşarken, ABD'de 'The Cystic Fibrosis Foundation' kurumunun 2018 yılı kayıtlarına göre,

ortalama yaşama süresi 40'a kadar yükselmiş, hatta bir kısım hastalar ender olarak 40-50 yaşına kadar yaşamaktadır (24). Ülkemizde 'Ulusal Kistik Fibrozis Hasta Kayıt Sistemi' 2020 verilerine göre katılan merkezler arasında takipli en yaşlı hasta 46 yaşındadır (4).

Mukus atımını kolaylaştırmak için yapılan günlük göğüs fizyoterapisi, doğru beslenme ve enfeksiyonu engellemek için antimikrobiyal maddelerle erken müdahaleye dayanan yönetim stratejileri ile yaşam süresi yükseltilmiştir. KF hastalarında temel tedavi, gerekli besin ve vitamin takviyesi ile pankreatik yetmezliğin, yoğun akciğer sekresyonlarının temizlenmesi ve enfeksiyonların giderilmesidir (8). Antibiyotikler, anti-inflamatuarlar, mukolitikler ve pankreatik replasman sadece hastalığın belirtilerini tedavi etmekte, iyon kanalı defektini onaramamaktadır. Son yıllarda, moleküler ve hücre biyolojisindeki temel gelişmeler iyon kanal defektinin altında yatan sebepleri tanımlamaya ve hedef terapi araştırmaları geliştirilmesine yardımcı olmuştur (25).

### 2.1.5. Patogenez

KFTR olarak bilinen, kromozom 7'nin uzun kolunda yer alan KF geni, 27 ekzondan oluşan ve 1480 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan büyük bir gendir (2, 16). KFTR proteini, tipik olarak epitel hücrelerinin üst yüzeyinde yer almakta ve zarın elektrokimyasal gradiyenti ile anyonların her iki yönde de pasif olarak hareket etmesini sağlayan bir kanal oluşturmaktadır. KFTR proteini beş domain içermektedir; İki transmembran, iki nükleotid bağlama ve bir düzenleyici R alanı (10, 26). (Şekil 2-1).



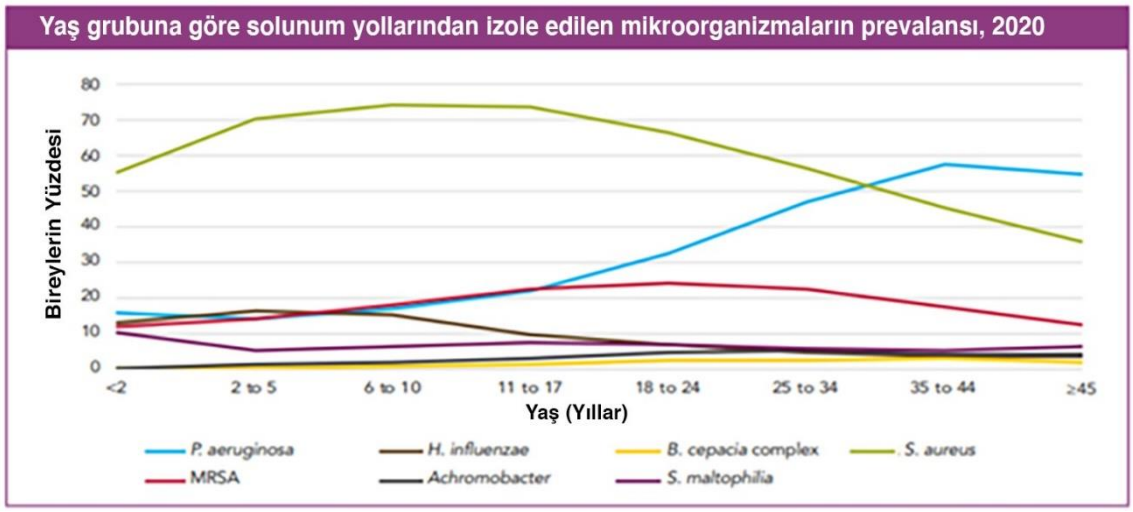

**Şekil 2-1: KFTR proteininin yapısı (27).**

KFTR'nin en sık işlevi, plazma zarı siklik adenozin monofosfatla düzenlenen klor kanalı görevi görmesidir. 508 pozisyonunda KFTR proteininde fenilalanin yokluğuna yol açan üç baz çifti delesyonu en yaygın mutasyondur. F508del mutasyonu, hücre içi düzenleme ile proteinin bozulmasına ve endoplazmik retikulumda polipeptit KFTR'nin anormal katlanmasına neden olmaktadır. KF'nin hücresel düzeyde patogenezinin önemli özelliklerinden biri, hedef organlardaki epitel hücrelerinin tutulumu ve bu hücrelerde anormal transepitelyal iyon taşınmasına yol açmasıdır (2, 28).

KFTR proteinindeki bozukluk, ter bezleri, pankreas, karaciğer, akciğer, epididim ve bağırsakların epitelyum hücre plazma zarında iyon transportunu da etkilemektedir. Koyu ve yapışkan sekresyonların pankreastaki duktusları tıkaması sonucu sindirim enzimlerinde meydana gelen yetersizlik dokuda hasara yol açarak fibrosiz gelişmektedir. Safranın akışkanlığının ve alkalinizasyonun bozulması karaciğerin etkilenmesine sebep olmaktadır. Sonuçta bağırsaklar da etkilenerek malabsorpsiyona ait klinik bulgular gözlemlenmektedir. İdrarda NaCl atılımı azalarak, konsantrasyonununda bozukluk meydana gelmektedir. Ayrıca klor sekresyonundaki bozulmalar, yenidoğanlarda obstrüktif bağırsak hastalığı ve mekonyum ileusuna yol açmaktadır (8, 29).

### 2.2. KF'te Solunum Yolu Enfeksiyonları

Solunum yolu enfeksiyonları, KF hastalarında morbidite ve mortalitenin en sık nedenidir. Enfeksiyonlar çoğunlukla polimikrobiyal olmakta ve antimikrobiyal tedavi ile eradikasyon çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Kistik Fibrozis Kurumu, merkezlere ait solunum yollarından izole edilen mikroorganizmaları hazırladıkları raporlarında yayınlamaktadır (Şekil 2-2). *S.aureus* ve *H.influenzae* yaşamın erken döneminde KF'li bebeklerde ve küçük yaş grubundaki çocuklarda sıklıkla saptanırken, yaşın ilerlemesi ile artan kültürlerde üreyen *P.aeruginosa* sıklığı 20'li yaşlardan sonra hastaların yaklaşık %60'ında görülmektedir. *B.cepacia complex* yaşamın erken dönemlerinde daha az, *S.maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* ve non-tüberküloz bakteriler ise artan sıklıkla bildirilmektedir (30, 31). Diğer etkenler ise; Respiratuvar sinsityal virus, influenza virus ve *Aspergillus fumigatus* olarak yer almaktadır (32).




**Şekil 2-2: KF'te solunum yollarında üreyen mikroorganizmaların yaşa göre dağılımı (33).**

Farklı türlerde bakteri, virus ve mantarlar akciğerlerde ortaya çıkan seçici baskı ortamında evrimleşerek, birbirlerine karşı sinerjistik ve/veya antagonistik özellikte olarak birtakım değişiklikler ve avantajlar kazanabilmektedirler. KF'te koenfeksiyon aynı tür mikroorganizmanın farklı genotip ve fenotipteki suşları ile de gerçekleşebilmektedir. Kronik enfeksiyon ortamında gelişen evrimleşme esnasında bakterinin doğal olarak genetik değişikliklere uğraması, antimikrobiyal maddelere ve konağın savunma mekanizmalarına karşı direnç geliştirmesine zemin hazırlayarak enfeksiyonun kalıcılığına yol açmaktadır. Mikroorganizmalarla kronik enfeksiyon ve aralıklarla akut alevlenmeler pulmoner fonksiyonlarda giderek azalmaya neden olmaktadır. Antibiyotikler ise, hem akut alevlenmelerin hemde kronik enfeksiyonun tedavisinde oldukça önemli bir araçtır (34).

Balgam örnekleri, hastalarının alt solunum yollarındaki mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonu için tercih edilen örnek türüdür (35, 36). Boğaz sürüntüleri, orofaringeal kültürler ve bronko-alveolar lavaj sıvıları dahil olmak üzere diğer örnekler, kolayca balgam çıkaramayan pediatrik hastalar için tercih edilmektedir (37, 38).

### 2.3. KF Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Patogenez

Anormal cAMP bağımlı Cl transportu KF hastalarında en sık görülen defekttir. Solunum yolları iyon transportunda ikinci majör defekt transepitelyal Na transportunda görülmektedir. KF solunum yollarının karakterizasyonu olarak azalan Cl ve artan Na absorpsiyon birlikteliği solunum yollarındaki sıvıda azalmaya neden olarak siliyaların mukusu temizlemesinde yetmezliğe yol açmaktadır. Suyun azalması sebebiyle

yoğunlaşan mukus yapışkan hale gelmekte ve öksürük mekanizmasına rağmen mukus temizlenememektedir. Sonuç olarak solunum yollarının nötrofillerden zengin, mukopürülan ve viskoz salgılarla dolması ve tıkanması KF'nin en tipik patolojik bulgusudur. Kalınlaşmış mukus kitleleri ayrıca *P.aeruginosa*'ya biyofilm oluşumu için uygun ortam sağlayarak kronik enfeksiyona eğilim oluşturmaktadır. Bu durum lizozim, laktoferrin aktivitesini ve nötrofil aracılı bakteriyel öldürme mekanizmalarının da etkisini azaltmaktadır (2, 39). Solunum yolundaki mukusta kronik bakteriyel enfeksiyonu engellemede yetersiz kalan güçlü konak yanıtı, ayrıca solunum yolu hasarına da katkıda bulunmaktadır. İnflamatuvar süreç, solunum yollarına polimorfonükleer hücre akımı, kemotaktik uyarıcılar ve proteolik enzimler ile tamamlanmaktadır. Bu kronik antijenik sitümülasyon, immünolojik olarak solunum yolu harabiyeti oluşturmaktadır. Büyük miktarda nötrofil kaynaklı Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) solunum yolu sekresyonlarını kalınlaştırarak temizlenmesini güçleştirmektedir. Sonuç olarak, hem biriken sekresyon hem de solunum yolları hasarı solunum yetmezliği ve ölüme neden olmaktadır (26).

## 2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.4.1. Tarihçe

Sedillot tarafından ilk kez 1850'de cerrahi yaralarda mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak saptanmış sonrasında 1882 yılında *Bacillus pyocyaneus* olarak, 1990 yılında ise Migula, Yunanca'da 'pseudos' yalancı ve 'monas' birim anlamına gelen kelimeleri birleştirerek Pseudomonas olarak isimlendirmiştir. Patojen bir bakteri olduğu; 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler belirlemişlerdir. Dooren de Jong, 1926 yılında Pseudomonas türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına bağlı fenotipik özelliklerine göre gruplandırmışlardır. Pseudomonas türlerininin fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması 1966'da Buchanon, Holt ve Lessel tarafından yapılmıştır. Daha sonra başlayan DNA hibridizasyon çalışmaları ile 1973 yılında Palleroni ve ark., nükleik asit hibridizasyon çalışmalarını arttırarak Pseudomonas'ları rRNA homolojilerine göre gruplandırmışlardır. Ribozomal RNA homolojisine dayanarak, Pseudomonas türleri beş gruba ayrılmaktadır ve bu sınıflandırmaya göre *P.aeruginosa* rRNA grup I'de yer almaktadır (40).

### 2.4.2. Genel Özellikleri

*P.aeruginosa* 0,5-0,8 μm eninde ve 1,5-3,0 μm boyunda düz veya hafif kıvrık non-fermentatif, spor oluşturmayan Gram negatif basiller olup, Pseudomonadaceae ailesi içinde yer almaktadır (41, 42). *P.aeruginosa* polar monotrik flagellum ile hareketlidir ve birden fazla tip IV pili içermektedir. *P.aeruginosa*, 'yüzme (swimming)', 'kayma (swarming)' ve 'titreme (twitching)' hareketleriyle hareket edebilmektedir (43).

*P.aeruginosa* en iyi 37°C'de üremesine rağmen 42°C'de üreme yeteneğine sahiptir. Oksijenin son elektron alıcısı olduğu zorunlu aerobik solunuma dayalı bir metabolizmaları vardır. İdeal olarak aerobik koşullarda ürese de, son elektron alıcısı olarak nitrat varsa anaerobik koşullarda da üreyebilmektedir. *P.aeruginosa*'nın birçok karbon kaynağı kullanabilmesi, basit besiyerlerinde üreyebilmesini sağlamaktadır. *P.aeruginosa* için seçici besiyeri olan setrimid agar, içerdiği deterjandan dolayı diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen seçici bir besiyeridir (42-45). Sitokrom oksidaz aktivitesi, *P.aeruginosa*'yı Enterobacterales ailesi üyelerinden ayırt edilmesini sağlamaktadır. Bu aktiviteden dolayı karbonhidratları fermente etmezler (46).

Piyoverdin; Suda çözünen, kloroformda çözünmeyen sarımsı renkte bir floresan pigmentidir. King B besiyerinde suşların bir çoğu bu pigmenti oluşturabilmektedir. Görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulmaktadır. Piyosiyanin; Fenazin yapısındadır, genellikle mavi-yeşil renklidir. King A besiyeri kullanılarak üretimi arttırılabilmektedir. Yalnızca aerobik ortamda oluşur ve tanı değeri yüksektir. Piyoverdin pigmentinin piyosiyaninle birleştiğinde oluşturduğu parlak yeşil renk *P.aeruginosa* suşları için karakteristiktir. Piyorubin; Kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen, parlak kırmızı renkte bazı suşlar tarafından üretilen bir fenazin pigmentidir. Piyomelanin ise, kahverengi-siyah renkte çok sık gözlenmeyen bir pigmenttir. Pigmentler demir alımı için siderefor görevine sahip oldukları için, demirin sınırlı olduğu durumlarda üretimleri artmaktadır (47).

### 2.4.3. Epidemiyoloji ve Bulaş

Toprakta ve suda sıklıkla bulunabilen, doğada çevre koşullarına iyi uyum sağlayabilen *P.aeruginosa* yeterli nem ve besin kaynakları olduğunda uzun süre canlı kalabilen bir mikroorganizmadır. Bitki, hayvan ve insanlarda patojen olabilmektedir. Sağlıklı insanlarda, deri, burun mukozası, boğaz ve dışkıda kolonize olabilirken, bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyona sebep

olmaktadır. Hastane ortamında sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu olup, solunum cihazları, yataklar, banyolar, gazlı bezler ve yüzeylerden hatta antiseptik solüsyonlardan bile kolaylıkla izole edilebilmektedirler. Mekanik ventilasyonlu, kemoterapi alan ya da cerrahi girişimde bulunulan hastalarda ve yanık hastalarında enfeksiyon etkeni olabilmektedir (48**,** 49).

KF'li hastalarda enfeksiyon ekzojen kaynaklı meydana gelebilir ve bu hastaların ilk enfeksiyona neden olan suşları genellikle çevresel morfotiplerle benzerdir (3). Buna karşın bir hastadan diğer hastaya yayılımın olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca KF'li hastalarda kardeşlerin ortak kaynaktan kazanılan veya çapraz enfeksiyon sonucu aynı suşu taşıdıkları gösterilmiştir (50). KF kliniklerinde hastalar arasında çoklu ilaç dirençli klonların yayılımını bildiren çalışmalar ürkütücü olmakla birlikte, çapraz enfeksiyonların ve dirençli suşların takibi için sürveyans ve moleküler tiplendirme yapılarak izlenmesi önerilmektedir (10, 51, 52).

### 2.4.4. Virulans Faktörleri

*P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynamaktadır. Üremenin olduğu ve hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda virulans faktörlerinin salınımı artmaktadır. Salınım ve düzenlenme karmaşık bir sistem tarafından genetik düzeyde regüle edilir ve quorum sensing (QS) sisteminin koordinasyonun sağlanmasında önemli rolü vardır. Bakterinin virulans faktörleri hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenebilmektedir (53).

#### 2.4.4.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri

**Kirpik (Flagella):** *P.aeruginosa*'nın hücre yüzeyi yapılarından olan flagella bakterinin yüzme şeklindeki ve kayma hareketinden sorumludur. Bakterinin sıvı ortamda yer değiştirmesi flagellalarının dönerek hareket etmesi ile gerçekleşmektedir (54). Epitel hücresinin zar bileşeni yapısında bulunan asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlamaktadır. Flagella IL-8 sentezinin başlatılmasına, Toll-benzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile etkileşim sonucu nükleer faktör kappa B bağımlı inflamatuvar yanıtı uyararak kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile yol açmaktadır (55).

**Pili (Fimbriae):** *P.aeruginosa*'nın kısa, filamentöz yüzey yapılarıdır. Pili *P.aeruginosa*'da titreme şeklinde hareketten sorumludur. Flagella gibi pili de adezyon

aşamasında epitel hücre zarlarının asialo-GM1 bölgesine bağlanarak patogenezde önemli rol oynamaktadır. Solunum yolu epitel hücrelerinde hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olmaktadır (56, 57).

**Lipopolisakkarit (LPS):** Fosfolipit ikili katman içinde bulunan lipid A'ya bağlı kor ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşan LPS, bakteri hücre duvarı dış zarında yer almaktadır. O-özgül polisakkaritleri *P.aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında kullanılmaktadır. LPS'nin lipid A bileşeni asialo-GM1'e bağlanarak adezyonda etkin rol oynamaktadır. Birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive ederek TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanıma özellikleri ile KFTR'ye bağlanarak virülansta kritik etki göstermektedir (58).

**Aljinat:** Hücre dışına salgılanan bir ekzopolisakkarit (EPS) olsa da, hücre yüzeyi ile ilişkili olması nedeniyle bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında incelenmektedir. Özellikle *P.aeruginosa*'nın ilişkili olduğu solunum yolu enfeksiyonlarında aljinat üretimi önemli rol oynamaktadır. Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynayarak, solunum yolu epiteli üzerinde kolonize olan bakteriyi sabit hale getirmektedir. Aljinat mannuronik ve glukoronik asidin tekrarlayan polimerlerinden oluşan bir EPS'dir. Aljinat biyosentezinde görev alan genlerden algD, aljinat sentezi yolağındaki başlangıç basamağında görevli GDP-mannoz dehidrogenazı kodlamaktadır. AlgC geni ise fosfomannomutazı kodlayarak aljinat üretiminin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Aljinatın aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipte suşlar genellikle KF hastalarının solunum yollarından izole edilmektedir. Mukoid fenotipe dönüşümde, AlgT'nin anti-sigma faktörünü kodlayan mucA genindeki mutasyonların inaktive edilmesi önemli rol oynamaktadır. Yüksek ozmolarite ve ortamdaki nitrojen miktarının azalması, aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdendir. AlgS ve algT ise mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşümü sağlamaktadır (58-60). Aljinatın fazla üretimi bakteriyi fagositozdan ve antimikrobiyal maddelerden korumada görev aldığı gibi, konağın bakteriye karşı bağışıklık yanıtını da zayıflatmaktadır. KF hastalarının akciğerlerindeki biyofilm yapısında yer aldığı kabul görmüş olsa da, yapılan bazı araştırmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için zorunlu olmadığı gözlemlenmiştir (61).

### 2.4.4.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

**Elastaz:** *P.aeruginosa*'nın elastolitik aktivitesinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalamaktadır. Elastin

akciğerlerin genişleyip daralmasını sağlayan ve akciğerlerde bulunan proteinin %30'unu içeren bir yapıdır. LasA, LasB elastazın elastolitik aktivitesini arttıran bir serin metalloproteinaz, LasB ise 33 kDa ağırlığında bir çinko metalloproteinazdır ve LasA proteazın yıprattığı elastini parçalamaktadır. Elastaz hücre dışına tip 2 sekresyon sistemi ile salgılanarak, enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara zemin hazırlayarak patogenezde önemli rol oynamaktadır. Damar duvar yapısında elastinin bulunması, parçalanması sonucunda hemorajilere neden olmaktadır. Solunum yolu epitel hücrelerindeki bağlantıları parçalayarak geçirgenliği arttırır. Elastaz, IL-8 üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki göstermekte, IgG'yi, fibrini, kollajeni, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalayarak enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açmaktadır (58, 62).

**Proteazlar:** Konak bağışık yanıtını etkisiz hale getirirek ve doku hasarına sebep olarak *P.aeruginosa*'nın patogenezinde rol almaktadırlar (63). 49 kDa ağırlığındaki alkali proteaz enzimi yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir ve en iyi alkali pH değerlerinde aktivite göstermektedir. Alveoller içerisinde oluşan yoğun fibrinin, akciğer hasarında alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açabildildiği gösterilmiştir (63, 64). *P.aeruginosa*'nın invazyonunda rol alan diğer proteazlar da virulansa katkıda bulunmaktadır. Lökosidin nötrofillere ve çoğu ökaryot hücreye toksik etki göstermektedir. Lesitinaz, lesitini parçalayarak enfeksiyonun ilerlemesinde rol oynamaktadır (65).

**Piyosiyanin:** Saflaştırılmış piyosiyanin ile *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında, siliyer fonksiyonları bozduğu, hücre solunumunu inhibe etttiği, epidermis çoğalmasını durdurduğu, kalsiyum homeostazını bozduğu ve prostasiklin salınımına yol açtığı gözlemlenmiştir (66). Piyosiyanin, IL-8 salınımını uyararak, otooksidasyon sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açmakta ve sitotoksik etki oluşumuna sebep olmaktadır (67, 68).

**Piyoverdin:** Metabolizma için gerekli olan ortamdaki demiri bağlayan bir siderofor olarak *P.aeruginosa*'nın virülans mekanizmaları arasında yer almaktadır (69, 70).

**Fosfolipaz C:** Lipid ve lesitin bağlarını kırarak doku hasarına zemin hazırlayan ısıya duyarlı bir hemolizindir ve iki tipte görülmektedir. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfingomiyelini hidrolize etmekte, hemolitik olmayan fosfolipaz C ise

fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize etmektedir. Fosfolipaz C hücre dışına tip 2 sekresyon sistemi ile salgılanmaktadır. Ökaryotik hücre zarı bileşeni olan fosfolipitleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogenezinde rol oynamaktadır. Etkisinin bir bölümünü elastazda olduğu gibi sürfaktan inaktivasyonu ile göstermekte, ek olarak da konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılamaktadır (71).

**Ramnolipit:** Hemolitik etkisi bulunan bir hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipit sayesinde biyosürfaktan etki göstermekte ve akciğer sürfaktanı fosfolipitlerini deterjan benzeri etkisiyle çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin daha kolay etki etmesine zemin hazırlamaktadır. Ayrıca siliya fonksiyonlarını da inhibe etmektedir (58).

**Ekzotoksin A (ExoA):** Difteri toksinine benzer şekilde etki göstererek, ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi inhibe etmesi sonucu hücre ölümüne yol açmaktadır. Tip 2 sekresyon sistemi hücre dışına salgılanan bir toksindir (72). Konak yanıtını baskılayıcı özelliği ile birlikte invazyon ve doku hasarından sorumludur (73, 74).

**Tip III Sekresyon Sistemi:** Bakterinin pilus benzeri yapısıyla hedef hücre üzerinde por açarak, iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve efektör proteinlerini ökaryot hücre sitoplazmasına aktardığı bir sistemdir. Hedef ökaryot hücrelere Tip III sekresyon sistemi ile salgılanan proteinler ile epitel hücrelerinde hasar, doku invazyonu ve nekrozu oluşarak bakterinin yayılımı gerçekleşmektedir (75). Ekzotoksin S (ExoS), Ekzotoksin T (ExoT), Ekzotoksin Y (ExoY) ve Ekzotoksin U (ExoU) *P.aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinlerindendir (Şekil 2-3) (57).

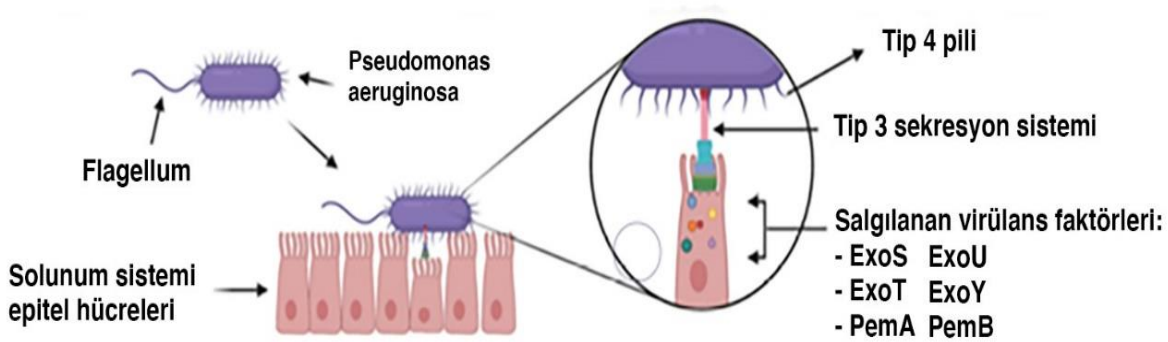
ExoS, C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz protein bölgesi bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ADP-riboziltransferaz aktivitesi esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozmaktadır. C-terminal bölgesinin TLR2'ye, N-terminal bölgesinin de TLR4'e bağlanmasının konak bağışık yanıtı etkilediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği gözlemlenmiştir. Akciğer enfeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açarak bakterinin yayılmasında rol oynamaktadır (76).

ExoT, internalizasyonunda yer alan bir enzimdir. Hücre iskeletini düzenleyen proteinlerin inaktive edilmesi sonucu, hücrenin adezyon ve fagositoz aktivitesi etkilemektedir. Ayrıca yara iyileşmesini inhibe edici özelliği gösterilmiştir (77).

ExoY bir adenilat siklazdır. Konağın sitozolüne verildiğinde sitozolik cAMP'yi tetikleyerek pulmoner vasküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumuna ve bu sebeple geçirgenliğin artmasına yol açmaktadır (78).

ExoU tip 3 sekresyon sistemi ile konak hücresi içine salgılandığında fosfolipaz/lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre zarını parçalamaktadır. Yapılan hayvan deneyleri çalışmasında, tek başına ExoU salgılanmasının akciğer hasarına yol açtığı ve sepsise neden olduğu gösterilmiştir (79).

*P.aeruginosa*'nın QS sistemleri, hücre dışına salgılanan birçok virulans faktörünün kontrolünü sağlamaktadır (80). Bu sistemler ile, elastaz, alkali proteaz, ExoA, piyosiyanin, lektin, ramnolipit, hidrojen siyanid, sigma etmen ve süperoksid dismutaz başta olmak üzere pek çok virulans faktörünün üretimi ve biyofilm oluşumu kontrol edilmektedir (81).




**Şekil 2-3: *P.aeruginosa*'nın solunum yolu epitel hücrelerine adezyonu için gerekli virülans mekanizmaları (82).**

### 2.4.5. Laboratuvar Tanısı

*P.aeruginosa*, mikroskop altında Gram negatif basil şeklinde görüntüsü, koloni tipi, pigment oluşumu, $42^0$C'de üreyebilmesi, oksidaz pozitifliği, üç şekerli demirli besiyerinde fermentasyon yapmaması ve 2-aminoasetofenon varlığının neden olduğu üzüm benzeri kokusu gibi özellikleri ile ayırt edilebilmektedir (83). Sıklıkla rutin kullanılan besiyerlerinde ürediği için izolasyonları kolaydır. %5 koyun kanlı agar besiyerinde yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondülan yapıda, 1-5 mm çapında

beta hemolitik koloniler oluşturmaktadır. Pigment üretimi UV ışık altında, King A ve King B gibi özel besiyerleri kullanarak gösterilebilmektedir (41).

Doğal ortamdan, topraktan ve sudan izole edilen *P.aeruginosa* kolonileri küçük, kaba (R tipi) koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilen suşların bazıları büyük, düz ve kalkık kenarlı non-mukoid koloniler oluştururken, alginat üreten suşlar mukoid tipte koloniler oluşturmaktadır (84).

Jelatin hidrolizi, arjinin dihidrolaz, üreaz ve sitrat testleri pozitif, lizin dekarboksilaz, indol, $H_2S$, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir. Oksidasyon-fermentasyon besiyerinde glukozu oksitlemektedirler (85). Pseudomonas türlerinin tanısı için manuel ve otomatize ticari sistemler kullanılmaktadır.

### 2.4.6. Antibiyotik Tedavisi

*P.aeruginosa*, ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim, seftriakson, trimetoprime doğal dirençlidir (86). European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) Pseudomonas türleri için; Piperasilin, piperasilin-tazobaktam, tikarsilin, tikarsilin-klavulanik asit, sefepim, sefiderokol, seftazidim, seftazidim-avibaktam, seftolozan-tazobaktam, doripenem, imipenem, imipenem-relebaktam, meropenem, meropenem-vaborbaktam, aztreonam, siprofloksasin, levofloksasin, amikasin ve tobramisin için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerini standardize etmiş; Kolistin için sadece sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK belirlenmesini önermiştir (87).

### 2.4.7. Antimikrobiyal Direnç

#### 2.4.7.1. İntrensek Direnç

İntrensek direnç, mikroorganizmada doğal olarak bulunan dirençtir. Kromozomlar tarafından kontrol edilen bir özelliktir ve mikroorganizmanın genel fizyolojisi ile ilgilidir. *P.aeruginosa*'nın içsel direnci, düşük dış zar geçirgenliğini, antibiyotikleri hücreden dışarı atan dışa atım pompalarının ekspresyonunu ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimini içermektedir.

**Geçirgenliğin Azalması:** Bakteri hücresine penetrasyon antibiyotiklerin etkili olabilmesi için gerekmektedir. β-laktam antibiyotiklerin sitoplazmik zarın dış yüzeyine, aminoglikozidlerin ise hücrenin içerisine ulaşması gerekmektedir. Dış zarda yer alan porinler Gram negatif bakterilerde antibiyotiklerin hücre içine girmesini sağlamaktadır.

*P.aeruginosa*'da, OprF proteini başlıca spesifik olmayan porindir, OprB, OprD, OprE, OprO ve OprP spesifik porinlerdir, OprC ve OprH geçişli porinlerdir, akış porinleri sınıfı OprM, OprN ve OprJ'yi içermektedir (88). Mutasyonlar ile dış zar porinlerindeki değişim sonucu geçirgenlik azalır ve antibiyotiklere dirençli suşlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin, *P.aeruginosa*'da OprD porindeki değişim sonucu karbapenem direnci görülmektedir. Dış zar geçirgenliğinin azalması, kinolon ve aminoglikozid direncinde önemli rol oynamaktadır (89).

**Dışa Atım Sistemi:** Yapısal olup düzenleyici genlerin kontrolü altındadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, aktif dışa atım pompalama sistemlerinin aşırı çalışarak antimikrobiyallerin dışarı atılmasına neden olmaktadır. *P.aeruginosa*'da aktif dışa atım sistemleri; MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM olarak saptanmıştır. Bu şekilde kazanılan direnç, çoklu direnç genine sahip fenotipler oluşturabilmektedir. İmipenem hariç tüm β-laktamlara ve kinolonlara direnç oluşturması nedeniyle MexAB-OprM aktif dışa atım pompalama sistemi önemlidir. MexCD-OprJ 4. kuşak sefalosporinlere, MexEF-OprN aktif dışa atım pompalama sistemi ise karbapenemlerde dirence neden olabilmektedir (90, 91).

**Antibiyotik İnaktive Edici Enzimler:** Antibiyotiği parçalayan ya da modifiye edici enzimler oluşturarak, antimikrobiyal maddenin inaktivasyonu meydana gelmektedir. *P.aeruginosa*'daki AmpC geni hidrolitik enzim β-laktamaz'ı kodlayarak, β-laktam halkasının amit bağını kırarak β-laktam antibiyotiklerin inaktivasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca β-laktamazlar amino asit dizilerine göre A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfa ayrılabilmektedir. A, C ve D enzim sınıfları, β-laktamları aktif bölge serin yoluyla hidrolize etmektedir. Buna karşılık, B sınıfı β-laktamazlar ise β-laktam hidrolizi için iki değerli çinko iyonları gerektiren metalloenzimlerdir (92). *P.aeruginosa* tarafından üretilen C sınıfı β-laktamazın, bir β-laktam sınıfı olan antipsödomonal sefalosporinlerin etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (93). Bazı *P.aeruginosa* suşlarının, penisilinler, sefalosporinler ve aztreonam dahil olmak üzere β-laktam antibiyotiklerin çoğuna yüksek derecede direnç sağlayan geniş spektrumlu-β-laktamazlar (GSBL'ler) ürettiği bulunmuştur. GSBL'ler ağırlıklı olarak enzim sınıfı A'dadır, ancak oksasilin hidrolize etme yetenekleriyle adlandırılan OXA tipi GSBL'ler D enzim sınıfındadır ve ilk kez *P.aeruginosa* suşlarında belirlenmiştir (94, 95). β-laktamaz aracılı direnci engellemek için, klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri klinik

uygulamada geliştirilerek, kombinasyon terapilerinde β-laktamların etkinliğini büyük ölçüde artırdığı bulunmuştur (96).

Bakterilerde üç tip aminoglikozid değiştirici enzim keşfedilmiştir: Aminoglikozid fosfotransferaz (APH), aminoglikozid asetiltransferaz (AAC) ve aminoglikozid nükleotidiltransferaz (ANT) (97). *P.aeruginosa*'nın AAC'larının, kanamisin, amikasin, gentamisin, tobramisin ve netilmisinin inaktivasyonundan sorumlu olan aminoglikozidlerin 3' ve 6' pozisyonundaki amino grubuna bir asetil grubu aktardığı bulunmuştur (98-100).

#### 2.4.7.2. Kazanılmış Direnç

*P.aeruginosa*'nın kazanılmış direnci, direnç genlerinin yatay transferi veya mutasyonel değişikliklerle elde edilebilmektedir (101). *P.aeruginosa*'nın yüksek düzey içsel antibiyotik direncine ek olarak, kazanılmış direnç, çoklu ilaca dirençli suşların gelişimine büyük ölçüde katkıda bulunarak, mikroorganizmanın eradike edilmesindeki zorluğu arttırarak kronik enfeksiyona sebep olmaktadır (102).

**Mutasyonlarla Direnç:** *P.aeruginosa*'daki hedef bölgelerin mutasyonel modifikasyonları, antibiyotik alımının azalmasına, antibiyotik hedeflerinin modifikasyonlarına, dışa atım pompalarının ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin aşırı ekspresyonuna neden olabilmektedir. Mandsberg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DNA oksidatif onarım sisteminin etkisizleştirilmesinin, *P.aeruginosa*'daki mutasyon frekanslarını artırarak β-laktamaz üretiminin artmasına ve MexCD-OprJ dışa atım pompasının aşırı ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (103). Spontan mutasyonlar, spesifik bir porinin ekspresyonunu veya işlevini etkileyebilir, bu sebeple bakteriyel zar geçirgenliğini azaltabilir ve antibiyotik direncini arttırabilmektedir (104, 105). Transkripsiyonel düzenleyiciler, mexR, nalB, nalC veya nalD'nin gen mutasyonlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan MexAB-OprM'nin aşırı ekspresyonu, β-laktamlara ve florokinolonlara direnci arttırmıştır (106). MexZ gen mutasyonu tarafından indüklenen MexXY–OprM'nin aşırı ekspresyonu, aminoglikozid, β-laktam ve florokinolonlara direncin artmasına neden olmuştur (107). Transkripsiyonel bir regülatörü kodlayan nfxB geninde mutasyon, MexCD-OprJ'nin aşırı üretimi sonucu *P.aeruginosa* suşları florokinolonlara ve karbapenem antibiyotiklere daha az duyarlı hale gelmiştir (108). Ribozomal mutasyonlara sahip *P.aeruginosa* suşlarının, 30S ribozomal alt birimini hedefleyerek protein translasyonunu inhibe eden aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde

direnç geliştirdiği gösterilmiştir (109). Polimiksin direncinin, lipid A kısmındaki fosfat gruplarına 4-amino-L-arabinoz eklenmesiyle LPS'nin modifikasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (110). Ek olarak, PhoPQ ve PmrAB'nin iki bileşenli düzenleyici sistemlerinde gerçekleşen mutasyonlar, lipid A'ya aminoarabinoz ilavesinin modifikasyonunu destekleyerek *P.aeruginosa*'da polimiksin direncinin artmasına neden olmuştur (111-113). *P.aeruginosa*'da antibiyotik inaktive edici enzimlerin aşırı ekspresyonuna neden olan mutasyonlar sonucu direnç gelişebilmektedir. Örneğin sefalosporinlere karşı direnci büyük ölçüde arttıran bir β-laktamaz ile indüklenebilir gen olan AmpC'deki mutasyonların neden olduğu aşırı β-laktamaz üretimi gösterilmiştir (93, 114).

**Direnç Genlerinin Kazanılması:** Plazmitler, transpozonlar, integronlar ve profajlar üzerinde antibiyotik direnç genleri taşınabilmekte ve bu genler aynı veya farklı bakteri türlerinden yatay gen transferi aracılığıyla kazanabilmektedir (101). *P.aeruginosa*'da aminoglikozid ve β-laktam direnç genlerinin kazanıldığı rapor edilmiştir (115-118). Birçok β-laktam antibiyotikleri hidrolize eden, B sınıfı β-laktamazlara ait olan *P.aeruginosa* metallo-beta-laktamazları (MBL'ler) tanımlanmıştır. Bu *P.aeruginosa* MBL'leri için genlerin, plazmitler ve integronlar dahil olmak üzere genetik elementler tarafından taşındığı tespit edilmiştir (115, 116, 118-120).

#### 2.4.7.3. Adaptif Direnç

Adaptif direnç, çevresel bir uyarana yanıt olarak gen ve/veya protein ekspresyonundaki geçici değişiklikler nedeniyle bakterinin antibiyotik etkisinde hayatta kalma yeteneğini arttırabilmesi ve uyaran kaldırıldığında tersine çevrilebilmesidir (121). Adaptif direncin en iyi karakterize edilen mekanizması, *P.aeruginosa*'nın KF hastalarının akciğerlerinde ortama uyum sağlayarak kronik enfeksiyon ve kötü prognoz ile sonuçlanan biyofilm oluşumu ve persister hücrelerdir (122).

### 2.5. KF Hastalarında *P.aeruginosa*

Kronik alt solunum yolu enfeksiyonları, KF akciğer hastalığının karakteristik bir özelliğidir. Bir çok patojen saptansa da, en sık görülen ve akciğer fonksiyonlarında kötüleşmeye neden olan etken *P.aeruginosa*'dır. KF'li bireylerde *P.aeruginosa* kolonizasyonu akciğer fonksiyonlarında azalmayla birlikte morbidite ve mortalitenin artması ile ilişkilidir. Fonksiyonunu yerine getiremeyen KFTR, solunum yolu yüzey sıvısının yapısını değiştirerek doğal bağışıklık yanıtında ve bakteriyel klirenste

bozulmaya yol açabildiği gibi, direkt *P.aeruginosa*'ya bağlanarak, endobronşiyal enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. İlk izole edilen suşlar genellikle non-mukoid koloni morfolojisinde olup birçok antimikrobiyale duyarlıdır (123). Başlangıçta konak tarafından temizlenebilen veya yoğun antibiyotik tedavisiyle eradike edilebilen mukoid olmayan suşlar, zamanla değişen ortamın etkisiyle mukoid fenotipe dönüşüm için gerekli olan aljinat sentezini uyarmaktadır. Mukoid fenotipte *P.aeruginosa* suşlarının oluşması ile akciğer fonksiyonlarındaki hızlı düşüş kronik kolonizasyona/enfeksiyona sebep olmaktadır. *P.aeruginosa*'nın mucA geni aljinat sentezini sağlayan algT genini baskılayan anti sigma faktörünü kodlamaktadır. KF hastalarındaki kronik enflamasyon sonucu oluşan oksijen radikalleri mucA geninde mutasyona yol açarak aljinat sentezinin artmasına yol açmaktadır. Aşırı aljinat sentezi ile oluşan biyofilm, KF akciğer ortamında bakteriyi antibiyotiklere ve bağışıklık sistemine karşı korumada rol almaktadır (124, 125). Çevresinde oluşturduğu koruyucu biyofilm tabakasının antibiyotiklerin etkisini engellemesi nedeniyle mukoid suşların tedavi edilmesi daha zordur (60, 126, 127). Tekrarlayan enfeksiyon kemotaktik sitokinlerin üretimini ve salınımını artırarak, solunum yoluna çok sayıda polimorfonükleer hücre toplanmasını sağlamaktadır. Parçalanan nötrofillerden ortaya çıkan DNA balgamın daha yapışkan olmasına yol açmaktadır (128, 129). *P.aeruginosa*, KF akciğerlerinde canlı kalabilmesi ve bunu devam ettirebilmesi için oksidatif stres, antibiyotikler, besin yetersizliği, diğer organizmalarla rekabet, ozmotik stres gibi zorluklara karşı gen ifadesini değiştirerek dayanıklı hale gelebilmektedir. Aşırı aljinat üretimi, yetersiz QS, hareket kaybı, daha yavaş üreme, metabolizmanın yavaşlaması, antibiyotik direncinde artış gibi bakterideki fenotipik ve genotipik değişiklikler kronik kolonizasyon ile ilişkilendirilmektedir (130). KF hasta örneklerinden yapılan kültürde düz yapılı koloniden yuvarlak koloni morfolojisine değişim ve küçük koloni varyatları görüntüsü *P.aeruginosa*'nın morfolojik adaptasyonlarını içermektedir. Küçük koloni fenotipleri yüksek antibiyotik direnci göstermektedir. Bu fenotipi gösteren suşların biyofilm formasyonu 'titreme' hareketinde artış ve 'yüzme' hareketinde azalma ile aşırı pili üretimine sahip olduğu bulunmuştur (131).

KF'te antibiyotik kullanımı, oral, parenteral ve inhalasyon yoluyla uygulanabilmektedir. Amaç, mikroorganizmanın sebep olduğu enfeksiyonu erken aşamada önlemek, akciğerlerdeki akut alevlenmeyi tedavi etmek ve solunum yollarında kronik olarak bulunan mikroorganizmaların üremesini baskılamaktır (132). Akciğer

enfeksiyonları için antibiyotik kullanımında, belirli aralıklarla alınan solunum yolu örneklerinde üretilen patojenlerin antibiyotik duyarlılığına dikkat edilmelidir. KF'li hastalarda kombine antibiyotik tedavisi kullanılarak, *P.aeruginosa* türleri ile gelişen enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal spektrumun genişletilmesi, direncin ortaya çıkmasının önlenmesi ve ilaç toksisitesinin azaltılması hedeflenmektedir. Akciğer alevlenmesinde direnç gelişimini önlemek amacıyla ikili antibiyotik kombinasyonu, hastanede 14-21 gün süreyle intravenöz uygulanmaktadır (133). Tedavinin evde tamamlanması ancak iyi eğitimli aile varlığında ve uygun koşullarda söz konusu olabilmektedir (134). *P.aeruginosa* ile oluşan akciğer alevlenmelerinde öncelikli antibiyotik seçimi, antipsödomonal penisilin (seftazidim, piperasilin, tikarsilin) veya karbapenem (imipenem, meropenem, aztreonam) ile aminoglikozid (tobramisin, amikasin), polimiksin (kolistin) kombinasyonudur. Antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini belirlemek amacıyla kullanılan sinerji testleri laboratuvarlarda rutin olarak yapılmamakta ve tedavi bazı kombinasyonların sinerjik olduğu bilgisine dayanarak ampirik olarak uygulanmaktadır. Ancak, ampirik olarak seçilen antibiyotik kombinasyonlarının hasta bazında her zaman *P.aeruginosa* suşlarına karşı optimal sonuç vermediği gözlenmektedir. Akciğer hastalığının uzun süreli yönetiminde en etkili araçlardan birisi inhale antibiyotik kullanımıdır. Bu şekilde solunum yolundaki enfeksiyon alanına, sistemik etkilerini en aza indirerek yüksek konsantrasyonda ilaç verilmesi mümkün olmaktadır (135, 136). Kronik *P.aeruginosa* kolonizasyonunda kullanılabilecek diğer antibiyotik grubu makrolidlerdir. Haftada üç gün oral azitromisin kullanımının akciğer fonksiyonlarında iyileşme ve akciğer alevlenmesinde azalma sağladığı gösterilmiştir. Makrolid antibiyotiklerin bu etkisinin, antibakteriyel etkisinden çok antiinflamatuvar etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür. Antibiyotiklerin seçiminde mutlaka direnç durumu göz önünde bulundurulmalıdır (137). KF'te *P.aeruginosa*'ya göre seçilecek antibiyotik tedavisi ve dozları şekil 2-4'te görülmektedir.

| Bakteri | Antibiyotik | Çocuk dozu (Günlük) | Erişkin dozu (Günlük) |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | Seftazidim | 150-200 mg/kg 3 dozda İV | 6-9 gr, 3 dozda İV |
| | Piperasilin | 400 mg/kg 4 dozda İV | 12 gr, 3 dozda İV |
| | İmipenem | 50-100 mg/kg 4 dozda İV | 2-4 gr, 4 dozda İV |
| | Meropenem | 60-120 mg/kg 3 dozda İV | 3-6 gr, 3 dozda İV |
| | Aztreonam | 150 mg/kg 3 dozda İV | 6 gr, 3 dozda İV |
| | Tobramisin | 10 mg/kg 1-3 dozda İV | 9-12 mg/kg, 3 dozda İV |
| | Amikasin | 20-30 mg/kg 3 dozda İV | 15 mg/kg, 3 dozda İV |
| | Siprofloksasin | 20-30 mg/kg 12 saatte bir PO, İV | 800 mg, 2 dozda İV 1000-1500 mg, 2 dozda PO |
| | Cefepime | 100-150 mg/kg, 2-3 dozda İV | 4-6 gr, 2-3 dozda İV |
| | Colistin | 75.000 ü/kg, 3 dozda İV | 3-6 milyon ü, 3 dozda İV |

**Şekil 2-4: KF'te *P.aeruginosa*'ya göre seçilecek antibiyotik tedavisi ve dozları (138).**

## 2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal bir ajanın, belirli bir bakteri türüne karşı *in vitro* olarak etkin olup olmadığını belirlemek amacıyla antimikrobiyal duyarlılık testlerinden faydanılmaktadır. Her bakteri ailesi için klinik sınır değerler ABD'de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve Avrupa'da EUCAST gibi komiteler tarafından belirlenmektedir (139).

### 2.6.1. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere duyarlılığını test etmek için kullanılan bir yöntemdir. 96 kuyucuk içeren mikroplaklarda test edilecek antibiyotiğin çift kat seri dilüsyonları hazırlanmaktadır. Besiyerinde saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden alınarak, serum fizyolojikte 0,5 McFarland standardına göre ayarlanan süspansiyonlardan mikroplağın kuyucuklarına konulmaktadır. Her mikroplağa sterilite kontrol için besiyeri ve üreme kontrol için besiyeri ve bakteri ilave edilmelidir. Test edilen bakterinin üreme koşullarına uygun inkübasyon aşaması sonrasında, üreme oluşan kuyucuklardaki bulanıklık gözle veya optik yöntemlerle incelenmekte, bakteri üremesinin görülmediği ilk kuyucuktaki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak yorumlanmaktadır (140).

### 2.6.2. Beta Laktam Antibiyotikler

#### 2.6.2.1. Sefalosporinler

Sefalosporinler, 1956 yılında *Cephalosporium acremonium*'dan izole edilen β-laktam antibiyotiklerdir (141). Temel yapılarında dihidrothiazin (sefem çekirdeği) halkasından oluşan 7-aminosefalosporanik asit ve beta-laktam halkası içermektedirler. Bu temel yapıya farklı kimyasalların eklenmesi ile, antibakteriyel aktivite ve farmakokinetik özelliklere sahip farklı sefalosporinler elde edilmiştir (142). Sefalosporinlerin etki mekanizması bakterilerin PBP'lerine bağlanarak hücre duvar sentezini bozmaktır. Seftazidim yarı sentetik bir antibiyotik olup, 3. kuşak sefalosporinler arasında yer almakta ve antipsödomonal etkinliği bulunmaktadır (143). Gram pozitif bakterilere karşı daha az etkilidir. Dış zar geçirgenliğinin azalması, PBP'lerin antibiyotiğe karşı ilgilerinin azalması, bakterinin oluşturduğu beta laktamaz enzimi tarafından antibiyotiğin parçalanması ve antibiyotiğin hücre dışına pompalanması sonucu beta laktam grubu antibiyotiklere direnç ortaya çıkmaktadır (144, 145).

#### 2.6.2.2. Karbapenemler

Karbapenemler, toprak organizması *Streptomyces cattleya*'dan izole edilen ve tienamisin türevi β-laktam antibiyotiklerdir. Geniş spektruma sahip ve beta-laktamaza karşı dirençli olmalarından ötürü çoklu ilaç direnci olan Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında sıkça kullanılmaktadırlar (142). Etki mekanizması, PBP'leri bağlayarak ve inaktive ederek bakteri hücre duvarı sentezini engellemektir (146). Etki spektrumunun genişliği kısmen üçüncü nesil sefalosporinleri hidrolize edenler de dahil olmak üzere tüm serin bazlı β-laktamazlara karşı kararlılığa bağlıdır. Meropenem geniş ölçüde bir antibakteriyel spektruma sahiptir, ancak Stafilokok ve Enterokoklara karşı daha az aktifken, *P. aeruginosa*'ya, tüm Enterobacterales ve *H.influenzae*'ya karşı daha aktiftir. Yüksek aktivitesi, hücre lizizi ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere başlıca PBP'ler için iyi afinite ve bakterilere giriş kolaylığı ile açıklanmaktadır (147). Etki mekanizması, PBP'leri bağlayarak ve inaktive ederek bakteri hücre duvarı sentezini engellemek olduğu için karbapenem direncinin gelişmesinde dış zarda yer alan porinlerdeki değişiklikler önemlidir (148).

#### 2.6.2.3. Monobaktamlar

Bu grubun tek üyesi olan aztreonam sadece Gram negatif aerop bakterilere karşı etkilidir. Temel yapısında beta-laktam halkasına bağlı başka bir halka bulunmaması, diğer

beta-laktam antibiyotiklerinden ayıran özelliğidir (149-151). Aztreonamın etki mekanizması, Gram negatif bakterilerin PBP-3'üne bağlanarak hücre duvar sentezini durdurmaktır (149, 152). Aztreonam, *P.aeruginosa*'ya karşı etkili olup anaerop ve Gram pozitif bakterilerde etkisizdir. Monobaktamların aminoglikozidler gibi toksik etkileri olmaması ve penisiline alerjisi olan hastalarda kullanılabilmeleri avantaj olarak görülmektedir (142). Dış zarın geçirgenliğinin azalması, PBP-3'ün modifikasyonu ve ß-laktamaz enzimi aracılığıyla monobaktam grubuna direnç ortaya çıkmaktadır (151).

### 2.6.3. Makrolidler

Makrolidler, ana yapıları makrosiklik lakton halkası ve bu halkaya eklenmiş şekerlerden oluşmaktadır. İçerdikleri lakton halka sayısına göre gruplara ayrılmaktadır. Bakteri ribozomunun 50S alt birimine bağlanarak t-RNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önleyerek protein sentezini inhibe ederler. Makrolid antibiyotikler özellikle Gram pozitif bakterile karşı etkilidirler. Dış zar geçirgenliğinin azalması, dışa atım pompa sistemleri, 50S ribozom alt biriminde mutasyon sonucu makrolid grubu antibiyotiklere direnç ortaya çıkmaktadır (153, 154).

### 2.6.4. Aminoglikozidler

Streptomisin, 1944 yılında *Streptomyces griseus*'un fermentasyonu ile elde edilen ilk aminoglikozid grubu antibiyotiktir. 1957'de kanamisinin keşfiyle Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidlerin kullanılmasına başlanmıştır. En sık kullanılan aminoglikozidler; Amikasin, gentamisin ve tobramisindir. Aminoglikozidler ribozomların 30S alt birimine bağlanarak, mRNA'nın şifreyi yanlış okumasına ve hatalı aminoasitlerin peptide girmesine neden olarak protein sentezini inhibe etmektedirler. Aminoglikozidler anaerop bakterilere etkisizdir, çünkü bakteri hücre içine taşınmaları için oksijen gerekmektedir. Mikroorganizmaların, aminoglikozidleri inaktive edici enzimlerine karşı sahip olduğu direnç sayesinde, amikasin grup içinde en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahiptir ve Gentamisine dirençli *P.aeruginosa* suşlarına karşı amikasinin daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (155). Antibiyotiğin hücre içerisine geçişinin azalması, bakteri ribozumunda hedef alınan bölgelerin değişikliğe uğraması, bakteriyel enzimlerce inaktive edilmesi ve antibiyotiğin hücre dışına pompalanması sonucu aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç ortaya çıkmaktadır (156, 157).

### 2.6.5. Kinolonlar

Kinolonlar, 1962'de nalidiksik asitin bulunması ile klinik pratiğe girmiş sentetik geniş spektrumlu bir antibiyotik ailesidir. Florokinolonlar antimikrobiyal etkilerini bakteriyal hücre replikasyonu, transkripsiyonu ve DNA onarımınında görev yapan iki enzim olan DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV'e etki ederek gösterirler. Bu enzimler bakteri hücresinin boyundan daha büyük olan kromozomal DNA'nın hücre içine paketlenmesini sağlamaktadır. DNA giraz enzimi intrasellüler DNA'da bulunan negatif süpersarmal kıvrımların oluşumundan sorumlu olduğu gibi DNA replikasyon çatalının başlaması ve ilerlemesi için de gereklidir. Kinolonlar replikatif DNA sentezini hızla durdurarak replikasyon çatalının ilerlemesini engellemektedir. DNA giraz enzimi ayrıca belirli operonların transkripsiyonunda, DNA'nın tamirinde ve rekombinasyonda rol oynamaktadır. Nalidiksik asitten sonra ikinci kuşak kinolonlar norfloksasinin sentezlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Birinci kuşaktan farklı olarak, aerop Gram pozitif bakterilere karşı da etkinlik göstermekte, aerop Gram negatif bakterilere de etkinlikleri daha fazladır. Siprofloksasin ikinci kuşak kinolonlar arasında yer almaktadır (158, 159). Daha sonra üçüncü kuşak yeni fluorokinolonlardan levofloksasin geliştirilmiştir. Gram pozitif bakterilere daha fazla etkinliği olduğu, anaerop bakterilere karşı orta derece bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Son olarak dördüncü kuşak florokinolonlar geliştirilmiştir. Diğer antibiyotiklerde olduğu gibi doğal ya da sonradan kazanılmış direnç, porinlerin sayısının düşürülerek ilaç alımının azaltılması sonucu kinolon grubu antibiyotiklere direnç ortaya çıkmaktadır (160-162).

### 2.6.6. Polimiksinler

Polimiksinler, 1947 yılında ilk kez topraktan sporlu bir bakteri olan *Bacillus polymyxa*'dan izole edilen ve sonrasında Bacillus türlerinden polipeptit yapıda, kimyasal yapıları farklı türevleri elde edilmiştir (163). Kolistin ise 1949 yılında *Bacillus polymyxa var. colistinus*'tan elde edilmiş ancak 1959 yılında klinik kullanıma girmiştir (164). Hoeprich 1970 yılında kolistine 'polimiksin E' ismini vermiştir (165). Ancak, nefrotoksisite, nörotoksisite, lökopeni ve hepatotoksisite gibi yan etkilere sahip olması nedeniyle polimiksinlerin kullanımı sınırlı kalmıştır (166). Polipeptit yapıdaki kolistin etkisini Gram negatif bakterilerin dış zarında yer alan LPS ve fosfolipitlerle reaksiyona girerek hücre zarının bütünlüğünü bozarak göstermektedir (167, 168). Ancak katyonik peptitlerin toksik etkisi, memeli hücre duvarına da benzer şekilde bağlanma eğiliminde

olmalarından kaynaklanmaktadır. Diğer katyonik peptitlerde olduğunu gibi anti-endotoksin aktivitesi göstermektedir. Bakterisidal etkili bir lipopeptit olan kolistin başta *P.aeruginosa* olmak üzere çeşitli Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Bunun dışında kolistin, Gram pozitif bakterilere ve anaeroplara karşı etkili değildir (169-172). Dış zar proteinlerinden olan OprH'nin mutasyonu ile ilacın bakteri LPS'si üzerindeki bağlanma bölgesinin $Mg^{++}$ iyonlarınca bloklanması sonucu kolistine karşı direnç ortaya çıkmaktadır (173).

## 2.7. Biyofilm

### 2.7.1. Tarihçe

Antonie Van Leeuwenhoek ilk defa kendi ilkel mikroskobunda diş plaklarındaki mikrobiyal toplulukları incelemiş ve ‘‘animaküli’’ olarak isimlendirmiştir. Heukelekian ve Heller, mikroorganizmaların sucul ortamlarda tutundukları yüzeylerde bir araya gelerek aktivitelerini arttırdığını gözlemleyerek ‘‘şişe etkisi’’ olarak tanımlamışlardır (174). Elektron mikroskonunun kullanılması ile biyofilm yapısı daha detaylı incelenmeye başlanmıştır. Taramalı elektron mikroskobunu kullanan Jones ve ark., su filtreleri üzerinde oluşan biyofilmin çeşitli mikroorganizmaları içerdiğini ve kullandıkları polisakkarite özgü boyalarla biyofilmleri çevreleyen yapının polisakkarit yapıdan oluştuğunu saptamışlardır (175). Işık mikroskobundaki ilerlemeler ile 1970'li yıllarda bakteriyel biyofilmlerle ilgili daha detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Biyofilm tanımı ise 1978 yılında mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeylere tutunarak ekolojik bir niş oluşturarak biyofilm meydana geldiği Costerton ve ark. tarafından ortaya konmuştur (176).

### 2.7.2. Yapısı

Biyofilm, mikroorganizmaların kendi ürettikleri EPS matriks içine gömülü, hareketsiz olarak birbirine, canlı veya cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde bulunan, üreme, protein üretimi ve gen ekspresyonu açısından planktonik formlarına göre farklı özellikler sergileyen sesil hücrelerinin oluşturduğu topluluktur (177). Yapısal olarak, %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlar içermektedir. Tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındıran polimikrobiyal formda bulunabilmektedirler (178). Endüstriyel, içilebilir su şebeke boruları, doğal sucul sistemler ve medikal cihazlar gibi birçok yüzeyde oluşabilmektedirler (174). Ayrıca

cansız yüzeylerin yanısıra, canlı organizmada çeşitli dokularda görülebilmektedir. Otitis media, doğal kapak endokarditi, periodontit ve kronik bakteriyel prostatit gibi hastalıkların dışında, protezler, kateterler, kontakt lens gibi yabancı cisim enfeksiyonları ve özellikle KF'li hastaların kronik akciğer enfeksiyonlarında çok önemli yer tuttuğu bilinmektedir (177).

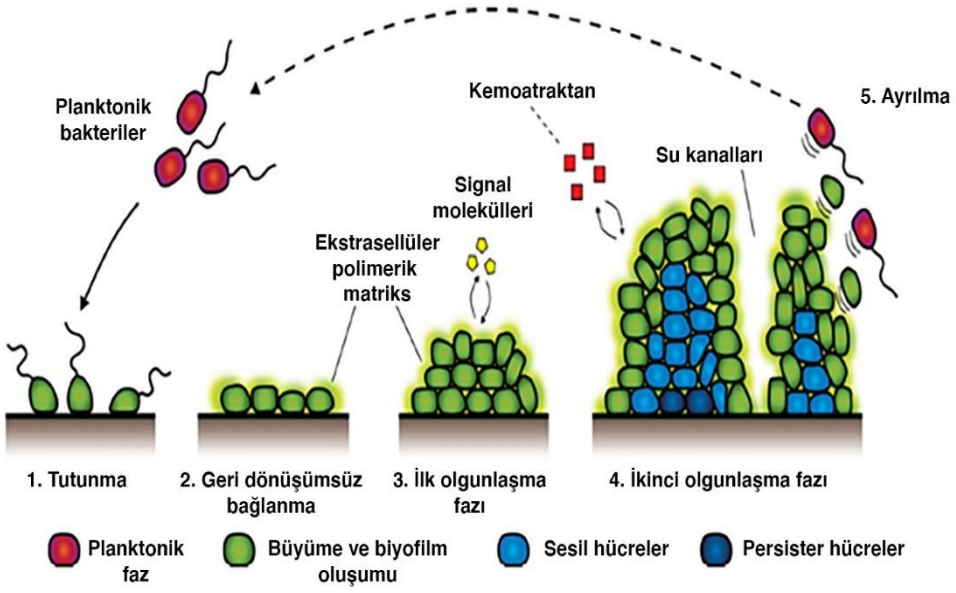
### 2.7.3. Oluşumu ve Evreleri

**Tutunma:** Bakterilerin ilk olarak bir yüzeye tutunmaları ile başlayan biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların bulundukları çevredeki yoğunluğu algıladıkları QS sistemini ile düzenlenmektedir. Mikrobiyal tutunma aşamasında yüzeyin yapısı ve fizikokimyasal özelliği önemli yer tutmaktadır. Tutunma aşamasından sonra, bakteriler bulundukları ortama düşük molekül ağırlıklarına sahip haberci moleküller salgılamaktadır. Mikroorganizmaların hidrofobik yapıda teflon ya da diğer plastik yüzeylere, metal ya da cam gibi hidrofilik nonpolar yüzeylere oranla daha hızlı tutunduğu belirlenmiştir (179-182). Tutunmanın ilk aşaması geri dönüşür özelliktedir. Mikrooganizmanın tutunulan yüzey ile arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır. Bu aşamada logaritmik üreme fazı sergilenmektedir. Ph, sıcaklık, iyonik denge, ortamdaki besin miktarı, EPS üretimi, hücre-yüzey hidrofobisitesi, flagella ve pili varlığı yüzeylere tutunmada yer alan faktörlerdendir (183, 184). Bakterilerin çoğunun negatif yüklü olup hidrofobik yapılar içermesi, tutunulan yüzey ve mikroorganizma arasında var olan elektrostatik itme gücünün üstesinden gelerek mikrobiyal aderans açısından avantaj sağlamaktadır (177, 185).

**Geri Dönüşümsüz Bağlanma:** Tutunma aşamasından sonra bakteriler, kendi aralarında iletişimi sağlayan kimyasal sinyalleri algılayarak çoğalmaya başlarlar ve geri dönüşümsüz bağlanma olan ikinci aşamaya geçilmektedir. Sinyaller belirli bir seviyeye ulaştığında EPS üretimi için genetik mekanizmalar uyarılarak, bol miktarda ekstrasellüler matriks sentezlenmektedir. EPS, canlı ya da cansız yüzeylere tutunmayı sağlayarak mikroorganizmaları bir kütle içerisinde birada tutarak biyofilm ile ilişkili antimikrobiyal direnç gelişimine yol açmaktadır. Bu aşamada oluşan hücre agregatları 10 mm'den daha kalın bir tabaka halini aldıklarında hareketleri azalmaktadır (177).

**İlk ve İkinci Olgunlaşma Fazı:** Tutunma ve geri dönüşümsüz bağlanma aşamalarından sonraki üçüncü aşama ilk olgunlaşma fazı olarak tanımlanmaktadır. Biyofilmler 100 mm'den daha fazla kalınlığa eriştiğinde ikinci olgunlaşma fazı aşaması başlamaktadır. Bu aşamada hücre yapıları ilkel bir sirkülasyon sistemi gibi çalışmaktadır. Biyofilm içerisindeki sıvı kanallar ve boşluklar mikroorganizmaların ve besinlerin atık ürünlerinin değişimine olanak sağlamaktadır. Olgun biyofilmler pH değişimi, oksijen konsantrasyonu, besin varlığı, metabolik aktivite, üreme ve hücre yoğunluğu gibi çeşitli faktörlere göre değişen heterojenik mikroçevreler içerirler (186).

**Ayrılma:** Beşinci aşama, ana yapıdan biyofilmin dökülmesini ve sesil hücrelerin hareketli forma dönüşümünün gerçekleştiği biyofilmin son aşamasıdır (179). Biyofilm içindeki mikrobiyal topluluk, biyofilmi tutan polisakkaritleri kıran ve böylece yeni bir yüzeye kolonizasyon için biyofilm yapısının üst kısmında bulunan bakterileri serbest bırakan farklı sakkarolitik enzimler üretmektedir. Bu ayrılma aşaması, çeşitli çevresel sinyalleri, sinyal transdüksiyon yolaklarını ve efektörleri içeren karmaşık mekanizmalardan oluşabilmektedir (187-189). Artan sıvısal mekanik kuvvet, genetik olarak programlanmış yanıt ve var olan besin maddelerinin tükenmesi sebebiyle mikrokoloniler ana biyofilm kitlesinden koparak konakta enfekte olmamış bölgelere giderek tutunur ve yeni biyofilm oluşumunu başlatırlar (190, 191). Biyofilm oluşum basamakları şekil 2-5'te görülmektedir.




**Şekil 2-5: Biyofilm oluşum basamakları (192).**

### 2.7.4. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri

**Savunma:** Mikroorganizmalar tarafından biyofilm bulundukları ortamdaki birtakım fiziksel etkilere karşı dayanıklılığı sağlamak adına strese cevap olarak oluşturulmaktadır. Biyofilm içerisinde mikroorganizmalar, besin yetersizliği, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, fagositoz, dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı planktonik formlarına göre daha dirençlidirler. EPS, bakteriyi inflamatuar hücrelerin fagositozundan korumaktadır (193).

**Adhezyon ve Kolonizasyon:** Mikroorganizmaların adezyonu yüzey proteinleri aracılığıyla konağın fibrinojen, fibronektin, elastin ve vitronektin gibi proteinlerine yapışmaları sonucunda oluşmaktadır. Bakteri ve konağın arasında aderansın oluşmasında matriks ve adezin proteinleri önemli rol oynamaktadır (194). Adezyon sonrası bakteriler hem çoğalır hem de biyofilm oluşumunu gerçekleştirirler. Biyofilm bakteri adezyonunu arttırırken, biyofilm oluşumundan sonra ise hareket ve adezyon faktörlerinin ekspresyonunda bir baskılanma olmaktadır (195).

**Yaşanabilir Çevre Geliştirme:** Biyofilm mikroorganizmalar için daha kararlı bir mikroçevre sağlamaktadır. Bu mikroçevre sayesinde bakteriler stres faktörlerine hızla adapte olarak daha fazla uyum yeteneği kazanabilmektedir. Ayrıca besin maddelerinin örneğin, biyofilm ortamında kullanılabilir glukozun olması, bakterinin EPS ekspresyonunu ve biyofilm oluşumunu arttırarak yaşabilir bir çevre imkanı sağlamaktadır (191).

**Kominite Oluşturma:** Mikroorganizmaların ortama adaptasyonu için biyofilm oluşturmaları önemlidir. Komite oluşturmak biyofilm içerisindeki mikroorganizmaya kazanç sağlamakta ve ortama uygun genleri eksprese etmektedirler. Mikroorganizmalar ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığıyla biyofilm oluşturabildikleri gibi yine aynı genler aracılığıyla ortamdan aldıkları uyaranlar (pH, ısı, besin vs.) sayesinde planktonik forma geçebilmektedirler (191).

### 2.7.5. Biyofilm Tanı Yöntemleri

Biyofilm oluşumunu araştırmak için *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılmaktadır. *İn vitro* modeller kendi içinde besin aktarımına bağlı olarak kapalı sistemler (kesikli kültür) ve açık sistemler (sürekli kültür) olarak sınıflandırılabilir. Kapalı sistemler genel olarak daha basit ve uygulaması kolayken, açık sistemler büyüme parametrelerinin ve dinamiklerinin daha iyi kontrol edilmesine olanak sağlamaktadır (196).

Kapalı sistemlerde en sık kullanılan yöntemlere örnek olarak; Agar üzerinde büyütülmüş statik bir biyofilm, 96 kuyucuklu mikroplak, peg çıkıntısı içeren kapaklar ile oluşturulan Calgary biyofilm cihazı ve biyofilm ring testi verilebilir. Peg çıkıntısı içeren mikroplak kapağı sistemlerinde biyofilm yoğunluğu ise peg başına düşen canlı hücre sayısı aracılığıyla belirlenmektedir. Peg temelli yöntemler, alternatif mikroskobik ve boyama yöntemleriyle birleştirilebilmektedir (197, 198). En yaygın kullanılan açık sistemler ise; Akışkan-hücre çemberi, The Center for Disease Control (CDC) biyofilm reaktörü ve drip flow biyofilm reaktöründen oluşur. Yöntemlerin birbirlerine karşı avantajları ve/veya dezavantajları bulunmakta, amaca uygun yöntemin seçilmesi önerilmektedir (198, 199).

*İn vivo* ve *in vitro* biyofilm oluşumunun belirlenmesine yönelik günümüzde yapılan çalışmalarda, ışık mikroskobu, lazer taramalı konfokal mikroskop, taramalı elektron mikroskobu veya fluoresan mikroskop kullanılarak direkt sayım, canlı hücre sayım, metabolik aktif boya maddeleri ve radyokimyasallar sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik yöntemlerde; Canlı hücre sayısının belirlenmesi için koloni oluşturan birim (KOB), boyama yöntemlerinde; Kristal viyole, floresein diasetat gibi boyalar kullanılarak biyofilm tabakasını göstermek, ölü/canlı (LIVE/DEAD BacLight boyama kiti) hücrenin tespiti gibi çeşitli uygulamaları vardır. Biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan metabolik yöntemler ise; Resazurin yöntemi (sadece canlı hücrerli boyar), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit) yöntemi, BioTimer yöntemi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan fiziksel yöntemler; Kütle spektrofotometrisi, lazer taramalı konfokal mikroskobisi, konfokal raman mikroskobisi, elektron mikroskobisi, X-ray mikroskobisi, tarayıcı uç mikroskobisi, DNA miktarının ölçümü ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır (200).

Metabolik aktif boya maddeleri kullanılarak biyofilm varlığının tespiti ile ilgili çalışmalara örnek olarak kongo kırmızılı agar yöntemi, kristal viyole boyası veya safranin boyasının kullanıldığı standart tüp yöntemi ve mikroplak yöntemidir (201). Diğer bir yöntem olan fiber-optik çekirdek üzerinde gelişen biyofilmin kızılötesi ışınların penetrasyonunda değişim yaratması esasına dayanan biyofilm oluşumunu gerçek zamanlı izlemeye imkan sağlayan sistemdir (201). Biyofilm oluşumunu belirlemeye yönelik yenilikçi bir yaklaşım olan ‘luminisan konjuge oligotiyofen’ molekülleri ise ekstrasellüler

matriks komponentlerine bağlanmakta ve hücrelere zarar verilmeden biyofilm oluşumu gözlemlenmektedir (203).

Bu yöntemlerin bazıları, biyofilmde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenebilmesi için kullanılabilmektedir. Kapalı yöntemlerden kuyucuk temelli mikroplaklar ve peg çıkıntısı içeren kapaklar ile açık yöntemlerden akışkan-hücre modeli ve suspended substratum reaktörü, antimikrobiyal duyarlılığın belirlenebildiği biyofilm yötemlerine örnek olarak verilebilir (199).

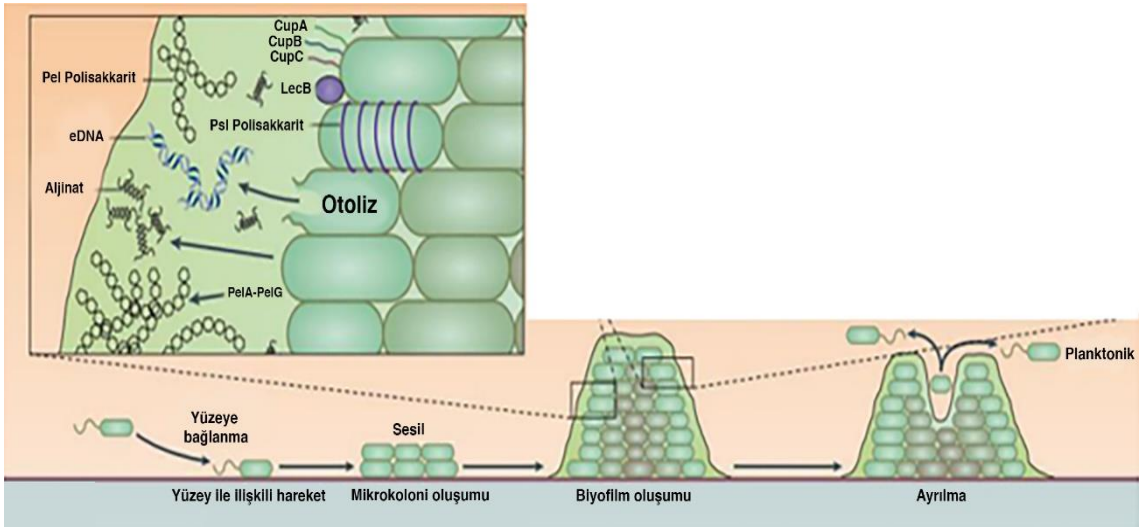
### 2.7.6. QS ve Biyofilm

1998 yılında Greenberg ve ark., QS sisteminin biyofilm oluşumundaki rolünü ilk kez *P.aeruginosa*'da tanımlanmıştır (204). QS sistemi, bakterinin adezyonu sonucu biyofilm içerisindeki hücrelerin gelişimi ve farklılaşması esnasında yer almakla birlikte biyofilm oluşumunun ilk ve ikinci olgunlaşma aşamasında düzenleyici etkileriyle önemli rol oynamaktadır. QS sinyalleri sayesinde bir araya gelen mikroorganizmalar biyofilm basamaklarının temelini oluşturmaktadır (205). QS sisteminin bakteriye getirdiği en önemli avantajlar arasında bulunduğu ortama adaptasyon geliştirmesi ve gelişen enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıttan kaçabilmesidir. QS sistemi içinde önemli rolü olan sinyal molekülleri düzenleyici etkileri sebebiyle "Otoindükleyiciler" olarak tanımlanmışlardır. Gram pozitif bakterilerde küçük peptitlerin sinyal molekülü olarak yer aldığı oligopeptit/iki komponentli tipte QS sistemi, Gram negatif bakterilerde açil homoserin lakton (AHL) moleküllerinin sinyal molekülü olarak yer aldığı LuxI/LuxR–tipi QS sistemi ve hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde LuxS geninin kodladığı otoindükleyici 2 (AI-2) molekülünün sinyal molekülü olarak kullanıldığı LuxS/AI-2 tipi QS sistemi bulunmaktadır (206).

*P aeruginosa*'da 4 adet QS sistemi belirlenmiştir. lasRI gen lokusunun üretimini kontrol ettiği 'N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton' sinyal molekülü ile kontrol edilen las sistemi, rhlRI operonu ile üretilen 'N-bütiril-homoserin lakton' ile düzenlenen rhl sistemi, '2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon' üretimi ile las ve rhl sistemlerini kontrol eden pqs sistemi ve yeni bir QS sistemi '2-(2-hidroksifenil)-tiyazol-4-karbaldehit' sinyal molekülünü kullanan 'Integrated Quorum Sensing'dir (207, 208, 209, 210).

### 2.8.7. *P.aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumu

*P.aeruginosa*'da biyofilm oluşumu bakterinin tip IV pili ile yüzeye tutunması ile başlamakta, seğirme hareketi ile birlikte olgun biyofilmlere dönüşecek olan mikrokolonilerin oluşması aşamasıyla devam etmektedir. Oluşan biyofilmin mimarisi, biyofilm yapısının başlangıcında bakterinin adezyonunda etkili olan CupA, CupB, CupC fimbria ve LecB proteinlerinin, bakterilerin çevresinde helikal şekilde düzenlenen Psl ve aljinat polisakkaritlerinin, biyofilmin yapısını oluşturan PelA-PelG ile sentezlenen Pel polisakkaritinin, ekstrasellüler DNA (eDNA)'nın üretimine göre farklılık göstermektedir (211) (Şekil 2-6).




**Şekil 2-6: *P.aeruginosa* biyofilm oluşumu (212).**

### 2.7.7. Biyofilmlerde Antimikrobiyal Direnç

Mikroorganizmaların yüzeylere geri dönüşümlü olarak tutundukları biyofilm oluşumun ilk aşamasında antimikrobiyal maddelerin hala etkili olduğu gözlemlenmiştir. Fakat ikinci aşamadaki geri dönüşümsüz bağlanma, mikrokoloni üremesi ve olgun biyofilmlerin oluşumu ile devam eden süreçte sesil hücrelerin planktonik hücrelere göre antibiyotiklere maksimum toleransı gösterilmiştir. Antibiyotiklerin biyofilm ortamındaki MBEK değerleri, planktonik formlarına göre 100-1000 kat daha yüksek bulunmuştur (6, 213, 214).

**Antibiyotik penetrasyonunda azalma:** EPS matriks ve biyofilm yapısı difüzyonu azaltarak polar ve yüklü antibiyotiklerin girişini önler ve birincil bir bariyer görevi görmektedir (215). Antibiyotiğin biyofilm komponentlerine bağlanması, fiziksel bir bariyer etkisi yaratarak antimikrobiyal maddenin mikroorganizma hücresine ulaşmasını

engelleyebilmektedir (216, 217). Hücre dışı matriks bileşenleri olan aljinat ve eDNA, antibiyotik şelatlama aktivitesi gösterebilmektedir (218). Biyofilm içindeki ozmotik çevre, bakteride strese yol açarak porinlerin yapısında veya miktarında değişikliklere neden olabilmektedir. Q faktör olarak tanımlanan RpoS geni, genel stres yanıtında koruyucu olarak etki gösteren trehalozun aşırı sentezlenmesine ve bu da biyofilm yapısının kalınlaşmasına neden olmaktadır (219, 220).

**Mikroçevrede Değişiklik:** Biyofilmin farklı katmanlarında Ph, oksijen konsantrasyonu ve besin maddelerinin varlığı gibi faktörler değişkenlik gösterebilmektedir. Biyofilm yapısı içerisinde yüzey katmanlarında oksijenin tüketildiği ve daha dip kısımlarda anaerobik ortamın oluştuğu bilinmektedir. Bakteri popülasyonları içinde heterojenliğe yol açan bu durum antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılıkta farklılıklara yol açabilmektedir. Olgun biyofilm formlarında mikroorganizmanın logaritmik üreme fazından yavaş üreme veya ürememe fazına geçmesi genellikle antibiyotiklere karşı direnç gelişimi ile sonlanmaktadır (221). Mikroçevre değişimi sonucu direnci etkileyen diğer bir faktör, biyofilmin alt katmanlarında bazı atık maddelerin birikimi nedeniyle oluşan asidik ortam ve pH değişikliğinin antibiyotik aktivitesi açısından olumsuz etkiler yaratmasıdır (222). Bazı çalışmalarda KF hastalarının akciğerlerinde gelişen biyofilm ve oksidatif stres gibi durumların *P.aeruginosa* suşlarına hipermutant özelliği kazandırarak antibiyotik direncini indüklediği gösterilmiştir (102, 223).

**Fenotipik Değişiklikler:** Bakterinin bir yüzeye adezyonundan olgun biyofilm yapısının oluşumuna kadar geçen aşamalarda birtakım fizyolojik, metabolik ve fenotipik değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu aşamalarda devreye giren QS sistemi aracılığıyla sinyal moleküllerinin salınımında genetik mekanizmaların etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Biyofilmlerde görülen mutasyonların temel sebebi horizontal gen transferleridir. Biyofilm içerisindeki fizyolojik koşullar, düşük afiniteli antibiyotik hedeflerine, antibiyotikleri parçalayan enzimlere, dışa atım pompalarına nasıl sahip olduklarını ve çok ilaca dirençli fenotiplere nasıl dönüşebildiklerini açıklamaktadır (103, 224). Ayrıca biyofilmlerde endojen kaynaklı ROS artışı ile oluşan oksidatif stres biyofilmlerin mutasyonlara daha yatkın olmalarına yol açmaktadır (225). Biyofilm ortamı ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal bir yapı oluşturarak, direnç plazmitlerinin aktarımı ile genetik yapısında farklılıklar görülen hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli hale gelebilmektedir (59).

**Yavaş Büyüyen ve Persister Hücreler:** Biyofilm ortamında bakteriler tarafından ihtiyaç duyulan besin maddelerinin bulunmaması durumunda bakteriler üremelerini yavaşlatır veya üremenin olmadığı forma geçerler. Persister hücreler, biyofilm hücrelerinin yaklaşık %1'ini oluşturur ve yavaş büyüyen, metabolik olarak aktif olmayan ve antibiyotiklere karşı oldukça toleranslı hücrelerdir. Persister hücreler antibiyotik varlığında çoğalmaz, ancak antibiyotikler ortamda bulunmadığında, büyümeye devam ederler. Spor benzeri bir yapı özelliği göstererek, biyofilmdeki varlıkları antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmiştir (226, 227).

Biyofilm ortamında antimikrobiyal direnç genel olarak tek bir mekanizmaya bağlı değildir, hem antibiyotik toleransı hem de antibiyotik direnç mekanizmalarının bir kombinasyonudur. Bu kombinasyon; Bakteri türüne, biyofilmin gelişim aşamasına ve biyofilm büyüme koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (228).

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, İÜ-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik kurulu kararınca 4170 no'lu, 09 Ocak 2020 tarihli yazı ile onaylanmıştır.

## 3.1. Gereçler

### 3.1.1. Standart Suşlar

#### 3.1.1.1. *P.aeruginosa* ATTC 27853

Çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* ATTC 27853 suşu kan kültürü materyalinden elde edilmiş bir klinik suştur. LGC Standards, Teddington, UK firmasından temin edilmiştir (229).

#### 3.1.1.2. *P.aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 47085

Çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* ATTC 47085 suşu, LGC Standards, Teddington, UK firmasından temin edilmiştir (230).

### 3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

#### 3.1.2.1. MacConkey Agar Besiyeri

| | |
|---|---|
| Pepton | 20 g |
| Laktoz | 10 g |
| Safra tuzları | 1,5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Nötral kırmızısı | 0,03 g |
| Kristal viyole | 0,001 g |
| Distile su | 1000 ml |

500 g'lık kutuda hazır olarak üretici firmadan (Oxoid) alınmıştır. Üzerindeki prosedüre göre 51,5 g toz besiyeri 1000 ml distile suda eritilmiştir. Otoklavda, 121ºC'de 15 dakika steril edilmiştir. pH 7,1'e ayarlanarak, 45ºC'ye kadar soğuması beklendikten sonra 4 mm kalınlıkta olacak şekilde steril petri kutularına dökülmüştür. *P.aeruginosa* suşlarının izolasyonunda kullanılmıştır (231).

### 3.1.2.2. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri

TSA (OR-BAK, Türkiye) ticari olarak üretici firmadan hazır olarak satın alınmıştır. Bu besiyeri biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.2.3. Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri

TSB (OR-BAK, Türkiye) ticari olarak üretici firmadan hazır olarak satın alınmıştır. Bu besiyeri, biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla ve MBEK değerlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.2.4. Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth (KA-MHB) Besiyeri

KA-MHB (GBL, Türkiye) ticari olarak üretici firmadan hazır olarak satın alınmıştır. Besiyeri, MİK ve MBEK değerlerini belirlemek amacıyla antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

### 3.1.2.5. Gliserollü Brucella Broth Besiyeri

Brucella Broth.....28 g

Gliserin.....100 ml

Distile Su.....900 ml

500 g'lık kutuda hazır olarak üretici firmadan (Acumedia) alınmıştır. Üzerindeki prosedüre göre 28 g toz besiyeri 900 ml distile suda eritilerek, 100 ml gliserin eklenmiştir. Otoklavda, 121ºC'de 15 dakika steril edilmiştir. 45°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Gliserollü brucella broth besiyeri *P.aeruginosa* suşlarını -80˚C'de muhafaza etmek amacıyla kullanılmıştır.

### 3.1.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

### 3.1.3.1. *P.aeruginosa'nın* Tanımlanması için Kullanılan Ayıraçlar

Oksidaz Ayıracı

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür.....0,1 g

Distile su.....10 ml

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır (232).

### 3.1.4. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

%0,9 İzotonik NaCl Solüsyonu (Eczacıbaşı, Türkiye)

Kristal Viyole Çözeltisi (%0,1) (Merck)

| |
|---|
| Kristal viyole .....0,1 g |
| Distile su .....100 ml |

0,1 g kristal viyole tartılarak, 100 ml steril distile suda çözülmüştür. Biyofilm oluşumunu gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (233).

Glasiyal asetik asit (TEKKİM, Türkiye)

Glasiyal asetik asit, azitromisin toz antibiyotiğinin çözücü maddesi olarak kullanılmıştır.

Sodyum hidroksit (Merck, Germany)

Sodyum hidroksit, levofloksasin toz antibiyotiğinin çözücü maddesi olarak kullanılmıştır.

Sodyum karbonat (Sigma, Germany)

Sodyum karbonat, seftazidim toz antibiyotiğinin çözücü maddesi olarak kullanılmıştır.

Sodyum bikarbonat (Sigma, Germany)

Sodyum bikarbonat, aztreonam toz antibiyotiğinin çözücü maddesi olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5. Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

- Seftazidim (1gr) Sigma
- Meropenem (500 mg) Sigma
- Aztreonam (500 mg) Sigma
- Siprofloksasin (1gr) Carbosynth
- Levofloksasin (1gr) Carbosynth
- Amikasin (5gr) Sigma

- Gentamisin (1gr) Carbosynth
- Tobramisin (1gr) Sigma
- Azitromisin (1gr) Sigma
- Kolistin (1gr) Sigma

### 3.1.6. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Steril öze (Looplast LP ITALIANA SPA, Italy)
- Petri kutusu (ISOLAB, Germany)
- Parafilm (ISOLAB, Germany)
- Eppendorf tüp 1,5 ml (ISOLAB, Germany)
- Boncuklu cryo tüpler (ISOLAB, Germany)
- Beher (ISOLAB, Germany)
- Cam tüpler (ISOLAB, Germany)
- Balon joje (ISOLAB, Germany)
- 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplaklar (ISOLAB, Germany)
- Nunc™ Immuno TSP Lids 96 kuyucuklu kapaklı mikroplak (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Nunc™ MicroWell™ 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplak (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Steril eküvyon (ISOLAB, Germany)
- Steril 16*100 mm cam kültür tüpleri
- Steril falkon tüpleri 50 ml (ISOLAB, Germany)
- Steril mikropipet uçları (2-200-1000 µl) (Gilson, France)
- Steril 12 kanallı mikropipet (PIPETMAN Gilson, France)
- Steril 8 kanallı mikropipet (PIPETMAN Gilson, France)

### 3.1.7. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

- Vortex (SCILOGEX-MX-S, USA)
- İnkübatör (36±2ºC) (Sanyo, Japan)-(Nüve, Türkiye)
- Buzdolabı -20ºC, +4 ºC (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu -80ºC (Haier Bio-Medical Ultra Low Temperature Freezer, China)
- Analitik terazi (OHAUS Explorer, USA)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Pasteur fırını (Nüve, Türkiye)
- Mikrobiyolojik güvenlik kabini (Nüve-MN 120 Class II, Türkiye)
- pH Metre (OHAUS Explorer, USA)
- Ultrasonik banyo (Branson, ABD)
- Spektrofotometre (ELx™ 800 BİOTEK, USA)
- McFarland densitometre (Biosan Den-1, Latvia)
- Distile su cihazı (Merck Millipore, USA)
- Çalkalamalı inkübatör (Heidolph, Germany)

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. *P.aeruginosa* Suşlarının Toplanması

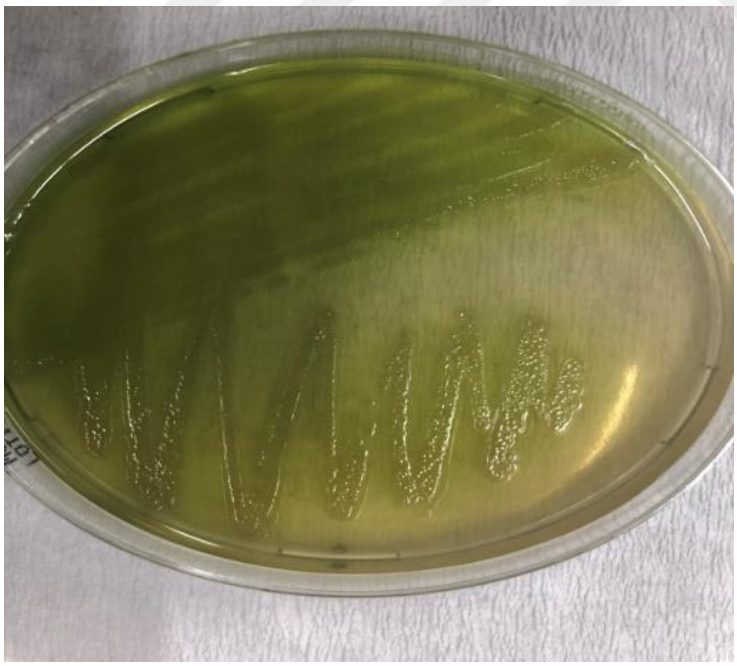
Ocak 2020-Ağustos 2021 tarihleri arasında İÜ-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen KF'li hastaların solunum yolu örneklerinde üreyen ve konvansiyonel yöntemlerle *P.aeruginosa* olarak tiplendirilen suşlar fenotipik özellikleri (mukoid/non-mukoid) incelendikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aynı hastadan bir yıl içinde saptanan aynı tür bakteriler çalışmadan çıkarılarak, çalışmanın daha sonraki aşamalarına (biyofilm, antimikrobiyal duyarlılık testleri) toplam 139 suşla devam edilmiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla suş farklı fenotip ve antibiyogramları varsa birbirinden farklı olarak belirlenmiştir.

### 3.2.2. *P.aeruginosa* Suşlarının Tanımlanması ve Muhafaza Edilmesi

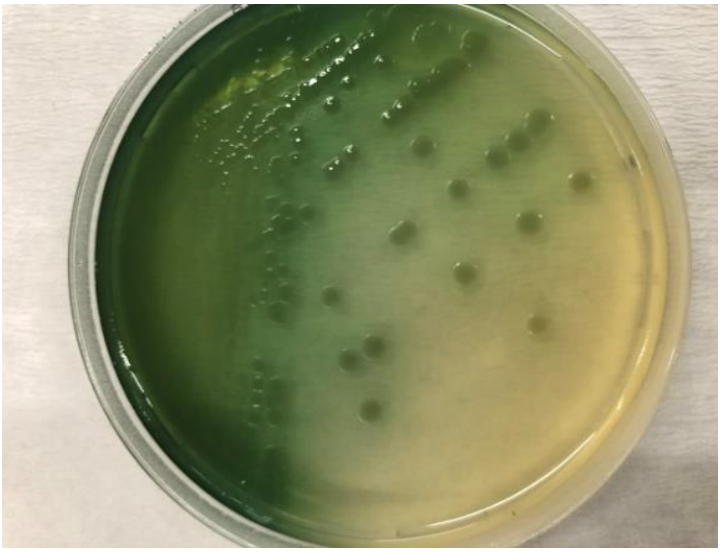
İÜ-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda incelenen KF'li hastaların solunum yolu örneklerinde MacConkey agarda üreyen non-fermentatif bakterilerin tanısı; Gram boyama özellikleri, koloni morfolojileri, pigment üretimi ve oksidaz testi ile doğrulanmıştır. *P.aeruginosa* olduğu belirlenen suşlar TSA'ya ekilerek 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra saf olarak üreyen suşlar çalışılıncaya kadar %10 gliserollü brusella sıvı besiyerinde süspanse edilerek -80ºC'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Standart Suşların Muhafaza Edilmesi

Kontrol suşu olarak; *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P.aeruginosa* ATCC 47085 kullanılmıştır. Standart suşlar tedarikçi firmanın talimatları doğrultusunda sulandırılarak, stok kültürler oluşturmak üzere TSA'ya pasajlanmıştır. Üreyen mikroorganizmalar öze yardımı ile alınarak %10 gliserollü brusella sıvı besiyerinde uzun süreli saklama amacıyla -80ºC'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3-1, Şekil 3-2).



**Şekil 3-1: TSA'ya ekim yapılmış *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu.**



**Şekil 3-2: TSA'ya ekim yapılmış *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşu.**

### 3.2.4. Biyofilm Deneyleri

Biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla, 96 kuyucuklu düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ plağı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve bu plağa uygun 96 adet pegleri (çıkıntıları) içeren Nunc™ Immuno TSP Lids (Thermo Fisher Scientific, ABD) kapaktan oluşan iki parçalı bir sistem kullanılmıştır (197, 198). Bu biyofilm oluşturma yöntemi, kuyucuklarda inkübe edilen planktonik bakterilerin, mikroplak kapağındaki peglere tutunarak biyofilm oluşumunun sağlandığı bir mikroplak sistemidir (Şekil 3-3).



**Şekil 3-3: Biyofilm oluşturulan pegleri içeren kapaklı mikroplak ve alt kısımda yer alan düz tabanlı mikroplak.**

### 3.2.4.1. Peg Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturma Yönteminin Denenmesi

Peg temelli biyofilm yönteminde mikrobiyal büyümeyi değerlendirmek için deneyin standardizasyonu amacıyla yapılması gereken üç kontrol vardır. İlk olarak, inokulumdaki hücre sayısı canlı hücre sayımı ile doğrulanmalıdır. Bu, her mikroplakta biyofilm büyümesini başlatmak için standart sayıda hücrenin kullanılmasını sağlamaktadır. İkinci olarak peg yüzeyindeki biyofilmlerde büyüyen hücre sayısı belirlenmelidir. Bu, mikroorganizmaların büyüme ortamında çoğalabildiğini doğrular, başlangıç biyofilm hücre yoğunluğu ve kapaklardaki peglerde tutarlı sayıda mikroorganizma bulunmasını sağlamaktadır. Ek olarak, inokulumda veya peg kapağında canlı bir kontaminant varsa, bu, büyüme kontrolleri için kullanılan besiyerlerinde üreyen kontamine koloniler ile belirlenecektir. Son olarak, cihazın farklı bölgelerinde biyofilm büyümesinin eşdeğer olup olmadığını belirlenmek için plağın tamamında eşit biyofilm oluşumunun araştırılması gerekmektedir. Bu son kontrol, test suşu başına yalnızca bir kez gerçekleştirilmelidir ve cihaz içindeki biyofilm büyümesinde asimetri oluşmasını engellemektedir (197, 198).

### 3.2.4.2. Mikroplağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Biyofilm oluşumunun denenmesi için, biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşu kullanılmıştır. Seçici besiyerinde üreyen bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri ve antimikrobiyal duyarlılıkları etkilenebileceğinden, TSA besiyerine pasajlanan standart suş, 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Steril tüpler içerisinde steril serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar, McFarland Densitometre (Biosan Den-1) cihazına göre kontrol edilmiştir. Hazırlanmış süspansiyondan 0,5 ml çekilerek, 14,5 ml TSB besiyeri içeren tüpe inoküle edilerek 1/30 dilüsyon yapılmıştır. Bu tüpten 150 µl alınarak, 96 kuyucuklu steril düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ mikroplağına ilk sütun hariç diğer tüm kuyucuklarına *P.aeruginosa* ATCC 47085 inoküle edilmiştir. Sterilite kontrol kuyucuğu olarak, ilk sütuna bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri konulmuştur. İleri ki aşamalarda biyofilm canlı hücre sayısını belirlemek için bu şekilde 2 adet mikroplak hazırlanmıştır. Sonraki basamaklarda çalkalama işleminin uygulanacak olmasından ötürü 150 µl'lik hacim kullanılmıştır, ayrıca bu hacim peg yüzeylerinde büyüyen biyofilmlerin deney protokolünün sonraki aşamalarında hazırlanan yıkama ve antimikrobiyal içeren mikroplaklara tamamen daldırılmasını sağlamaktadır (197, 198). Deneyde kullanılan

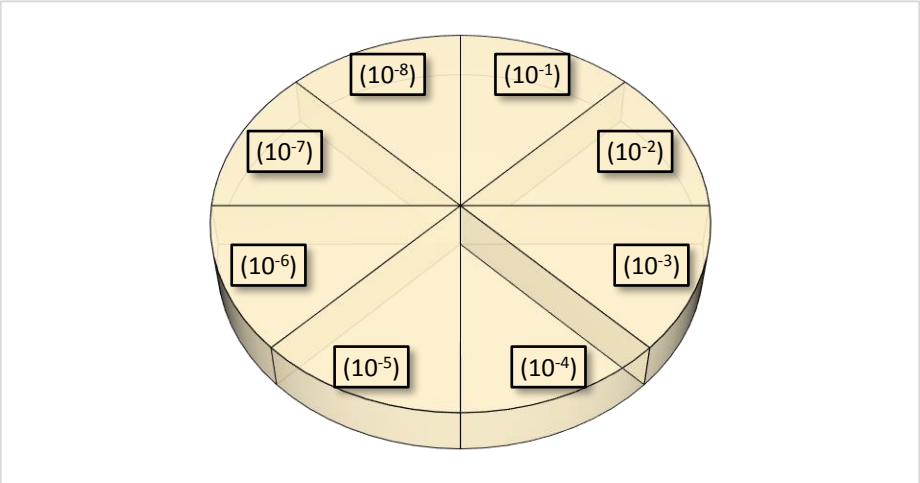
mikroplakların, kapakları alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak için saklanmıştır. Mikroplak kapağı olarak, biyofilmin oluşturulacağı 96 adet pegleri içeren Nunc™ Immuno TSP kapaklar kapatılarak etrafı parafilmle sarılmıştır. Mikroplaklar, 37°C'de aerobik ortamda, 115 rpm'de orbital çalkalamalı etüvde (Heidolph, Germany) 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3-4).



**Şekil 3-4: Çalkalamalı etüvde inkübasyon aşaması.**

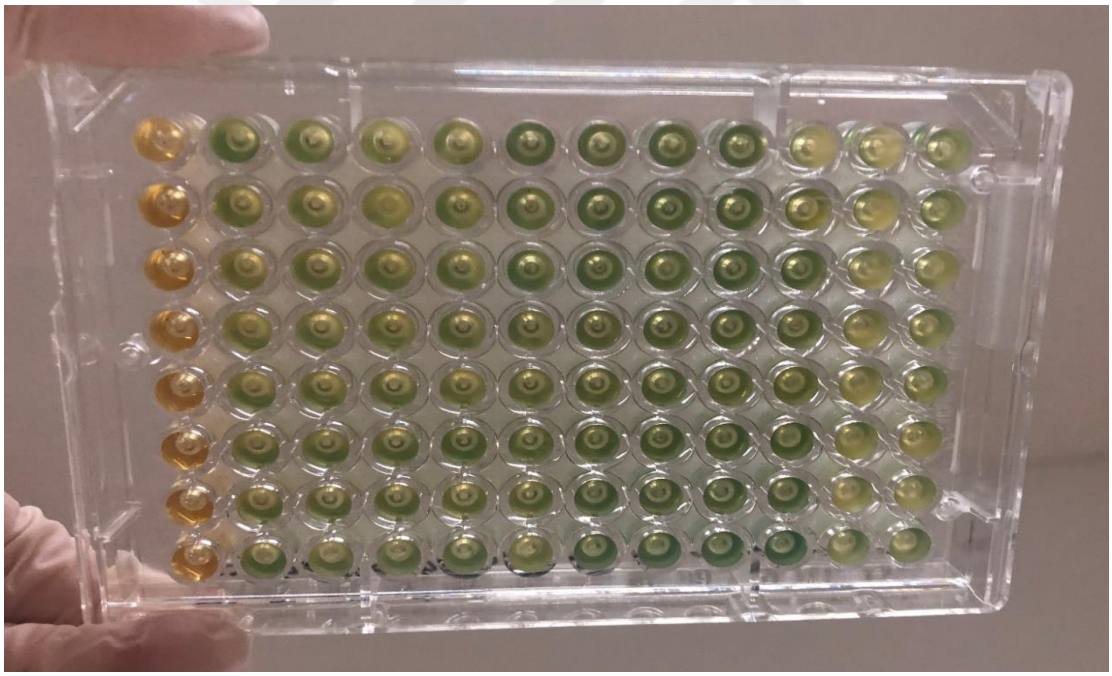
**İnokulüm Canlı Hücre Sayımı:** Yeni 96 kuyucuklu steril düz tabanlı bir mikroplak açılarak içine A satırından H satırına kadar ilk sütuna 180 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Böylelikle, $10^{-1}$ ile $10^{-8}$ arasında dilüsyonlar elde edilecektir. Başlangıçtaki bakteri miktarını kontrol etmek amacıyla 1/30 dilüsyonu yapılmış süspansiyondan 20 µl alınarak mikroplağın A satırı ilk kuyucuğundaki 180 µl serum fizyolojiğin üzerine ilave edilmiştir. Çok kanallı otomatik pipet ile A satırının ilk kuyucuğundan H satırının son kuyucuğuna kadar dilüsyonlar yapılmıştır. Her dilüsyonun sonunda, pipet ucu atılmış steril yeni uç takılarak dilüsyon hatalarını en aza indirmek hedeflenmiştir. $10^{-8}$'lik dilüsyonları içeren son kuyucuklardan çekilen süspansiyon tıbbi atık kutusuna atılmıştır.

Dilüsyonun ardından, TSA besiyeri sekize bölünerek $10^{-1}$'den $10^{-8}$'e kadar numaralandırılmış, dilüsyon yapılan kuyucuklardan 10'ar µl süspansiyon inoküle edilmiştir (Şekil 3-5). Her suş için 1 TSA petri kutusu kullanılmıştır. Spot ekim yapılmış TSA plağı, 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılmıştır. Sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı belirlenmiştir (6, 197, 198).




**Şekil 3-5: TSA spot ekim plak örneği.**

Çalkalamalı etüvde inkübasyon aşamasından sonra mikroplaktaki bulanıklık, şekil 3-6'da gösterilmiştir.



**Şekil 3-6: Çalkalamalı etüvde inkübasyon aşaması sonrası mikroplağın ve kapağın alttan görüntüsü.**

Çalkalamalı etüvdeki inkübasyon aşamasından sonra, kristal viyole ile boyama aşamasına geçmek için ayrı bir 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplak yıkama plağı olarak hazırlanmıştır. İnokulumların denk geldiği A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Biyofilm oluşturulmuş mikroplak kapağı aseptik şartlarda kaldırılarak yıkama plağı üzerine kapatılmıştır ve bir dakika oda

sıcaklığında yıkama yapılmıştır. Bu yıkama aşaması ile peglerdeki planktonik hücrelerin uzaklaştırılarak sadece peglere tutunan bakterilerin kalması amaçlanmıştır (197, 198).

Peg üzerindeki biyofilmin boyanarak görsel olarak belirlenmesi amacıyla kullanılan kristal viyole çözeltisinde minör modifikasyonlar yapılmıştır (233). 50 ml'lik steril bir falkon tüpte %0,1'lik kristal viyole çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrı bir mikroplak aseptik şartlarda açılarak A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden konulmuştur. Yıkama plağından aseptik şartlarda alınan pegleri içeren mikroplak kapağı, boya çözeltisi olan mikroplağa kapatılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.

Yeni 96 kuyucuklu steril düz tabanlı bir mikroplak açılarak, içine A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek kristal viyole boyasını yıkamak amacıyla yıkama plağı hazırlanmıştır. Boyada bekletilen pegli mikroplak kapağı bu mikroplağa kapatılmıştır. Beş dakikalık oda sıcaklığında yıkama işleminden sonra, pegli mikroplak kapağı görsel olarak incelenmiştir.

**Biyofilm Canlı Hücre Sayımı:** Çalkalamalı etüvdeki inkübasyon aşamasından sonra yeni 96 kuyucuklu steril düz tabanlı bir mikroplak açılarak, içine A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik konularak bir yıkama plağı hazırlanmıştır. Yıkama plağının kapağı alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak için saklanmıştır. Biyofilm oluşturulmuş pegleri içeren 2. mikroplak kapağı, yıkama plağına kapatılarak bir dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Eş zamanlı olarak, başka bir mikroplakta A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri eklenmiştir. Yıkama işlemininden sonra, pegleri içeren mikroplak kapağı kaldırılarak TSB besiyeri içeren mikroplağa kapatılmıştır. Etrafı parafilmle sarılarak, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda (Branson, ABD) sonikasyon aşaması yapılmıştır. Ultrasonik banyo, üreticinin önerileri doğrultusunda musluk suyu ile doldurularak mikroplağın bulunduğu çelik tepsi içerisine konulmuştur. Suyun yüksekliği çelik tepsi içerisindeki mikroplağın, su seviyesinin altında kalacak şekilde ayarlanmıştır. Ultrasonik banyoda geçen süreyi uzatmanın özellikle antimikrobiyal duyarlılık testi aşamasında hücre hasarına sebep olabileceği belirtilmiştir. Peglerde oluşmuş biyofilmin hücre yıkımı en aza indirilerek TSB besiyerine aktarılması amaçlanmıştır (6, 197, 198). Şekil 3-7'de ultrasonik banyoda sonikasyon aşaması gösterilmiştir.




**Şekil 3-7: Ultrasonik banyoda sonikasyon aşaması.**

Mikroplak ultrasonik banyoda işlem görürken, yeni 96 kuyucuklu steril düz tabanlı bir mikroplak açılarak içine A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 180 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Sonikasyon aşamasının ardından, biyofilmdeki canlı hücre sayısını kontrol etmek amacıyla her suş için ilgili kuyucuktan biyofilmin döküldüğü mikroorganizmaları içeren süspansiyondan 20 µl alınarak mikroplağın A satırı ilk kuyucuğundaki 180 µl serum fizyolojiğin üzerine ilave edilmiştir. Çok kanallı otomatik pipet ile A satırının ilk kuyucuğundan H satırının son kuyucuğuna kadar dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Dilüsyon mikroplak örneği tablo 3-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-1: Dilüsyon mikroplak örneği**

| | | 1 ATCC 47085 | 2 ATCC 47085 | 3 ATCC 47085 | 4 ATCC 47085 | 5 ATCC 47085 | 6 ATCC 47085 | 7 ATCC 47085 | 8 ATCC 47085 | 9 ATCC 47085 | 10 ATCC 47085 | 11 ATCC 47085 | 12 ATCC 47085 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 µl | A | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ | 180 µl $10^{-1}$ |
| 20 µl | B | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ | 180 µl $10^{-2}$ |
| 20 µl | C | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ | 180 µl $10^{-3}$ |
| 20 µl | D | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ | 180 µl $10^{-4}$ |
| 20 µl | E | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ | 180 µl $10^{-5}$ |
| 20 µl | F | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ | 180 µl $10^{-6}$ |
| 20 µl | G | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ | 180 µl $10^{-7}$ |
| 20 µl | H | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ | 180 µl $10^{-8}$ |

Dilüsyonun ardından, TSA besiyerleri sekize bölünerek $10^{-1}$'den $10^{-8}$'e kadar numaralandırılmış, dilüsyon yapılan kuyucuklardan 10'ar µl süspansiyon inoküle edilmiştir. Spot ekim yapılmış TSA plakları, 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılmıştır. Sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı belirlenerek, standart hesaplamalar ile peg başına düşen canlı hücre sayısı (viable cell count - VCC) hesaplanmıştır. A'dan H'a kadar olan tüm satırlar arasında biyofilm oluşumu açısından farklılık olup olmadığının araştırılması amacıyla, *P.aeruginosa* ATCC 47085'in VCC değerleri ve satırlara ait ortalama VCC (MVCC) değerleri hesaplanarak, elde edilen veriler SPSS 21 (IBM, ABD) programı ile tek yönlü varyans analizi (tek yönlü-ANOVA) testiyle istatistiksel olarak analiz edilmiştir (6, 197, 198).

### 3.2.4.3. *P.aeruginosa* Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Peg temelli biyofilm yönteminin standardize edilmesinden sonra, KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşumunun belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. *P.aeruginosa* suşları çalışmaya başlanmadan önce -80°C'den TSA'ya aseptik şartlar altında tek koloni düşürme yöntemi ile pasajlanarak, 37°C' de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Suşların canlılıkları ve kontamine olup olmadıkları kontrol edildikten sonra ikinci kez TSA'ya pasajlanıp, ertesi gün çalışmaya alınmıştır. Toplam 139 adet suştan 29 adet suş canlılıklarını yitirdiği için çalışmadan çıkartılmıştır. Farklı zamanlarda gerçekleştirilen deneylerde, kontrol suşu olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları kullanılmıştır. Her bir suş için steril tüpler içerisinde steril serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar, McFarland Densitometre cihazına göre kontrol edilmiştir. Hazırlanmış süspansiyondan 0,1 ml çekilerek, her bir suş için 2,9 ml TSB besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek 1/30 dilüsyon yapılmıştır. Bu tüplerden 150 µl alınarak, 96 kuyucuklu steril düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ mikroplağına inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Sterilite kontrol kuyucuğu olarak ilk sütuna bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri inoküle edilmiştir. Deneyde kullanılan mikroplakların, kapakları alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak için saklanmıştır. Mikroplak kapağı olarak, biyofilmin oluşturulacağı 96 adet pegleri içeren Nunc™ Immuno TSP kapaklar kapatılarak etrafı parafilmle sarılmıştır. Mikroplak, 37°C'de aerobik ortamda, 115 rpm'de orbital çalkalamalı etüvde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon aşamasından sonra kristal viyole ile boyama aşamasına geçmek için ayrı bir 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplak yıkama plağı olarak hazırlanmıştır. İnokulumların denk geldiği A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Biyofilm oluşturulmuş mikroplak kapağı aseptik şartlarda kaldırılarak yıkama plağı üzerine kapatılmıştır ve bir dakika oda sıcaklığında yıkama yapılmıştır. Ayrı bir mikroplak aseptik şartlarda açılarak A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden eklenmiştir. Yıkama plağından aseptik şartlarda alınan pegleri içeren mikroplak kapağı, boya çözeltisi olan mikroplağa kapatılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Yeni 96 kuyucuklu steril düz tabanlı bir mikroplak açılarak, içine A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek kristal viyole boyasını yıkamak amacıyla yıkama plağı hazırlanmıştır. Boyada bekletilen pegli mikroplak kapağı bu mikroplağa kapatılmıştır. Beş dakikalık oda sıcaklığında yıkama işleminden sonra, pegli mikroplak kapağı görsel olarak incelenmiştir. Biyofilm oluşturduğu belirlenen suşlar antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarına alınmıştır.

### 3.2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal ilaçlar, KF antibiyotik tedavisinde kullanım sıklıklarına göre seçilmiştir. Ayrıca, antibiyotik seçiminde henüz Türkiye'de tedavide kullanılmasa da, KF için tedavide kullanılan antibiyotiklere de yer verilmiştir.

#### 3.2.5.1. Antimikrobiyal İlaçlar

Antimikrobiyal ilaçlar, üretici ilaç firmalarından temin edilmiştir. İlaç hammadde tozlar; İlacın jenerik adını, seri numarasını, potensini ve son kullanma tarihini içermektedir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, antibiyotik tozları -20ºC/4ºC-8ºC'de desikatör içerisinde saklanmıştır.

#### 3.2.5.2. Antimikrobiyal Tozların Tartılması

Antimikrobiyal tozlar, aşağıdaki formül kullanılarak kalibre edilmiş hassas terazide tartılmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon (µg/ml)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

### 3.2.5.3. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Antibiyotik stok çözeltileri, test edilecek konsantrasyondan en az 10 kat fazla veya en az 1000 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Steril stok çözeltiler steril eppendorflarda -80°C'de muhafaza edilmiştir. Meropenem ve seftazidim günlük olarak hazırlanmıştır. Antibiyotiklerin stok konsantrasyondaki çözeltileri CLSI rehberinde yer alan uygun sulandırıcılar kullanılarak hazırlanmıştır (Tablo 3-2) **(234).**

**Tablo 3-2: Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar.**

| Antibiyotik | Çözücü | Sulandırıcı |
|---|---|---|
| **Seftazidim** | Sodyum karbonat[a] | Su |
| **Meropenem** | Su | Su |
| **Aztreonam** | Doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi | Su |
| **Siprofloksasin** | Su | Su |
| **Levofloksasin** | ½ hacim su, sonra eriyene kadar 0,1 mol/L NaOH damlatılır | Su |
| **Amikasin** | Su | Su |
| **Gentamisin** | Su | Su |
| **Tobramisin** | Su | Su |
| **Azitromisin** | %95 etanol veya glasiyal asetik asit[b,c] | Buyyon besiyeri |
| **Kolistin**[d] | Su | Su |

a. Seftazidim için anhidröz sodyum karbonat, kullanılacak seftazidimin tam %10'u ağırlığında kullanılır.

b. Bu bileşikler toksik olabilir. Bu maddelerden herhangi biri kullanılmadan önce üreticinin sağladığı güvenlik broşürleri (MSDS) incelenmelidir.

c. 1/2 hacim suya 2,5 µL/mL'yi geçmeyecek şekilde eriyene kadar glasiyal asetik asit damlatılır.

d. Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan kolistinin formülü kolistin metan sulfonat (sülfometat) değil kolistin sülfattır.

Sodyum karbonat, gereken suyun bir bölümü içinde eritilir. Antibiyotik bu sodyum karbonat çözeltisinde çözünür ve istenen hacime kadar su eklenir. Bu çözelti en kısa sürede kullanılmalıdır, fakat 25°C'yi aşmayan sıcaklıkta 6 saat saklanabilir.

Antimikrobiyal maddelerin stok solüsyonlardan sulandırımları, tablo 3-3'teki şemaya göre hazırlanmıştır (235).

**Tablo 3-3: Antibiyotik sulandırım tablosu.**

| Antimikrobik Çözelti | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Adım** | **Konsantrasyon (µg/ml)** | **Kaynak** | **Hacim[a] (ml)** | **+ CAMHB[b] Hacim[a] (ml) =** | **Son Konsantrasyon (µg/ml)** | **$Log_2$** |
| **1** | 5120 | Stok | 1 | 9 | 512 | 9 |
| **2** | 512 | Adım 1 | 1 | 1 | 256 | 8 |
| **3** | 512 | Adım 1 | 1 | 3 | 128 | 7 |
| **4** | 512 | Adım 1 | 1 | 7 | 64 | 6 |
| **5** | 64 | Adım 4 | 1 | 1 | 32 | 5 |
| **6** | 64 | Adım 4 | 1 | 3 | 16 | 4 |
| **7** | 64 | Adım 4 | 1 | 7 | 8 | 3 |
| **8** | 8 | Adım 7 | 1 | 1 | 4 | 2 |
| **9** | 8 | Adım 7 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| **10** | 8 | Adım 7 | 1 | 7 | 1 | 0 |
| **11** | 1 | Adım 10 | 1 | 1 | 0,5 | -1 |
| **12** | 1 | Adım 10 | 1 | 3 | 0,25 | -2 |
| **13** | 1 | Adım 10 | 1 | 7 | 0,125 | -3 |

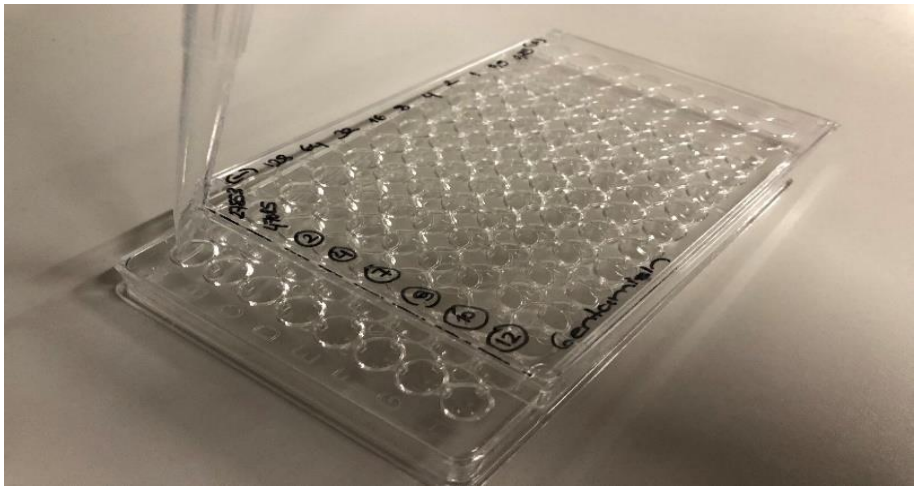
a. Yapılacak test sayısına bağlı olarak, seçilecek hacimler bu rakamların herhangi bir katı olabilir.
b. Eğer gerekliyse, katyon ayarlama bu adımdan önce yapılır.

### 3.2.5.4. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılacak Besiyerinin Hazırlanması

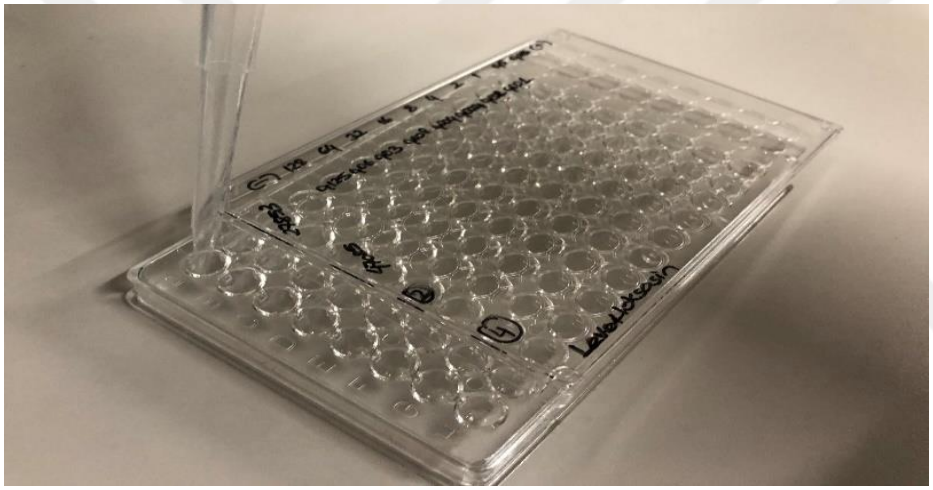
Sıvı dilüsyon testlerinde rutin olarak seçilecek besiyeri katyonu ayarlanmış Mueller-Hinton Broth (KA-MHB)'tur (236). Ticari olarak satılan hazır KA-MHB (Or-Bak, Türkiye) besiyeri sıvı mikrodilüsyon duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

### 3.2.5.5. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde antimikrobiyal duyarlılık testleri 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplaklarda yapılmıştır. Hangi konsantrasyondan başlanmak isteniyorsa antibiyotik konsantrasyonunun iki kat üst konsantrasyonu, örneğin; 128 µg/ml'den başlaması isteniyorsa 256 µg/ml konsantrasyon hazırlanmıştır (Tablo 3-4). Her satırdaki suş için ilk kuyucuk sterilite kontrol, son kuyucuk üreme kontrol olarak çalışılmıştır. Mikroplağın, her satırındaki geri kalan kuyucuklara 100 µl KA-MHB konulmuştur. Her deneyde *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve ATCC 47085 suşları çalışmaya dahil edilmiştir. İlk kuyucuğa 100 µl antibiyotik solüsyonu konularak, çok kanallı otomatik pipet ile, en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan kuyucuklardan pipetaj yapılarak 100 µl'lik seri dilüsyonlar ile istenilen konsantrasyonlar hazırlanmıştır (en son 100 µl tıbbi atık kutusuna atılmıştır). Kuyucuklardaki son hacim 100 µl olacak şekilde belirlenmiştir (Şekil 3-8, Şekil 3-9).



**Şekil 3-8: Steril U tabanlı mikroplaklar**
**(128-0,25 µg/ml gentamisin mikroplak örneği).**



**Şekil 3-9: Steril U tabanlı mikroplaklar**
**(128-0,001 µg/ml levofloksasin mikroplak örneği).**

**Tablo 3-4: Çalışılan MİK aralıkları.**

| Antibiyotik Adı | MİK Aralığı (µg/ml ) |
|---|---|
| Seftazidim | 0,001 - 128 |
| Meropenem | 0,25 - 128 |
| Aztreonam | 0,001 - 128 |
| Siprofloksasin | 0,001 - 128 |
| Levofloksasin | 0,001 - 128 |
| Amikasin | 0,25 - 128 |
| Gentamisin | 0,25 - 128 |
| Tobramisin | 0,25 - 128 |
| Azitromisin | 0,001 - 128 |
| Kolistin | 0,25 - 128 |

### 3.2.5.6. İnokülumun Hazırlanması, İnokülasyon ve İnkübasyon

Biyofilm oluşturduğu belirlenen suşlar antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarına alınmıştır. TSA'da tek düşmüş koloniler seçilerek steril serum fizyolojik ile 0,5 McFarland'a ($1x10^8$ KOB/ml) eşit türbiditede bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. En geç 15 dakika içinde inokülum hazırlandıktan sonra ve inokülasyon sonunda her kuyucukta $5x10^5$ CFU/ml olacak şekilde steril serum fizyolojik ile sulandırım yapılmıştır. Bu amaçla, kuyucuktaki hacim 100 µl olduğundan 0,5 McFarland süspansiyonu ($1x10^8$ KOB/ml) 1/20 ($5x10^6$ CFU/ml) steril serum fizyolojik ile dilüe edilerek, sterilite kontrol kuyucukları haricindeki her kuyucuğa çok kanallı otomatik pipet ile 10 µl bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Böylece, bir kuyucuktaki 100 µl antibiyotik kombinasyonu solüsyonu içindeki bakteri sayısı $5x10^5$ CFU/ml veya mikrodilüsyon yönteminde $5x10^4$ CFU/kuyucuk olmaktadır. Kurumayı önlemek için mikroplakların kapakları kapatılarak, etrafları parafilmle sarılmış ve 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir (236).

### 3.2.5.7. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

İnkübasyon aşamasından sonra mikroplaklar optik okuyucuda (ELx™ 800 BİOTEK, USA) 650 nm dalga boyunda okutulmuş ve gözle değerlendirilmiştir. Mikroorganizmanın kuyucuklardaki üremesini inhibe eden en son antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak yorumlanmıştır. EUCAST klinik sınır değerleri doğrultusunda *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve izole edilen suşların MİK değer aralıklarının uygunluğu değerlendirilmiştir (Tablo 3-5, Tablo 3-6). Deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Tüm suşlara ait $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri belirlenmiştir.

**Tablo 3-5: *P.aeruginosa* ATCC 27853 için kabul edilebilir MİK sınır değerleri (87).**

| | MİK Sınır Değeri (mg/L) | |
|---|---|---|
| **Antimikrobik Madde** | **Hedef** | **Aralık** |
| **Seftazidim** | 2 | 1-4 |
| **Meropenem** | 0,25-0,5 | 0,125-1 |
| **Aztreonam** | 4 | 2-8 |
| **Siprofloksasin** | 0,25-0,5 | 0,125-1 |
| **Levofloksasin** | 1-2 | 0,5-4 |
| **Amikasin** | 2 | 1-4 |
| **Gentamisin** | 1 | 0,5-2 |
| **Tobramisin** | 0,5 | 0,25-1 |
| **Azitromisin** | - | - |
| **Kolistin** | 1-2 | 0,5-4 |

**Tablo 3-6: *P.aeruginosa*' ya ait MİK değerleri (87).**

| | MİK Sınır Değeri (mg/L) | |
|---|---|---|
| **Antimikrobik Madde** | **S ≤** | **R >** |
| **Seftazidim** | ≤ 0,001 | > 8 |
| **Meropenem** | ≤ 2 | > 8 |
| **Aztreonam** | ≤ 0,001 | > 16 |
| **Siprofloksasin** | ≤ 0,001 | > 0,5 |
| **Levofloksasin** | ≤ 0,001 | > 1 |
| **Amikasin** | ≤ 16 | > 16 |
| **Gentamisin**** | IE | IE |
| **Tobramisin** | ≤ 2 | > 2 |
| **Azitromisin*** | - | - |
| **Kolistin** | ≤ 2 | > 2 |

R: Resistant (Dirençli), S: Sensitive (Duyarlı)
*EUCAST ve CLSI kılavuzlarında *P.aeruginosa* suşları için azitromisin MİK sınır değerleri bulunmakmaktadır.
**EUCAST ve CLSI kılavuzlarında *P.aeruginosa* suşları için gentamisin MİK sınır değerleri olmadığından, EUCAST kriterleri uyarınca organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt olmadığını gösterir. Yorum içeren ancak beraberinde S, I veya R kategorizasyonu olmayan bir MİK rapor edilebilir.

### 3.2.6. MBEK Değerlerinin Belirlenmesi

#### 3.2.6.1. İnokülumun Hazırlanması, İnokülasyon ve İnkübasyon

Biyofilm oluşturduğu belirlenen suşlar MBEK değerlerinin belirlenmesi amacıyla çalışmalara alınmıştır. TSA'da tek düşmüş koloniler seçilerek steril serum fizyolojik ile 0,5 McFarland'a ($1x10^8$ KOB/ml) eşit türbiditede bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 1 ml alınarak, her bir suş için 29 ml TSB besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiştir. Bu tüplerden 150 µl alınarak, 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplağa inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Her deneyde *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve ATCC 47085 suşları çalışmaya alınmıştır. Her satırdaki suş için ilk kuyucuk sterilite kontrol, son kuyucuk üreme kontrol olarak çalışılmıştır. Deneyde kullanılan mikroplakların, kapakları alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak için saklanmıştır. Mikroplak kapağı olarak, biyofilmin oluşturulacağı 96 adet pegleri içeren kapaklar kapatılarak etrafı parafilmle sarılmıştır. Mikroplak, 37°C'de aerobik ortamda, 115 rpm'de orbital çalkalamalı etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasından sonra ayrı bir 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplak olarak yıkama plağı hazırlanmıştır. İnokulumların denk geldiği A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara

200 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Biyofilm oluşturulmuş mikroplak kapağı aseptik şartlarda kaldırılarak yıkama plağı üzerine kapatılmıştır ve bir dakika oda sıcaklığında yıkama yapılmıştır.

### 3.2.6.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi İçin Antibiyotik Seri Sulandırım Yapılmış Plağın Hazırlanması

Antibiyotik stok çözeltileri MİK belirleme yöntemiyle aynı şekilde hazırlanmıştır. MİK belirleme için gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyondan farklı olarak kuyucuktaki son hacim 200 µl olacak şekilde eklenmiştir (197, 198). Her deneyde *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve ATCC 47085 suşları çalışmaya alınmıştır. Suşlar için çalışılan MBEK aralıkları, tablo 3-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-7: Çalışılan MBEK aralıkları.**

| Antibiyotik Adı | MBEK Aralığı (µg/ml ) |
|---|---|
| **Seftazidim** | 2 - 1024 |
| **Meropenem** | 2 - 1024 |
| **Aztreonam** | 2 - 1024 |
| **Siprofloksasin** | 0,016 - 1024 |
| **Levofloksasin** | 2 - 1024 |
| **Amikasin** | 0,5 - 1024 |
| **Gentamisin** | 0,5 - 1024 |
| **Tobramisin** | 0,5 - 1024 |
| **Azitromisin** | 2 - 1024 |
| **Kolistin** | 2 - 1024 |

Eş zamanlı olarak, başka bir mikroplak serisinde, her satırdaki suş için ilk kuyucuğa sterilite kontrol olarak 200 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. 2. sütun boş bırakılarak, 3. sütundan itibaren tüm kuyucuklara 100 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. 2. sütunun kuyucuklarına çalışılacak en yüksek antibiyotik konsantrasyonu ayarlanarak 200 µl antibiyotik içeren KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Daha sonra 3. ve 4. sütunlara çok kanallı otomatik pipet ile, çalışılacak en yüksek konsantrasyonu içeren 100 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Ardından 4. sütundan itibaren 100 µl seri dilüsyon yapılarak, en düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklardaki dilüsyondan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır. Son olarak 4. sütundan itibaren 11. sütuna kadar tüm kuyucuklara 100 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. Her satırdaki suş için son kuyucuk üreme kontrol olarak çalışılmıştır.

### 3.2.6.3. Biyofilmle Antibiyotiklerin Seri Sulandırım Yapılmış Mikroplağın Karşılaştırılması

Yıkama aşamasının ardından, biyofilm oluşmuş mikroplak kapakları kaldırılarak MBEK antibiyogram mikroplaklarının üzerine kapatılmıştır. Etrafları parafilmle sarılarak 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon aşamasından sonra ayrı bir 96 kuyucuklu steril düz tabanlı mikroplak olarak yıkama plakları hazırlanmıştır. İnokulumların denk geldiği A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik dağıtılmıştır. Yıkama plaklarının kapakları alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak için saklanmıştır. MBEK antibiyogram mikroplaklarından alınan ve antibiyotik ile inkübe edilmiş biyofilmi içeren pegli mikroplak kapakları, steril serum fizyolojik içeren yıkama plaklarına konularak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında yıkama yapılmıştır.

Eş zamanlı olarak, başka bir mikroplakta A satırından H satırına kadar tüm kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri eklenmiştir. Yıkama aşamasından sonra pegleri içeren mikroplak kapağı kaldırılarak TSB içeren mikroplağa kapatılmıştır. Etrafı parafilmle sarılarak oda sıcaklığında ultrasonik banyoda 10 dakika sonikasyon aşamasına alınmıştır. Sonikasyon aşamasından sonra, pegleri içeren mikroplak kapakları tıbbi atık kutusuna atılmış ve yerlerine önceden saklanan steril düz mikroplak kapakları kapatılmıştır. Mikroplakların etrafı parafilmle sarılarak 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir.

### 3.2.6.4. MBEK Değerlerinin Belirlenmesi

İnkübasyon aşamasından sonra, ilk 8 suşu içeren mikroplak optik okuyucuda (ELx™ 800 BİOTEK, USA) 650 nm dalga boyunda okutulmuş ve gözle değerlendirilmiştir. Arada fark olmaması ve Harrison ve ark.'nın MBEK değerlerinin görsel olarak değerlendirileceğini önermesi üzerine, sonraki deneylerde bulanıklık görsel olarak değerlendirilmiştir (197, 198). Mikroorganizmanın kuyucuklardaki üremesini eradike eden en son antibiyotik konsantrasyonu MBEK olarak yorumlanmıştır. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Tüm suşlara ait $MBEK_{50}$ ve $MBEK_{90}$ değerleri belirlenmiştir.

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

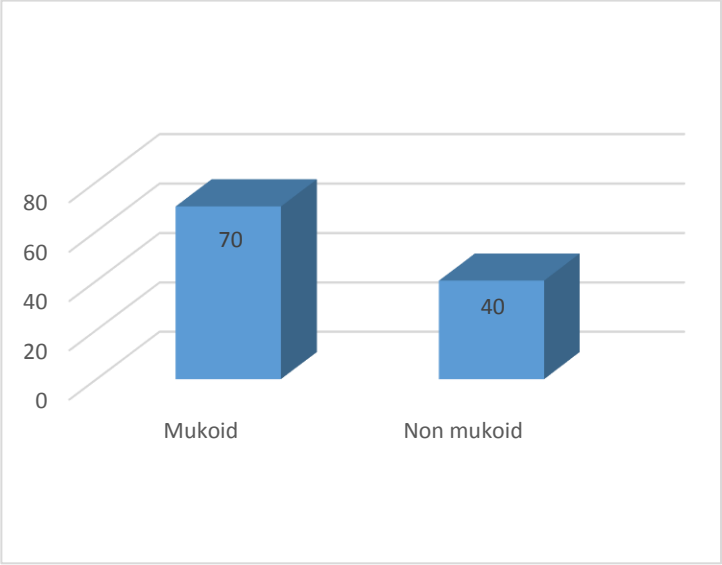
Bağımsız değişkenlerin ortalamasının karşılaştırılmasında SPSS 21 (IBM, ABD) programı ile tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA), MİK ve MBEK değerleri için karşılıklı olarak paired-two tailed t test kullanılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

# 4. BULGULAR

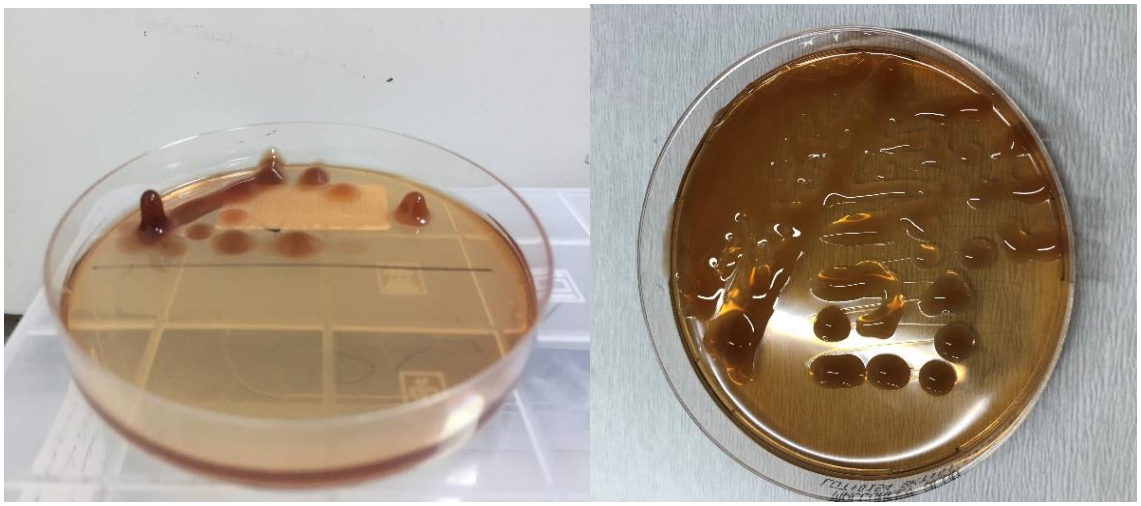
Çalışmamızda, KF'li 34 hastanın solunum yolu örneklerinden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşu; Mukoid/non-mukoid koloni yapısı, biyofilm oluşturma özelliği açısından incelenmiş, güncel tedavide kullanılan beta-laktam, aminoglikozid, makrolid, kinolon ve polimiksin grubu antibiyotiklerin önce planktonik hücrelerde antimikrobiyal duyarlılıkları araştırılarak, MİK değerleri belirlenmiş, ardından *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulduktan sonra biyofilm içindeki bakterilerde (sesil) antibiyotiklere karşı MBEK değerleri belirlenmiştir. Hastaların 19'u (%56) kız, 15'i (%44) erkek, hastaların yaşı 3 ile 23 arasında değişmektetir. Yaş ortalaması ise 14'tür.

## 4.1. *P.aeruginosa* Suşlarının Fenotipik Özellikleri

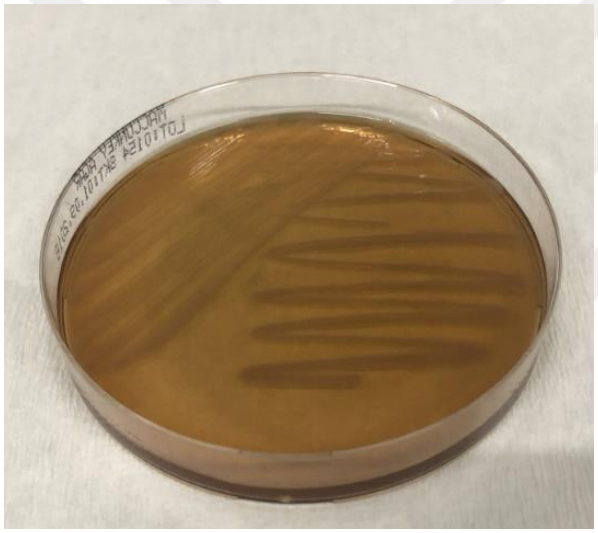
KF'li hastalardan izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşunun mukoid, non-mukoid koloni yapısı yönünden karşılaştırıldığı grafik şekil 4-1'de gösterilmiştir. 110 suşun 70'i (%64) mukoid koloni yapısında olup, non-mukoid suşlardan daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının MacConkey agara ekim yapılmış mukoid *P.aeruginosa* suşları örneği şekil 4-2'de, non-mukoid *P.aeruginosa* suşları örneği şekil 4-3'te görülmektedir.




**Şekil 4-1: *P.aeruginosa* suşlarının mukoid, non-mukoid koloni yapısına göre dağılımları.**



**Şekil 4-2: MacConkey agara ekim yapılmış mukoid *P.aeruginosa* suşları.**



**Şekil 4-3: MacConkey agara ekim yapılmış non-mukoid *P.aeruginosa* suşları.**

## 4.2. Mikroplağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi Deney Sonuçları

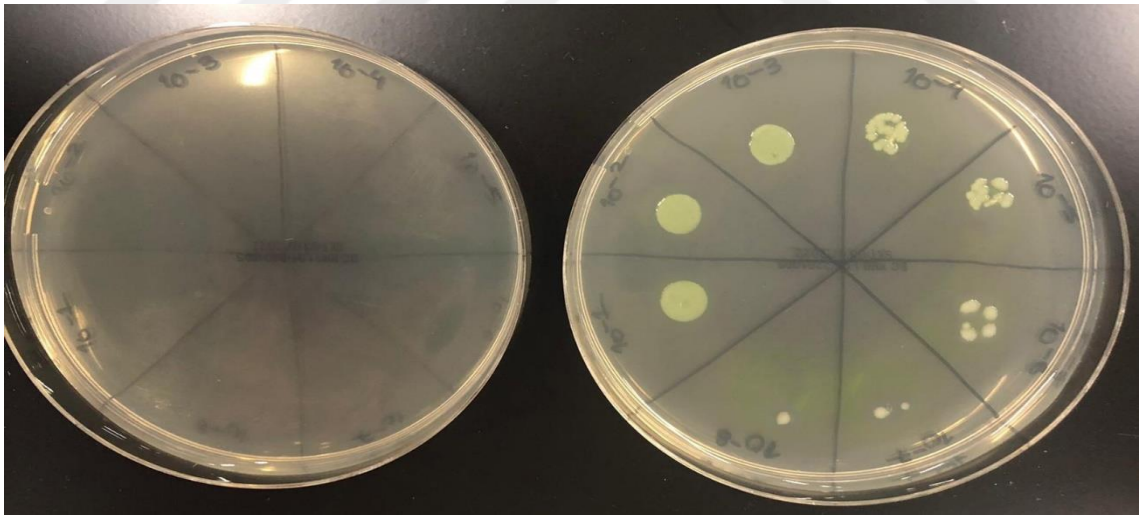
Biyofilm oluşumunun denenmesi için, biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşu 96 kuyucuklu steril düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ mikroplağına ilk sütun hariç diğer tüm kuyucuklarına inoküle edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan 1. mikroplak peg üzerinde oluşmuş biyofilmleri kristal viyole ile boyama için, 2. mikroplak biyofilm canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

**İnokulüm Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi:** Dilüsyon kuyucuklarından 10'ar µl süspansiyon inoküle edilerek spot ekim yapılmış TSA plağı, etüvde inkübe edildikten sonra sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı belirlenmiştir. VCC (viable cell count) hesaplamasında, VCC= $\log_{10}$ (hücre sayısı x dilüsyon faktörü) formülü

kullanılmıştır. Böylelikle, biyofilm oluşumu için başlangıç inokulumunun ne kadar olduğu hesaplanmıştır. Biyofilm büyümesini başlatmak için 1/30 dilüsyon yapılan 0,5 McFarland standardına göre canlı hücre sayısı $5 \times 10^6$ KOB/ml olarak belirlen inokülum çalışmanın diğer aşamalarına geçmek için uygun bulunmuştur.

Mikroplağın tamamına inoküle edilen *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşlarının peg üzerinde oluşmuş biyofilmleri kristal viyole ile gerçekleştirilen boyama sonucunda gözle görünür hale gelmiş, sterilite kontrol pegleri ise boyanmamıştır.

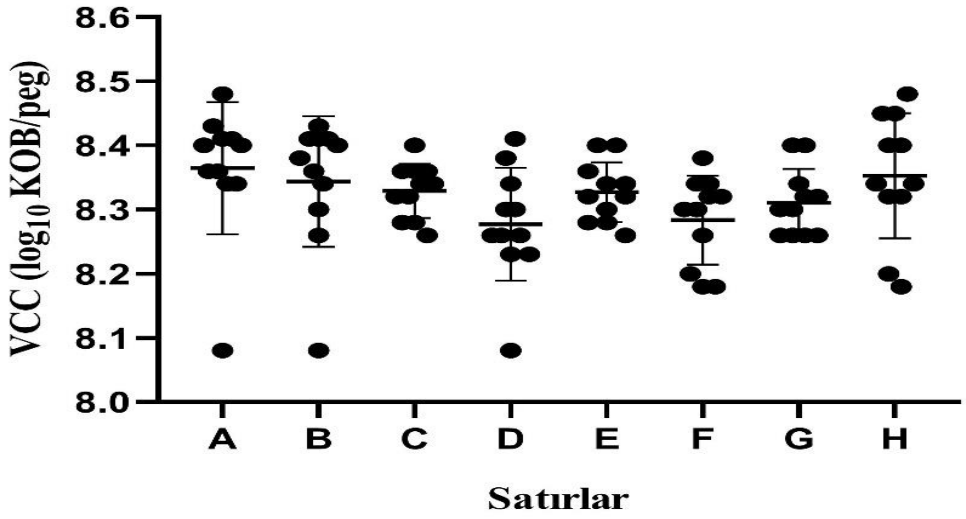
**Biyofilm Canli Hücre Sayısının Belirlenmesi:** Sonikasyon aşamasının ardından, dilüsyon kuyucuklarından 10'ar µl süspansiyon inoküle edilerek spot ekim yapılmış TSA plakları, etüvde inkübe edildikten sonra sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı sayılarak standart hesaplamalar ile peg başına düşen canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısı ile MBEK yöntemi için başlangıç inokulumunun ne kadar olacağı belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen veriler ile ortalama mean VCC (MVCC) ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. VCC hesaplamasında aynı formül kullanılmıştır. Biyofilm canlı hücre kantitasyon ekimi sonucunda elde edilen TSA ekim plağı örneği şekil 4-4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4-4: Biyofilm canlı hücre sayısının belirlenmesi.**
**A) Negatif kontrol: Steril TSB besiyeri B) Biyofilm kontrol**

Şekil 4-4'teki biyofilm canlı hücre kantitasyon ekim plağı örneği değerlendirildiğinde, sayılabilecek en düşük konsantrasyonun $10^{-4}$'lük dilüsyon olduğu belirlenmiştir. Bu dilüsyonda 18 bakteri sayılmıştır. VCC= (18 x 10.000 [$10^{-4}$'lük dilüsyon faktörü] x 10 [kuyucuktaki dilüsyon faktörü] x 100 [10 µl'lik spot ekimdeki dilüsyon faktörü]) = 8,26 $\log_{10}$ (KOB)/peg olarak hesaplanmıştır (197).

Mikroplağın tamamında eşit biyofilm oluşumunun gösterilmesi amacıyla yapılan analiz sonucunda, satırlar arasında biyofilm oluşumunda istatistiksel olarak fark olmadığı görülmüştür ($p$=0,1177). Sonuç olarak, her satırda benzer oranda biyofilm oluştuğu görülmüştür. Şekil 4-5'te satırlara ait VCC sonuçları, tablo 4-1'de satırlarda eşit biyofilm oluşumu deneyine ait veriler gösterilmiştir. İlk sütun negatif kontrol olarak çalışıldığından VCC ve MVCC değerlerine ait sonuçlar verilmemiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, 88 kuyucuk içerisinde en düşük 8,08 $\log_{10}$ KOB/peg, en yüksek 8,48 $\log_{10}$ KOB/peg bakteri elde edildiği bulunmuştur. MBEK değerlerinin belirlenmesi amacıyla başlangıç için standart bir değer bulunmamaktadır, ancak yapılan çalışmalarda benzer oranlarda bakteri ile başlanması gerektiği uygun bulunmuştur (6, 197, 198). Bu sebeple, elde edilen biyofilm miktarlarının MBEK değerlerinin belirlenmesi test çalışmaları için yeterli olduğu düşünülmüştür.



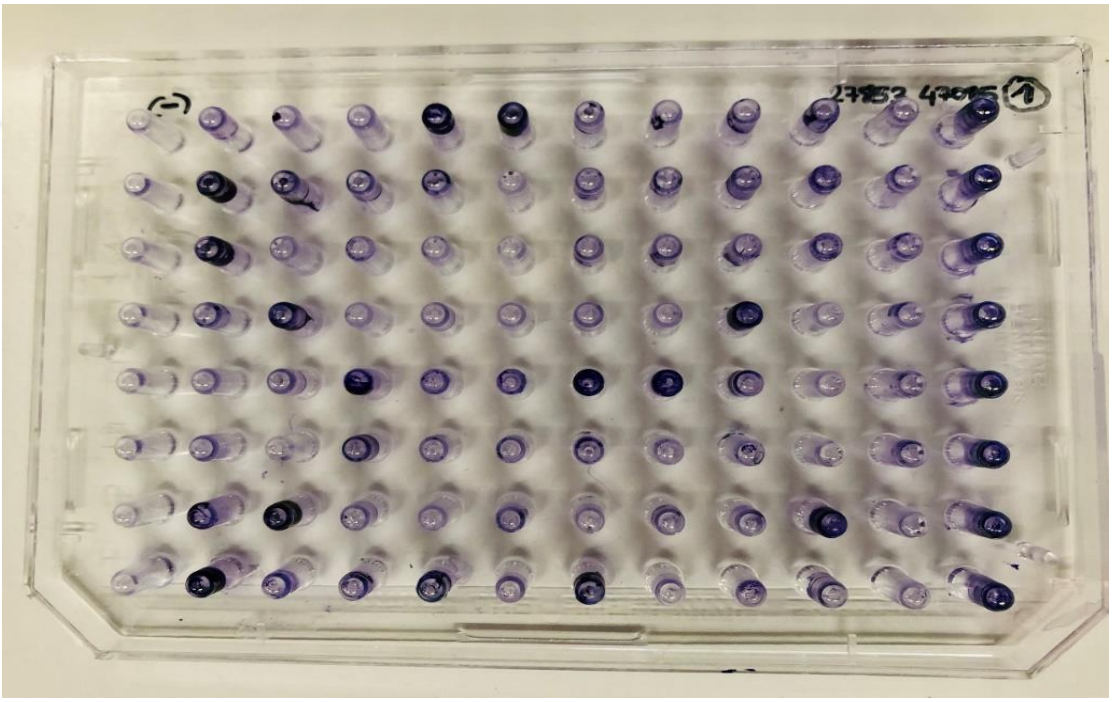

**Şekil 4-5: Satırlara ait VCC sonuçları.**

**Tablo 4-1: Satırlarda eşit biyofilm oluşumuna ait veriler.**

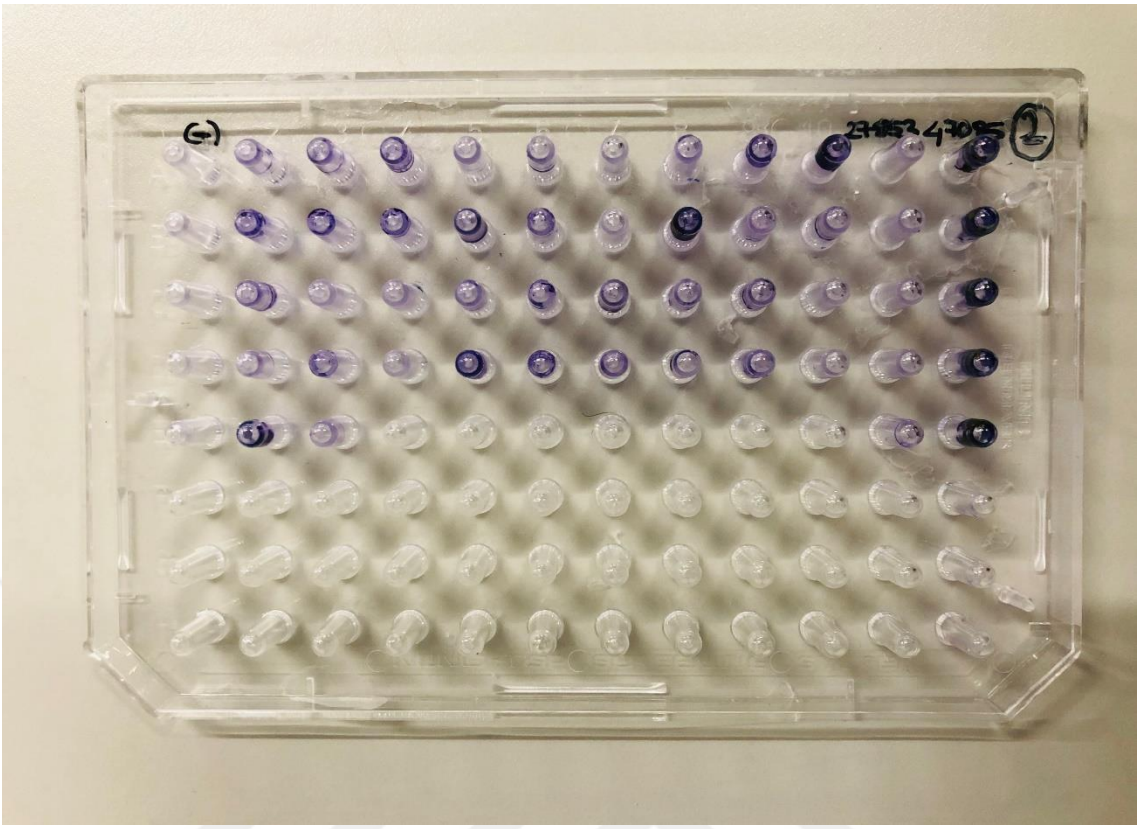
| Satır | Satır sayıları (n) | Ortalama | Standart Sapma | Standart Hata | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 11 | 8,37 | 0,10 | 0,03 | 8,08 | 8,48 |
| B | 11 | 8,34 | 0,10 | 0,03 | 8,08 | 8,43 |
| C | 11 | 8,33 | 0,04 | 0,01 | 8,26 | 8,40 |
| D | 11 | 8,28 | 0,09 | 0,03 | 8,08 | 8,41 |
| E | 11 | 8,33 | 0,04 | 0,01 | 8,26 | 8,40 |
| F | 11 | 8,28 | 0,07 | 0,02 | 8,18 | 8,38 |
| G | 11 | 8,31 | 0,05 | 0,02 | 8,26 | 8,40 |
| H | 11 | 8,35 | 0,09 | 0,03 | 8,18 | 8,48 |

### 4.3. *P.aeruginosa* Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi Deney Sonuçları

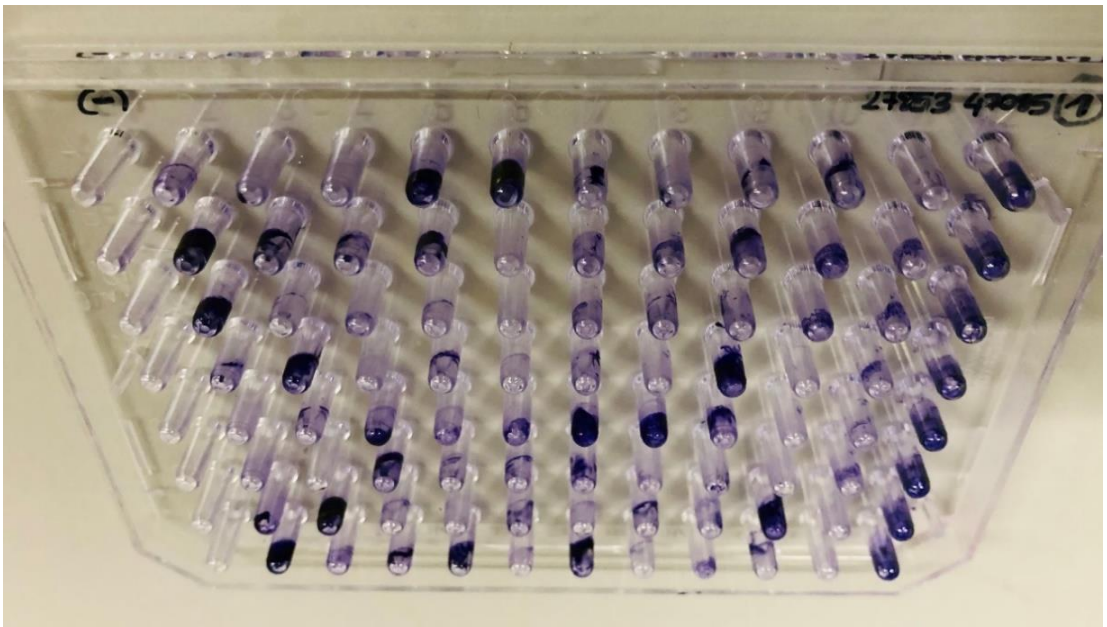
Standart *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşuyla deneyin standardizasyonu sağlandıktan sonra, KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri belirlenmiştir. 110 adet *P.aeruginosa* suşunun 92 tanesi biyofilm oluşturmuştur. Şekil 4-6 ve 4-7'de KV ile boyanmış pegleri içeren mikroplak kapağının üstten görüntüleri, şekil 4-8 ve 4-9'da peglerin yandan görüntüleri yer almaktadır. Çalışmanın antimikrobiyal duyarlılık testlerine, biyofilm oluşturan 92 suş ile devam edilmiştir.



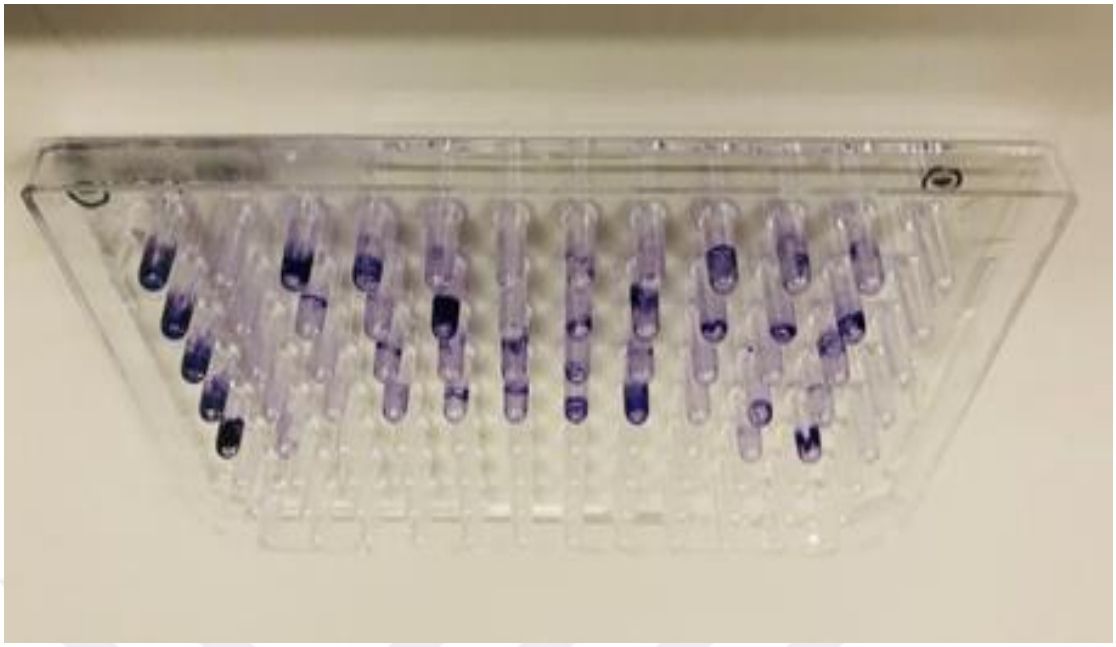
**Şekil 4-6: Kv ile boyanmış peglerin üstten görüntüsü.**
**(1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085)**



**Şekil 4-7: Kv ile boyanmış peglerin üstten görüntüsü.**
**(1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085)**

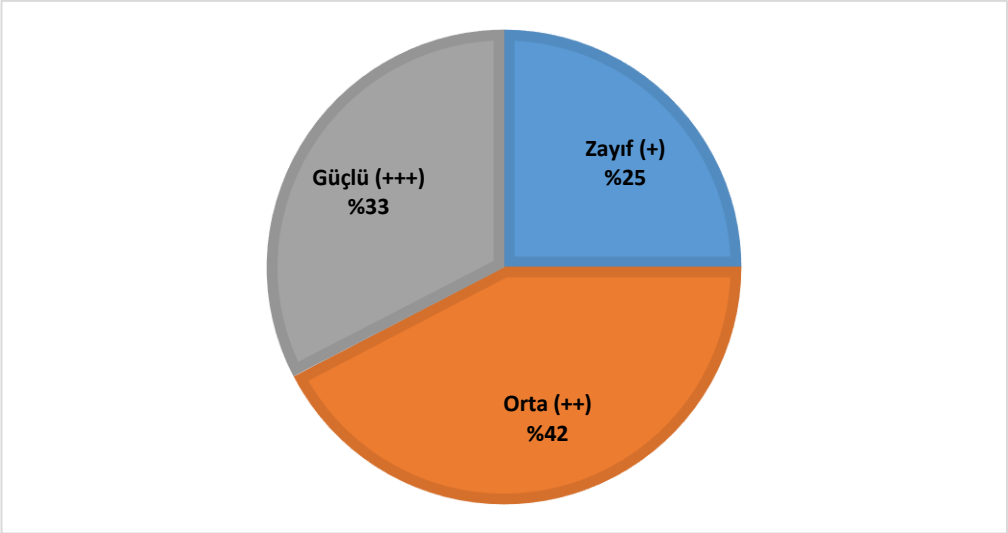


**Şekil 4-8: Kv ile boyanmış peglerin yandan görüntüsü.**
**(1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085)**



**Şekil 4-9: Kv ile boyanmış peglerin yandan görüntüsü.**
**(1.Sütun: Sterilite kontrol, sütun 2-10 klinik KF suşları, 11.sütun *P.aeruginosa* ATCC 27853, 12.sütun: Biyofilm pozitif kontrol *P.aeruginosa* 47085)**

Suşların biyofilm oluşturma dereceleri, biyofilm pozitif kontrol suşu *P.aeruginosa* ATCC 47085 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 ile değerlendirilerek; Negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak tanımlanmış ve mikroorganizmaların biyofilm oluşturma derecelerine göre yüzdeleri şekil 4-10'da gösterilmiştir.

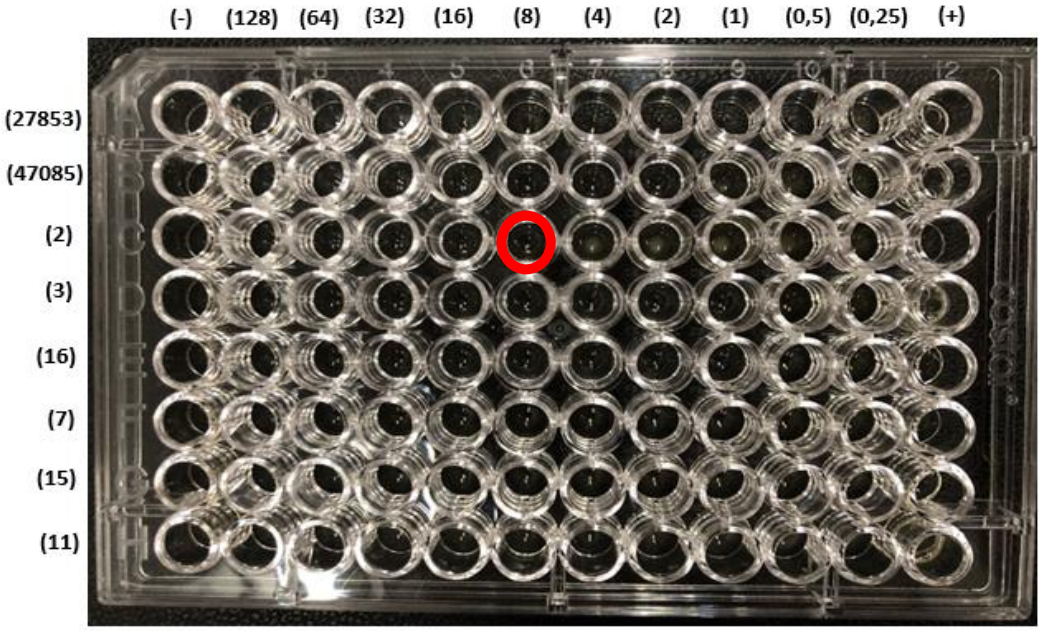



**Şekil 4-10: Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma dereceleri.**

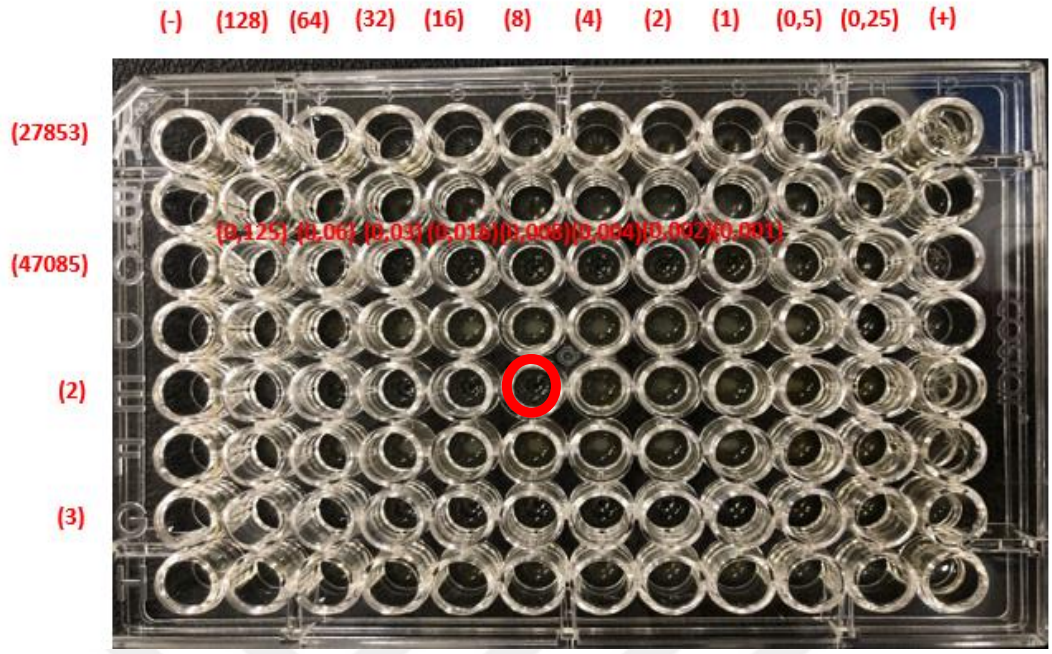
### 4.4. MİK Sonuçlarının Belirlenmesi

Peg temelli biyofilm yöntemi sonucunda biyofilm oluşturduğu tespit edilen 92 adet *P.aeruginosa* suşuna karşı seftazidim, meropenem, aztreonam, siprofloksasin, levofloksasin, amikasin, gentamisin, tobramisin, azitromisin, kolistin antibiyotiklerinin etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla MİK değerleri incelenmiştir. Kuyucuklarda üremenin gözlenmesi şekil 4-11 ve 4-12'de verilmiştir.

KF'li hastalardan izole edilen planktonik *P.aeruginosa* suşlarından sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda kolistin direnci saptanmamıştır. Seftazidim (%8), meropenem (%3), aztreonam (%28), siprofloksasin (%16), levofloksasin (%58), amikasin (%4), tobramisin direnci (%9) olarak bulunmuştur. Tablo 4-2'de MİK ve MBEK değerlerine göre dirençli suş sayıları ve yüzdeleri görülmektedir.




**Şekil 4-11: Kuyucuklarda üremenin gözlenmesi.**
**(0,25-128 µg/ml Tobramisin mikroplak örneği).**

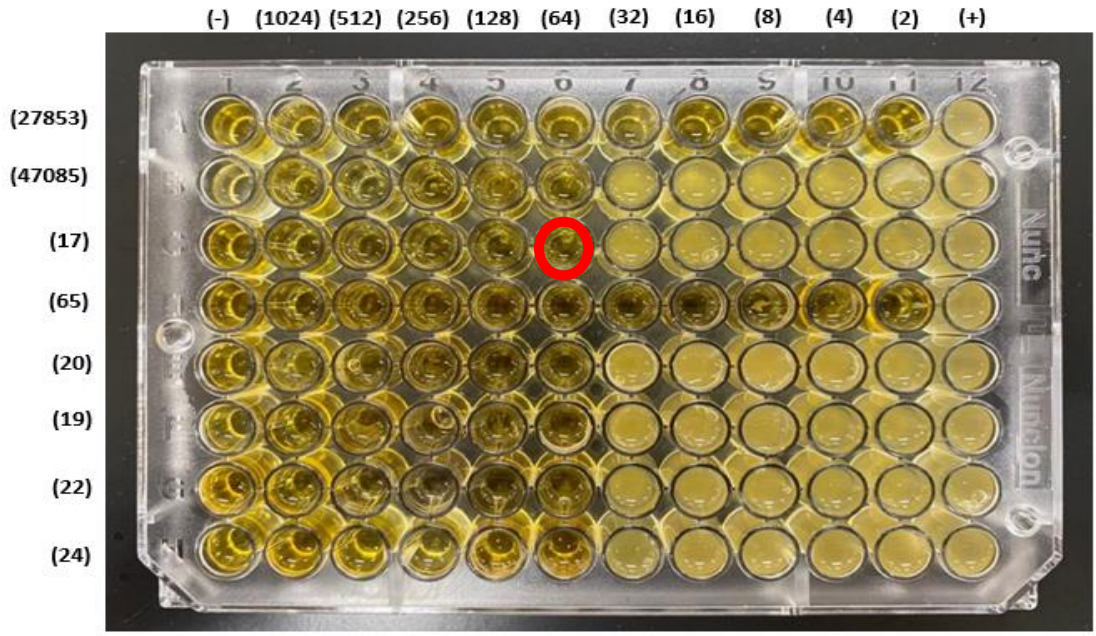



**Şekil 4-12: Kuyucuklarda üremenin gözlenmesi.**
**(0,001-128 µg/ml Levofloksasin mikroplak örneği).**

## 4.5. MBEK Sonuçlarının Belirlenmesi

Günümüzde, MBEK değer aralıklarını S, I ve R olarak belirlemek için kullanılan bir klinik sınır değer tablosu yer almamaktadır. MBEK ve MİK değerlerinin kıyaslanabilmesi için, daha önceki çalışmalarda CLSI ve EUCAST gibi komitelerin oluşturduğu antimikrobiyal duyarlılık tablolarının klinik sınır değerleri kullanılmıştır (237). Çalışmamızda, MBEK aralıklarının uygunluğu, mikroorganizmanın duyarlı veya dirençli olduğu, EUCAST MİK klinik sınır tablosuna göre değerlendirilerek sınıflandırılmıştır (87). MBEK mikroplağına ait örnek görüntü şekil 4-13'te verilmiştir.

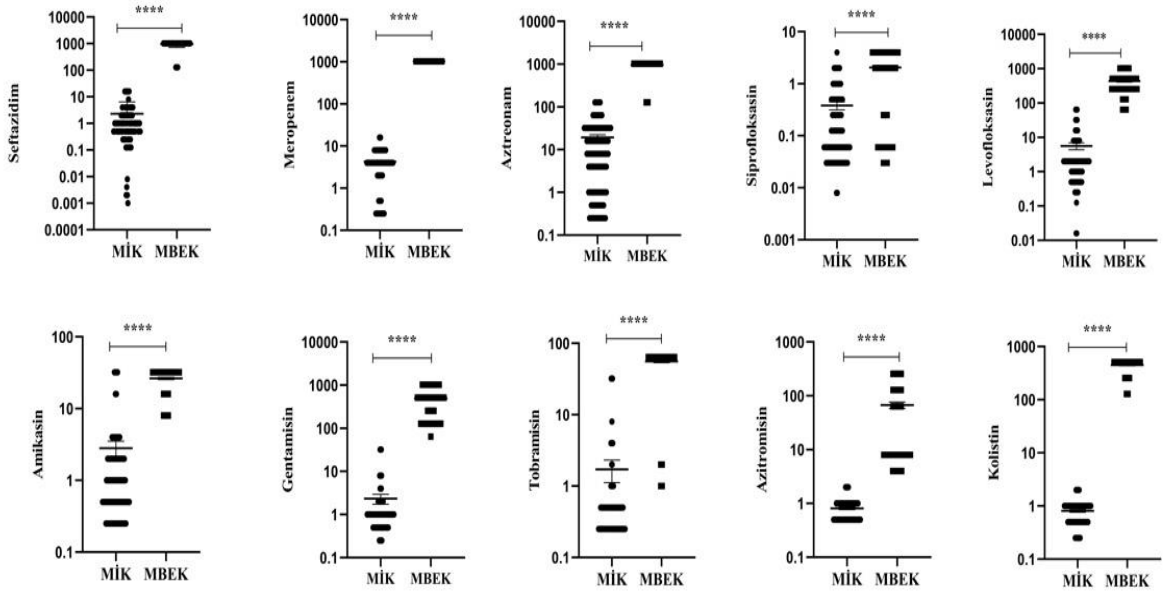
KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarından *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulduktan sonra biyofilm içindeki bakterilerde antibiyotiklere karşı MBEK değerleri sonucunda; Seftazidim (%100), meropenem (%100), aztreonam (%100), siprofloksasin (%65), levofloksasin (%100), amikasin (%72), tobramisin direnci (%87) ve kolistin direnci %100 olarak bulunmuştur. Tablo 4-2'de MİK ve MBEK değerlerine göre dirençli suş sayıları ve yüzdeleri görülmektedir.




**Şekil 4-13: MBEK mikroplağına ait örnek görüntü (TSB besiyeri).**
**1. Sütun sterilite kontrol, 12. sütun üreme kontrol, 2-11 sütunlar antibiyotik dilüsyonları.**

## 4.6. MİK ve MBEK Değerlerinin Karşılaştırılması

Seftazidim, meropenem, aztreonam, levofloksasin ve kolistine karşı suşların, biyofilm ortamında tamamen dirençli hale geldiği görülmüştür. Biyofilm ortamında tüm antibiyotiklerde antimikrobiyal direncin belirgin olarak arttığı belirlenmiştir ($p$<0,0001) (Şekil 4-14).




**Şekil 4-14: MİK ve MBEK değerlerinin karşılaştırılması**

**Tablo 4-2: MİK ve MBEK değerlerine göre dirençli suş sayıları ve yüzdeleri.**

| Antibiyotik | MİK Değerine Göre | MBEK Değerine Göre |
|---|---|---|
| **Seftazidim** | 7 (%8) | 92 (%100) |
| **Meropenem** | 3 ( %3) | 92 (%100) |
| **Aztreonam** | 26 ( %28) | 92 (%100) |
| **Siprofloksasin** | 15 (%16) | 60 (%65) |
| **Levofloksasin** | 53 (%58) | 92 (%100) |
| **Amikasin** | 4 (%4) | 66 (%72) |
| **Tobramisin** | 8 (%9) | 80 (%87) |
| **Kolistin** | 0 | 92 (%100) |

Suşlara ait $MİK_{50}$, $MİK_{90}$, $MBEK_{50}$, $MBEK_{90}$ ve MİK-MBEK aralığı tablo 4-3'te gösterilmiştir.

**Tablo 4-3: *P.aeruginosa* Suşlarına ait $MİK_{50}$, $MİK_{90}$, $MBEK_{50}$, $MBEK_{90}$ ve MİK-MBEK aralığı (µg/ml).**

| Antibiyotik | $MİK_{50}$ | $MİK_{90}$ | MİK Aralığı | $MBEK_{50}$ | $MBEK_{90}$ | MBEK Aralığı |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Seftazidim** | 1 | 4 | 0,001-16 | > 1024 | > 1024 | 128 - >1024 |
| **Meropenem** | 4 | 8 | < 0,25-16 | > 1024 | > 1024 | 1024 - >1024 |
| **Aztreonam** | 8 | 64 | 0,25-128 | > 1024 | > 1024 | 128 - >1024 |
| **Siprofloksasin** | 0,06 | 1 | 0,008-4 | 2 | 4 | 0,03 - 4 |
| **Levofloksasin** | 2 | 16 | 0,016-64 | 512 | > 1024 | 64 - >1024 |
| **Amikasin** | 1 | 4 | < 0,25-32 | 32 | 32 | 8-32 |
| **Gentamisin** | 1 | 4 | < 0,25-32 | 512 | > 1024 | 64 - > 1024 |
| **Tobramisin** | 0,5 | 2 | < 0,25-32 | 64 | 64 | 1 - 64 |
| **Azitromisin** | 0,5 | 1 | 0,5-2 | 8 | 256 | 4 - 256 |
| **Kolistin** | 1 | 1 | < 0,25-2 | 512 | 512 | 128 - 512 |

MBEK/MİK oranındaki değişiklikler, suşlar arasında homojen olarak dağılmamaktadır; aynı MİK'e sahip iki farklı suşta MBEK değerleri farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, siprofloksasin için MİK değeri 0,03 µg/ml olan bir suşun MBEK değeri 0,25 µg/ml olabiliyorken, başka bir suşun MBEK değeri 4 µg/ml olabilmektedir. KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında tüm antibiyotiklere ait MİK ve MBEK değerleri tablo 4-4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4-4: KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında tüm antibiyotiklere ait MİK ve MBEK değerleri**

| İzolat No | Seftazidim | | | Meropenem | | | Aztreonam | | | Siprofloksasin | | | Levofloksasin | | | Amikasin | | | Gentamisin | | | Tobramisin | | | Aztromisin | | | Kolistin | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | |
| ATCC 27853 | 2 | >1024 | R | 0,5 | >1024 | S | 4 | >1024 | R | 0,5 | 4 | R | 1 | 256 | R | 2 | 16 | S | 1 | 128 | S | 0,5 | 2 | S | 0,03 | 16 | S | 1 | 512 | R |
| ATCC 47085 | 2 | >1024 | R | 8 | >1024 | R | 32 | >1024 | R | 0,125 | 2 | R | 2 | 32 | R | 2 | 32 | R | 2 | 512 | R | 2 | 64 | R | 0,125 | 128 | S | 2 | 512 | R |
| 17 | 0,5 | >1024 | R | 0,5 | 1024 | S | 16 | >1024 | R | 0,25 | 4 | R | 64 | >1024 | R | <0,25 | 8 | S | 1 | 512 | R | <0,25 | 64 | R | 1 | 64 | S | 0,5 | 256 | R |
| 20 | 1 | >1024 | R | 2 | >1024 | S | 32 | >1024 | R | 0,125 | 4 | R | 2 | 512 | R | 0,5 | 32 | R | 1 | >1024 | R | 0,5 | 64 | R | 0,5 | 256 | S | 1 | 512 | R |
| 19 | 0,002 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,25 | 4 | R | 2 | 512 | R | 0,5 | 32 | R | 1 | >1024 | R | 0,5 | 64 | R | 1 | 256 | S | 1 | 512 | R |
| 22 | 1 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,06 | 4 | R | 0,25 | 512 | R | <0,25 | 8 | S | 1 | >1024 | R | <0,25 | 64 | R | 1 | 128 | S | 1 | 512 | R |
| 24 | 16 | >1024 | R | 8 | >1024 | R | 64 | >1024 | R | 0,03 | 0,25 | I | 0,5 | 256 | R | <0,25 | 8 | S | 0,5 | 128 | R | <0,25 | 64 | R | 0,5 | 8 | R | <0,25 | 128 | R |
| 28 | 1 | >1024 | R | 8 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,125 | 0,06 | I | 2 | 512 | R | 0,5 | 32 | R | 2 | 512 | R | <0,25 | 64 | R | 0,5 | 8 | R | 0,5 | 512 | R |
| 130 | 0,5 | >1024 | R | <0,25 | >1024 | S | 0,5 | >1024 | R | 0,06 | 2 | R | 1 | 256 | R | 2 | 32 | R | 1 | 512 | R | 0,5 | 64 | R | 1 | 64 | R | 1 | 512 | R |
| 35 | 0,5 | >1024 | R | <0,25 | >1024 | S | 8 | >1024 | R | 0,008 | 4 | R | 0,125 | >1024 | R | 0,5 | 32 | R | 0,5 | >1024 | R | <0,25 | 64 | R | 0,5 | 256 | R | <0,25 | 512 | R |
| 33 | 0,5 | >1024 | R | <0,25 | >1024 | S | 8 | >1024 | R | 0,03 | 4 | R | 0,25 | 64 | R | 1 | 32 | R | 1 | 512 | R | 0,5 | 64 | R | 1 | 64 | R | <0,25 | 256 | R |
| 38 | 4 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 128 | >1024 | R | 0,5 | 0,03 | I | 16 | >1024 | R | 2 | 32 | R | 1 | >1024 | R | 1 | 64 | R | 1 | 256 | R | <0,25 | 512 | R |
| 45 | 0,25 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 32 | >1024 | R | 0,125 | 0,06 | I | 2 | 256 | R | 2 | 32 | R | 1 | 512 | R | 1 | 64 | R | 1 | 64 | R | 2 | 512 | R |
| 49 | 0,5 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,03 | 0,25 | I | 1 | 256 | R | 2 | 32 | R | 2 | >1024 | R | 1 | 64 | R | 1 | 256 | R | 1 | 512 | R |
| 54 | 0,5 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 32 | >1024 | R | 1 | 4 | R | 8 | 512 | R | 4 | 32 | R | 2 | 512 | R | 1 | 64 | R | 1 | 8 | R | 1 | 512 | R |
| 51 | 4 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 128 | >1024 | R | 2 | 4 | R | 32 | >1024 | R | 32 | 32 | R | 32 | >1024 | R | 32 | 64 | R | 2 | 256 | R | 1 | 512 | R |
| 52 | 0,5 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,5 | 2 | R | 8 | >1024 | R | 2 | 32 | R | 2 | >1024 | R | 0,5 | 64 | R | 1 | 256 | R | 1 | 256 | R |
| 56 | 0,5 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 16 | >1024 | R | 0,06 | 2 | R | 0,5 | 128 | R | 0,5 | 32 | R | 1 | >1024 | R | <0,25 | 64 | R | 1 | 8 | R | 1 | 512 | R |
| 36 | 0,5 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 8 | >1024 | R | 0,06 | 2 | R | 2 | 512 | R | 2 | 32 | R | 1 | 512 | R | <0,25 | 64 | R | 1 | 64 | R | 1 | 512 | R |
| 69 | 0,25 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 1 | >1024 | R | 0,03 | 0,03 | I | 0,25 | 64 | R | 2 | 32 | R | 1 | 256 | R | 0,5 | 64 | R | 0,5 | 4 | R | 1 | 512 | R |
| 61 | 0,25 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 1 | >1024 | R | 0,06 | 2 | R | 1 | 256 | R | 4 | 32 | R | 1 | 512 | R | <0,25 | 64 | R | 0,5 | 8 | R | 0,5 | 512 | R |
| 65 | 0,25 | >1024 | R | 4 | >1024 | R | 0,25 | 128 | R | 0,25 | 0,06 | I | 2 | 256 | R | 0,5 | 16 | S | 0,5 | 128 | S | <0,25 | 2 | S | 0,5 | 4 | S | 0,5 | 256 | R |
| 64 | 0,25 | 128 | R | 4 | >1024 | R | 1 | 128 | R | 0,25 | 0,06 | I | 2 | 512 | R | 0,5 | 8 | S | 0,5 | >1024 | S | <0,25 | 1 | S | 0,5 | 8 | S | 0,5 | 512 | R |
| 68 | 1 | >1024 | R | 4 | 1024 | R | 0,25 | >1024 | R | 0,25 | 0,06 | I | 2 | 256 | R | <0,25 | 16 | S | <0,25 | >1024 | S | <0,25 | 2 | S | 0,5 | 8 | S | 0,5 | 512 | R |
| 76 | 0,25 | >1024 | R | 4 | 1024 | R | 0,5 | >1024 | R | 0,03 | 0,06 | I | 0,5 | 512 | R | 1 | 32 | R | 1 | >1024 | S | 0,5 | 64 | R | 0,5 | 4 | S | 1 | 256 | R |

| | Seftazidim | | | | Meropenem | | | | Aztreonam | | | | Siprofloksasin | | | | Levofloksasin | | | | Amikasin | | | | Gentamisin | | Tobramisin | | | | Azitromisin | | Kolistin | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| İzolat No | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | |
| ATCC 27853 | 2 | I | >1024 | R | 0,5 | S | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 1 | I | 256 | R | 2 | S | 16 | S | 1 | 128 | 0,5 | S | 2 | S | 0,03 | 16 | 1 | S | 512 | R |
| ATCC 47085 | 2 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,125 | I | 2 | R | 2 | R | 32 | R | 2 | S | 32 | R | 2 | 512 | 2 | S | 64 | R | 0,125 | 128 | 2 | S | 512 | R |
| 70 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 1 | I | 256 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 104 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 4 | R | 0,5 | I | 256 | R | 0,5 | S | 32 | R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 1 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 115 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 0,03 | I | 0,5 | I | 128 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 256 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 8 | 2 | S | 512 | R |
| 122 | 0,5 | I | >1024 | R | 0,5 | S | 1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 2 | R | 512 | R | 2 | S | 32 | R | 2 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 129 | 0,25 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 0,5 | I | >1024 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 0,5 | I | 128 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 256 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 8 | 2 | S | 512 | R |
| 102 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 4 | R | 2 | R | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 128 | 2 | S | 512 | R |
| 99 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 2 | R | 512 | R | 4 | S | 32 | R | 4 | 512 | 4 | R | 64 | R | 1 | 128 | 2 | S | 512 | R |
| 89 | 16 | R | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 128 | R | >1024 | R | 2 | R | 4 | R | 0,016 | I | 64 | R | 16 | S | 32 | R | 8 | >1024 | 2 | S | 64 | R | 1 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 92 | 0,5 | I | >1024 | R | 4 | I | 1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 0,06 | I | 0,5 | I | 128 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 256 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 256 | 1 | S | 512 | R |
| 93 | 0,125 | I | 128 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,06 | I | 0,06 | I | 2 | R | 256 | R | 4 | S | 32 | R | 2 | 512 | 1 | S | 64 | R | 0,5 | 4 | 1 | S | 512 | R |
| 90 | 0,5 | I | >1024 | R | 2 | S | >1024 | R | 16 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 1 | I | 256 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | >1024 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 256 | 1 | S | 128 | R |
| 4 | 0,001 | S | 128 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 0,06 | I | 0,5 | I | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 256 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 2 | 0,125 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 1 | R | 4 | R | 8 | R | 512 | R | 32 | R | 32 | R | 8 | >1024 | 8 | R | 64 | R | 1 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 3 | 0,125 | I | 128 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 0,25 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 0,03 | I | 0,5 | I | 128 | R | 0,25 | S | 8 | S | 1 | 256 | <0,25 | S | 1 | S | 1 | 8 | 0,5 | S | 256 | R |
| 16 | 0,125 | I | 128 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 0,25 | I | 128 | R | 0,008 | I | 0,03 | I | 0,016 | I | 64 | R | <0,25 | S | 8 | S | 1 | 256 | <0,25 | S | 1 | S | 1 | 256 | 0,5 | S | 256 | R |
| 7 | 1 | I | >1024 | R | 2 | S | 1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,25 | I | 0,06 | I | 1 | I | 256 | R | 0,5 | S | 16 | S | 0,5 | 128 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 4 | 1 | S | 512 | R |
| 15 | 0,125 | I | 128 | R | 0,5 | S | 1024 | R | 0,25 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 0,06 | I | 2 | R | 256 | R | <0,25 | S | 8 | S | 1 | 256 | <0,25 | S | 1 | S | 1 | 8 | 0,5 | S | 256 | R |
| 11 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,25 | I | 128 | R | 0,03 | I | 0,03 | I | 0,5 | I | 128 | R | 0,25 | S | 8 | S | 1 | 256 | <0,25 | S | 2 | S | 1 | 8 | 0,5 | S | 256 | R |
| 9 | 0,5 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,125 | I | 2 | R | 0,5 | I | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | >1024 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 256 | 0,5 | S | 512 | R |
| 12 | 2 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,03 | I | 4 | R | 0,5 | I | 256 | R | 0,5 | S | 16 | S | 1 | >1024 | <0,25 | S | 64 | R | 0,5 | 64 | 0,5 | S | 512 | R |
| 10 | 2 | I | >1024 | R | 2 | S | 1024 | R | 128 | R | >1024 | R | 0,25 | I | 4 | R | 0,25 | I | 64 | R | 4 | S | 32 | R | 8 | >1024 | 4 | R | 64 | R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 | R |
| 23 | 0,25 | I | >1024 | R | 2 | S | 1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 2 | R | 1 | I | 256 | R | 0,5 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 64 | 1 | S | 512 | R |
| 25 | 0,004 | I | >1024 | R | 2 | S | 1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 0,5 | I | 256 | R | 0,5 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 64 | <0,25 | S | 128 | R |

| | Seftazidim | | | Meropenem | | | Aztreonam | | | Siprofloksasin | | | Levofloksasin | | | Amikasin | | | Gentamisin | | Tobramisin | | | Azitromisin | | Kolistin | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| İzolat No | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) |
| ATCC 27853 | 2 | I | >1024 R | 0,5 | S | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,5 | I | 4 R | 1 | I | 256 R | 2 | S | 16 S | 1 | 128 | 0,5 | S | 2 S | 0,03 | 16 | 1 | S | 512 R |
| ATCC 47085 | 2 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 32 | R | >1024 R | 0,125 | I | 2 R | 2 | R | 32 R | 2 | S | 32 R | 2 | 512 | 2 | S | 64 R | 0,125 | 128 | 2 | S | 512 R |
| 30 | 2 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,5 | I | 2 R | 1 | I | 256 R | 1 | S | 32 R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 R | 1 | 256 | <0,25 | S | 128 R |
| 31 | 1 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 64 | R | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 512 R | 0,25 | S | 16 S | 0,25 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 4 | <0,25 | S | 128 R |
| 32 | 0,125 | I | >1024 R | 2 | S | 1024 R | 0,5 | I | >1024 R | 0,03 | I | 0,25 I | 2 | R | 256 R | <0,25 | S | 8 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | <0,25 | S | 128 R |
| 34 | 1 | I | >1024 R | 2 | S | 1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,25 | I | 0,06 I | 2 | R | 512 R | <0,25 | S | 8 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | <0,25 | S | 256 R |
| 42 | 0,5 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 256 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 512 R |
| 40 | 0,5 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 32 | R | >1024 R | 0,5 | I | 4 R | 8 | R | 512 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 64 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 41 | 16 | R | >1024 R | 16 | R | >1024 R | 64 | R | >1024 R | 2 | R | 4 R | 32 | R | >1024 R | 32 | R | 32 R | 32 | >1024 | 32 | R | 64 R | 2 | 128 | 1 | S | 512 R |
| 44 | 4 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,03 | I | 0,25 I | 1 | I | 256 R | 16 | S | 32 R | 8 | >1024 | 4 | R | 64 R | 2 | 128 | 1 | S | 512 R |
| 43 | 0,5 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 64 | R | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 512 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 46 | 2 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 64 | R | >1024 R | 0,5 | I | 4 R | 16 | R | >1024 R | 1 | S | 32 R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 R |
| 59 | 0,5 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 32 | R | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 512 R | 0,25 | S | 16 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 58 | 1 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 1 | R | 4 R | 8 | R | 512 R | <0,25 | S | 8 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 2 S | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 57 | 1 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 0,03 | I | 2 R | 1 | I | 256 R | 0,25 | S | 16 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 67 | 2 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 0,125 | I | 0,06 I | 2 | R | 256 R | 0,5 | S | 32 R | 1 | 512 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 512 R |
| 85 | 0,002 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 32 | R | >1024 R | 0,03 | I | 0,06 I | 0,5 | I | 256 R | <0,25 | S | 8 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 1 S | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 256 R |
| 75 | 1 | I | >1024 R | 0,5 | S | 1024 R | 0,5 | I | 128 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 512 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 256 R |
| 74 | 2 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 32 | R | >1024 R | 0,03 | I | 0,25 I | 1 | I | 256 R | 1 | S | 32 R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 R | 1 | 64 | 1 | S | 512 R |
| 79 | 4 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 1 | R | 4 R | 8 | R | 512 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 73 | 16 | R | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 1 | R | 4 R | 8 | R | >1024 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 72 | 4 | I | >1024 R | 8 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 512 R | 0,5 | S | 32 R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 80 | 1 | I | >1024 R | 2 | S | 1024 R | 4 | I | >1024 R | 0,25 | I | 4 R | 2 | R | 512 R | 0,25 | S | 16 S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 R |
| 117 | 16 | R | >1024 R | 16 | R | >1024 R | 0,5 | I | >1024 R | 1 | R | 4 R | 16 | R | >1024 R | 32 | R | 32 R | 32 | >1024 | 32 | R | 64 R | 2 | 128 | 1 | S | 512 R |
| 108 | 1 | I | >1024 R | 4 | I | >1024 R | 1 | I | >1024 R | 0,06 | I | 2 R | 2 | R | 256 R | 1 | S | 32 R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 R |

| | Seftazidim | | | | Meropenem | | | | Aztreonam | | | | Siprofloksasin | | | | Levofloksasin | | | | Amikasin | | | | Gentamisin | | Tobramisin | | | | Azitromisin | | Kolistin | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| İzolat No | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | | MİK (µg/ml) | MBEK (µg/ml) | MİK (µg/ml) | | MBEK (µg/ml) | |
| ATCC 27853 | 2 | I | >1024 | R | 0,5 | S | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 1 | I | 256 | R | 2 | S | 16 | S | 1 | 128 | 0,5 | S | 2 | S | 0,03 | 16 | 1 | S | 512 | R |
| ATCC 47085 | 2 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,125 | I | 2 | R | 2 | R | 32 | R | 2 | S | 32 | R | 2 | 512 | 2 | S | 64 | R | 0,125 | 128 | 2 | S | 512 | R |
| 109 | 16 | R | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,25 | I | >1024 | R | 4 | R | 4 | R | 64 | R | >1024 | R | 4 | S | 32 | R | 4 | 512 | 4 | R | 64 | R | 2 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 112 | 4 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 2 | R | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 107 | 1 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 2 | R | 256 | R | 0,25 | S | 16 | S | <0,25 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 1 | 64 | 1 | S | 512 | R |
| 114 | 16 | R | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 2 | R | 4 | R | 16 | R | >1024 | R | 4 | S | 32 | R | 2 | 512 | 1 | S | 64 | R | 1 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 138 | 2 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 2 | R | 512 | R | 2 | S | 32 | R | 2 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 64 | 2 | S | 512 | R |
| 135 | 0,008 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 0,5 | I | 256 | R | 0,5 | S | 16 | S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 2 | S | 1 | 256 | 1 | S | 512 | R |
| 128 | 4 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,5 | I | >1024 | R | 1 | R | 4 | R | 8 | R | 512 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 64 | 1 | S | 512 | R |
| 124 | 4 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 64 | R | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 1 | I | 256 | R | 0,5 | S | 32 | R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 | R |
| 127 | 0,002 | I | 128 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 0,25 | I | 128 | R | 0,125 | I | 0,06 | I | 0,25 | I | 64 | R | <0,25 | S | 8 | S | <0,25 | 128 | <0,25 | S | 2 | S | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 256 | R |
| 133 | 2 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 2 | R | 1 | I | 256 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 120 | 4 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 2 | R | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 123 | 0,5 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 2 | R | 1 | I | 256 | R | 0,5 | S | 16 | S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 | R |
| 126 | 0,5 | I | >1024 | R | 0,5 | S | 1024 | R | 0,25 | I | 128 | R | 1 | R | 4 | R | 8 | R | 512 | R | 0,25 | S | 16 | S | <0,25 | 128 | <0,25 | S | 1 | S | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 256 | R |
| 137 | 0,5 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 2 | R | 512 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 4 | 1 | S | 512 | R |
| 96 | 2 | I | >1024 | R | <0,25 | S | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 2 | R | 2 | R | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 105 | 0,5 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,25 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 2 | R | 256 | R | 2 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 1 | S | 512 | R |
| 106 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 2 | R | 512 | R | 0,5 | S | 32 | R | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 512 | R |
| 94 | 2 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,5 | I | >1024 | R | 2 | R | 4 | R | 32 | R | >1024 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 | R |
| 87 | 1 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,03 | I | 0,25 | I | 1 | I | 256 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 0,5 | 4 | 0,5 | S | 512 | R |
| 86 | 1 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 0,06 | I | 2 | R | 2 | R | 256 | R | 4 | S | 32 | R | 4 | >1024 | 2 | S | 64 | R | 2 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 95 | 2 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 1 | I | >1024 | R | 0,5 | I | 4 | R | 2 | R | 512 | R | 1 | S | 32 | R | 1 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 64 | 1 | S | 512 | R |
| 91 | 8 | I | >1024 | R | 8 | I | >1024 | R | 32 | R | >1024 | R | 2 | R | 4 | R | 64 | R | >1024 | R | 2 | S | 32 | R | 2 | 512 | 0,5 | S | 64 | R | 1 | 128 | 1 | S | 512 | R |
| 98 | 0,5 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 4 | I | >1024 | R | 0,03 | I | 4 | R | 1 | I | 256 | R | 0,5 | S | 16 | S | 0,5 | 128 | <0,25 | S | 64 | R | 0,5 | 8 | 0,5 | S | 512 | R |

# 5. TARTIŞMA

KF, genellikle Kafkas ırkından her 2500 kişide bir görülen, sindirim sistemi, solunum sistemi ve endokrin sistem gibi birçok sistem ile ilişkili yüksek mortaliteye sahip, KFTR genindeki mutasyon sonucunda ortaya çıkan otozomal resesif genetik bir hastalıktır. KFTR genindeki mutasyonlar sonucunda hücre zarlarından klor ve sodyumun ve bu sebeple suyun geçişinin bozulmasına neden olmaktadır. Mukus salgılayan bezlerde, sekresyonların yoğunluğunun artması ile birlikle tıkanma ve bez fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Fazla miktarda biriken viskoz mukusun akciğerlerden iyi temizlenememesi sonucunda, gelişen iltihap veya bir enfeksiyona bağlı olarak akciğerlerde fonksiyon kaybı görülmektedir. Mukus atımını sağlamak için yapılan göğüs fizyoterapisi, uygun beslenme ve enfeksiyonları engellemek için antimikrobiyal maddelerle erken müdahaleye dayanan tedavi stratejileri ile yaşam süreleri yükseltilmiştir. KF hastası çocuklar, 1980'lere kadar adolesan dönemine kadar nadiren yaşarken, ABD'de 'The Cystic Fibrosis Foundation' kurumunun 2018 yılı kayıtlarına göre, ortalama yaşama süresi 40'a kadar yükselmiş, hatta bir kısım hastaların ender olarak 40-50 yaşına kadar yaşadığı rapor edilmiştir (238). Ülkemizde de Ulusal Kistik Fibrozis Kayıt Sistemi 2020 verilerine göre tüm katılan merkezler arasında takipli en yaşlı hasta 46 yaşındadır (4).

KF, kız ve erkekler hastalarda benzer oranlarda görülmektedir. Serramitjana ve ark. İspanya'da KF hastaları ile yaptıkları çalışmada hastaların yaşları 9 ile 50 arasında değişmekte olup, hastaların yaş ortalaması 27'dir. Aynı çalışmada yer alan hastaların %41'i erkek, %59'u kadın olarak tespit edilmiştir (239). Karakoç ve ark. tarafından 60 KF hastası ile yapılan çalışmada, olguların %58'i kız, %42'si erkek olarak bildirilmiştir. Erdem ve ark. tarafından yapılan çalışmada 41 KF'li hasta irdelenmiş ve olguların %54'ü kız, %46'sı erkek olarak saptamıştır. Saygılı tarafından 93 hastanın dahil edildiği çalışmada, olguların %28'i kız, yüzde %72'si erkek olarak belirlenmiştir. Timurağaoğlu ve ark. 48 hasta ile yaptıkları bir diğer çalışmada ise olguların %46'sı kız ve %54'ü erkek olarak bulunmuştur. 2019 yılında Türkiye'de toplam 23 KF merkezinin katıldığı çalışmada, tüm hastaların 535'inin (%46) kadın, 635'inin (%54) erkek olduğu gösterilmiştir (23).

Çalışmamıza dahil edilen KF'li hastaların %58'i kız, %42'si erkek olup, en küçük hastamız 3, en büyük hastamız ise 23 yaşındadır. Bulgularımız diğer çalışmalarla

benzerlik göstermiş olup, İspanyada'ki çalışmaya göre, ileri yaştaki hastalar arasında fark bulunmaktadır. Ülkemizde yenidoğan tarama testinin 2015 yılından itibaren yapılmaya başlanmış olması, ileriki zamanlarda hastalığın erken teşhisi ve uygun tedavi stratejileri yaşam sürelerini uzatmada bir avantaj olmakla birlikle, hastalığın prognozunun daha iyi olacağını düşündürmektedir.

Solunum yolu enfeksiyonları, KF hastalarında morbidite ve mortalitenin en sık nedenidir. KF'li hastaların akciğerlerinde görülen fizyopatolojik değişimler, hastalarda çeşitli mikroorganizmaların etken olduğu enfeksiyonların gelişmesine zemin hazırlamaktadır (16). *S.aureus* ve *H.influenzae* yaşamın erken döneminde KF'li bebeklerde ve küçük yaş grubundaki çocuklarda sıklıkla saptanırken, yaşın ilerlemesi ile artan kültürlerde üreyen *P.aeruginosa* sıklığı 20'li yaşlardan sonra hastaların yaklaşık %60'ında görülmektedir (30, 31). Fonksiyonunu yerine getiremeyen KFTR, solunum yolu yüzey sıvısının yapısını değiştirerek doğal bağışıklık yanıtında ve bakteriyel klirenste bozulmaya yol açabildiği gibi, direkt *P.aeruginosa*'ya bağlanarak, endobronşiyal enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. *P.aeruginosa,* enfeksiyon sırasında çevresel faktörlerin etkisi altında fenotipik değişimler göstererek, başlangıçta non-mukoid olan suşlar zamanla değişen ortamın etkisiyle mukoid fenotipe dönüşmesi için gerekli olan aljinat sentezini uyarmaktadır. Oluşan mukoid fenotipler enfeksiyonun kronikleşmesinden ve hastalarda görülen erken yaşta ölümlerin büyük kısmından sorumludur (241-244).

Çalışmamızda, mukoid suşla kolonize hastaların yaş ortalaması (14), balgam kültüründe mukoid olmayan suş izole edilen hastaların yaş ortalamasından (12) fazla saptanmıştır. Literatüre benzer şekilde*; P.aeruginosa* ile kolonize hastaların yaşı arttıkça suşlarının mukoid özellik kazandıkları görülmüştür (245, 246). Benzer bir şekilde KF hasta gruplarının takipli hastalar ve yeni tanı alan hastalar olmak üzere ikiye ayrıldığı başka bir çalışmada; takipli hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının mukoid koloni fenotipinde olması anlamlı bulunmuştur (247).

Şener Okur, İÜ-C Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı tarafından KF tanısı ile takipli hastaların balgam kültürlerinden toplam 107 *P.aeruginosa* suşu izole etmiş, mukoid suş sayısının (n=58) mukoid olmayan suş sayısından (n=49) fazla saptamıştır (245). Yılmaz tarafından yapılan çalışmada, suşların 44'ü (%40) mukoid, 65'i (%60) non-mukoid fenotipte olduğunu göstermiştir (248). Bozkurt-Güzel ve ark. İÜ, İstanbul

Tıp Fakültesi, KF Laboratuvarları'nda, farklı hastaların balgam ve derin boğaz salgılarından izole ettikleri 40 *P.aeruginosa* suşunun 4 tanesini mukoid olarak saptamıştır (249). Pompilio ve ark. KF'li hastalardan izole edilen 25 *P.aeruginosa* suşundan 9'unun mukoid koloni morfolojisinde olduğunu tespit etmişlerdir (250). Perez ve ark. 35 KF'li hastadan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarından 30'unun (%86) mukoid fenotipte olduğunu ve daha küçük yaştaki hastalardan elde edilen sadece beş suşun bu mukoid fenotipi göstermediğini belirlemişlerdir (246). Hill ve ark. aerobik, anaerobik ve biyofilm koşullarında KF'li hastalardan elde edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında 16 suştan 10'unun mukoid koloni yapısında olduğunu gözlemlemişlerdir (251). Moskowitz ve ark. yaşları 5-22 arasında değişen ve *P.aeruginosa* için pozitif balgam kültürü öyküsü olan KF'li hastalardan izole edilen suşlar ile yaptıkları çalışmalarında 117'den 73'ünün (%75) mukoid koloni yapısında olduğunu saptamışlardır (252). Serramitjana ve ark. KF hastalarının balgam ve faringeal eksüdalarından izole edilen *P. aeruginosa*'nın 19 mukoid olmayan (%56) ve 15 (%44) mukoid olan 34 klinik suşu çalışmalarına dahil etmişlerdir (239).

Çalışmamızda hastalarımızın balgam kültürlerinden toplam 110 *P.aeruginosa* suşu izole edilmiş olup, mukoid suş sayısı (n=70, %64) mukoid olmayan suş sayısından (n=40, %36) fazla saptanmıştır. Hastalarımızın çoğu uzun yıllardır takipli hastalar olduğundan mukoid suş sayısının, mukoid olmayan suş sayısından fazla olması, literatüre uyumlu bir şekilde KF hastalarında gözlemlenen *P.aeruginosa* ile kronik akciğer enfeksiyonunu desteklemektedir.

Özellikle *P.aeruginosa*'nın ilişkili olduğu solunum yolu enfeksiyonlarında aljinat üretimi önemli rol oynamaktadır. Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynayarak, solunum yolu epiteli üzerinde kolonize olan bakteriyi sabit hale getirmektedir. Aljinatın fazla üretimi bakteriyi fagositozdan ve antimikrobiyal maddelerden korumada görev aldığı gibi, konağın bakteriye karşı bağışıklık yanıtını da zayıflatmaktadır. KF hastalarının akciğerlerindeki biyofilm yapısında yer aldığı kabul görmüş olsa da, yapılan bazı araştırmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için zorunlu olmadığı gözlemlenmiştir (61).

Biyofilm, mikroorganizmaların kendi ürettikleri EPS matriks içine gömülü, hareketsiz olarak birbirine, canlı veya cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde bulunan, üreme, protein üretimi ve gen ekspresyonu açısından planktonik

formlarına göre farklı özellikler sergileyen sesil hücrelerinin oluşturduğu topluluktur (177). Endüstriyel, içilebilir su şebeke boruları, doğal sucul sistemler ve medikal cihazlar gibi birçok yüzeyde oluşabilmektedirler (174). Ayrıca cansız yüzeylerin yanısıra, canlı organizmada çeşitli dokularda görülebilmektedir. Otitis media, doğal kapak endokarditi, periodontit ve kronik bakteriyel prostatit gibi hastalıkların dışında, protezler, kateterler, kontakt lens gibi yabancı cisim enfeksiyonları ve özellikle KF'li hastaların kronik akciğer enfeksiyonlarında çok önemli yer tuttuğu bilinmektedir (177).

*P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun incelendiği birçok çalışmada *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılmaktadır. *İn vitro* modeller de kendi içinde besin aktarımına bağlı olarak kapalı sistemler (kesikli kültür) ve açık sistemler (sürekli kültür) olarak sınıflandırılabilir (196). Kapalı sistemlerde en sık kullanılan yöntemlere örnek olarak; Agar üzerinde büyütülmüş statik bir biyofilm, 96 kuyucuklu mikroplak, peg çıkıntısı içeren kapaklar ile oluşturulan Calgary biyofilm cihazı ve biyofilm ring testi verilebilir (197, 198). En yaygın kullanılan açık sistemler ise; Akışkan-hücre çemberi, CDC biyofilm reaktörü ve drip flow biyofilm reaktöründen oluşmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, *in vitro* biyofilm deneylerinde kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Yöntemlerin birbirlerine karşı avantajları ve/veya dezavantajları bulunmakta, amaca uygun yöntemin seçilmesi önerilmektedir (198, 199).

Mikroplaklarda biyofilm oluşumu en sık kullanılan *in vitro* biyofilm tanımlama yöntemlerden birisidir. Ancak mevcut yöntemde, mikroplak kuyucuklarının yüzeyinde ve dibinde biyofilm oluşumu meydana gelir, bu da yıkama gibi işlemler nedeniyle biyofilmin daha kolay soyulmasına sebep olmaktadır. Peg temelli biyofilm yöntemini, mikroplak yönteminden ayıran en önemli özellik, biyofilmin peglerde oluşturularak yıkamanın kolaylaştırılması ve biyofilme pipet ucu ile dokunularak biyofilmin kaldırılması riskini engellemesidir. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları aşamasında antibiyotik dilüsyonları ayrı bir mikroplakta gerçekleştirildiği için biyofilm üzerine etki daha az olur ve bu sebeple çapraz kontaminasyon riski daha düşüktür. Biyofilm kapakta yer alan peglerde oluşturulduğundan, hücre sedimentasyonundan dolayı bir yığından ziyade, hücrelerin sesil forma geçişinin sonucuna bağlı bir antimikrobiyal duyarlılık testi söz konusudur (197, 198). Protokole uygun olarak pegleri içeren mikroplak kapakları ve düz tabanlı mikroplaklar orbital çalkalamalı etüvde inkübe edilerek, etüvün ileri-geri hareketi ile mikrobiyal tutunma ve biyofilm oluşumunu uyarılmaktadır. Yine protokolde

uygulanan sonikasyon aşaması ile MBEK değerlerinin belirlenmesi amacıyla pegler üzerinde oluşan biyofilmin taze besiyerine aktarımı sağlanmaktadır. Ayrıca, peg temelli biyofilm yöntemi ile koloni sayımı aracılığıyla canlı hücre sayısı hesaplanarak biyofilm içerisindeki mikrobiyal yük belirlenebilmektedir (253, 254). Bu yöntem çeşitli boyama ve mikroskobik metotlarla da birleştirilebilmektedir (198, 233, 254, 255). Kullanılan peg temelli biyofilm sisteminin en büyük dezavantajı ise, her aşamada birden çok 96 kuyucuklu mikroplağa ihtiyaç olmasıdır.

Piyasada ticari olarak hazır satılan peg temelli mikroplak sistemleri daha pahalı olduğu için, çalışmamızda biyofilm oluşumunu sağlamak ve MBEK değerlerinin belirlenmesi amacıyla, alternatiflerine göre uygun fiyatlı olan 96 kuyucuklu düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ plağı (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve bu plağa uygun 96 adet pegleri içeren Nunc™ Immuno TSP Lids (Thermo Fisher Scientific, ABD) kapaktan oluşan iki parçalı bir sistem kullanılmıştır (197, 198). Ancak yöntemin standardizasyonu gerekmektedir ve bu amaçla çalışmamızda mikroplağın tamamında biyofilm oluşumunun denenmesi için *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşu kullanılmıştır. Çalışmamızda standart *P.aeruginosa* suşlarıyla yapılan diğer çalışmalara benzer olarak, başlangıç inokulum miktarı 0,5 McFarland standardının 1/30 dilüsyonu ile $5\times10^6$ KOB/ml olarak kullanılmış, 24 saatlik inkübasyon aşamasından sonra biyofilm ortamında ~8 $\log_{10}$ KOB/peg bakteri elde edilmiştir. Mikroplağın her kuyucuğunda benzer oranlarda biyofilm oluşumu çalıştığımız yöntem ile görülebilmektedir ($p$=0,1177). Mikroplak sistemleriyle biyofilm oluşturuken, biyofilm oluşturulacak peglerin bazı mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunu arrtırmak için çeşitli ürünlerle kaplanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşunun VCC değerleri göz önüne alındığında, herhangi bir kaplamaya gerek duyulmamıştır. Bulgumuz yapılan diğer çalışmalarla da benzerlik göstermektedir (6, 197).

KF hastalarında *P.aeruginosa*'ya bağlı kronik solunum yolu enfeksiyonları biyofilm oluşumu ile ilgili enfeksiyonlara en iyi örneklerden biridir. Kronik kolonize *P.aeruginosa* varlığı akciğerlerin fonksiyonunu ve klinik seyri kötüleştirdiği göz önünde alındığında, biyofilm yapısının tespit edilmesi de tedavisi kadar önemlidir (256). KF'li hastalardan izole edilen 60 adet *P.aeruginosa* suşunun biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada suşların %33,3 (20/60)'ünün biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (257). Moskowitz ve ark. gerçekleştirdiği KF'li hastalardan elde ettikleri 94

suşu kapsayan peg temelli biyofilm yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında, suşların %74'ünün, 24 saat sonunda, kontrol suşu olarak kullandıkları ATCC 27853'den daha fazla absorbons verdiğini saptamışlardır (112). Yine Moskowitz ve ark. aynı biyofilm yöntemini kullanarak yaptıkları bir diğer çalışmalarında, KF'li hastalardan izole edilen 117 *P.aeruginosa* suşundan 93'ünün biyofilm pozitif olduğunu bulmuşlardır (252). Aguilar ve ark. KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşturma özelliğini araştırmış, 53 suşun 32'sinin (%60) biyofilm oluşturduğunu; 8'ini zayıf pozitif (%25), 16'sını orta (%50) ve 8'ini güçlü pozitif (%25) olarak sınıflandırmışlardır (258).

Bizim çalışmamızda; solunum yolu örneklerinden izole edilen 110 *P.aeruginosa* suşunun biyofilm üretim yetenekleri peg temelli biyofilm oluşturma yöntemi ile 24 saatlik inkübasyon aşamasından sonra, KV boyası kullanılarak değerlendirilmiştir. Test edilen 110 suş kuvvetli biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* ATCC 47085 *P.aeruginosa* ve ATCC 27853 baz alınarak değerlendirildiğinde; 92'sinin (%84) biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Klinik suşların 30'unun (%33) güçlü, 39'unun (%42) orta dereceli ve 23'ünün (%25) ise zayıf biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. İzole edilen örneklerde biyofilm oluşturma oranının diğer çalışmalarla benzerlik göstererek yüksek bulunması, KF hastalarında *P.aeruginosa*'nın biyofilm kaynaklı ve eradikasyonu güç enfeksiyonlara sebep olduğu bilgisini destekleyen önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmasının birçok klinik önemi vardır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların planktonik hücrelere kıyasla 100-1000 kat daha dirençli olması ve antibiyotik tedavileri sonrasında relaps oranlarının yüksek olması, sebep olduğu biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların önemini daha da arttırmaktadır. Biyofilmlerin klinikteki asıl önemi, kronik enfeksiyonlara zemin hazırlamasına ek olarak uygulanan antibiyotik tedavi süresinin uzayarak tedavi güçlüğüne sebep olmasıdır (6). Biyofilm fenotipinin bir diğer önemli özelliği ise, mikroorganizmayı konağın immun hücrelerinden korumasıdır (221, 226).

Daha biyofilm oluşmadan alınan önlemlerle biyofilm oluşumunun engellenmesi, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları önlemek adına en ideal yaklaşımdır. Ancak canlı dokularda oluşan biyofimlerde önleyici tedaviler her zaman mümkün olmadığı gibi, bazen uygulansalar da başarılı sonuçlar alınamadığından, özellikle *P.aeruginosa*'nın KF akciğerlerinde maruz kaldığı besin yetersizliği, oksidatif stres, ozmotik stres, diğer mikrorganizmalarla rekabet ve yoğun antibiyotik tedavileri biyofilm oluşumunu

kaçınılmaz hale getirmektedir. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda tedaviye katkı sağlamak amacıyla, biyofilm içindeki mikroorganizmayı öldürebilecek antibiyotik tedavisinin planlanması eradikasyon için önemlidir. Bu sebeple antimikrobiyal duyarlılık testlerinin biyofilm ortamında gerçekleştirilerek antibiyotiklerin mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlere karşı inhibitör ve daha da önemlisi eradike edici konsantrasyonlarının belirlenmesi gerektiği önerilmektedir (259, 260).

KF'te antibiyotik kullanımı, oral, parenteral ve inhalasyon yoluyla uygulanabilmektedir. Amaç, mikroorganizmanın sebep olduğu enfeksiyonu erken aşamada önlemek, akciğerlerdeki akut alevlenmeyi tedavi etmek ve solunum yollarında kronik olarak bulunan mikroorganizmaların üremesini baskılamaktır (132). Antimikrobiyal direnç oranları coğrafik bölgelere göre değiştiğinden, akut alevlenme veya kronik kolonizasyonda antibiyotik tedavisine balgam kültürlerinde üreyen mikroorganizmanın kültür ve antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları değerlendirilerek karar verilmelidir. Direnç gelişimini azaltmak için Pseudomonaslarla olan akciğer enfeksiyonlarında iki antipsödomonal antibiyotik birlikte verilmelidir (138). Antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozidler gibi belirli antibiyotik gruplarının etkili olmasından dolayı, bu ilaçlara karşı gelişen direncin izlenmesi ve kontrolü önem taşımaktadır.

KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonlarda antimikrobiyal direnç ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlardaki tedavi başarısızlığı, ülkemizde ve dünyada büyük bir sorun haline gelmiştir. Literatürde biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmalarla MBEK değerlerinin belirlendiği çalışmalar olsa da, özellikle KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşları ile peg temelli biyofilm yöntemiyle yapılmış sınırlı sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamız, biyofilm oluşumu ile ilişkili enfeksiyonlara iyi bir örnek olan KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının biyofilm ortamında antibiyotik eradikasyonlarını inceleyen bir çalışma olması açısından önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, 92 *P.aeruginosa* suşu ile CLSI'ın MİK saptanması için önerdiği standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları kullanılarak seftazidim, meropenem, aztreonam, siprofloksasin, levofloksasin, amikasin, gentamisin, tobramisin, azitromisin ve kolistin antibiyotiklerinin planktonik hücrelerde duyarlılıkları, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK ve peg temelli

biyofilm yöntemi ile MBEK değerleri araştırılmıştır. MBEK sonuçları, EUCAST MİK klinik sınır tablosuna göre değerlendirildiğinde, suşların tüm antibiyotiklere direnç oranlarının anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p$<0,0001). MBEK değerleri, MİK değerlerinden daha düşük olan bir suş tanımlanmamıştır.

Beta-laktam antibiyotiklerin zayıf anti-biyofilm özelliğe sahip olmasının nedeni, antibiyotiğin etki mekanizmasının peptidoglikan sentezini hedefleyen ve sadece aktif olarak büyüyen, bölünen hücreler üzerinde etkili olmasından kaynaklanmaktadır. Mikroorganizmanın, biyofilm içerisindeki yetersiz besin ve oksijen sebebiyle metabolik olarak inaktif durumda bulunması, antibiyotiğe karşı dirençli olmasına sebep olmaktadır (261). Biyofilm yapısı içerisinde yavaş üreme gösteren *P.aeruginosa* suşlarıyla yapılan bir çalışmada, beta-laktam antibiyotiklere ve tetrasiklinlere duyarlılığın önemli ölçüde azaldığını gözlenmiştir (262). Biyofilmlerin karakteristik ve önemli yapılarından biri olan EPS matriks antimikrobiyal maddelerle reaksiyona girerek ve/veya bileşikleri adsorbe etme yoluyla antibiyotiklerin içeri girişini kısıtlamaktadır (263). EPS'den penetre olabilen β-laktam antibiyotikler ise, β-laktamazlarla hidrolize olmaları sonucunda antimikrobiyal madde miktarı azaltmakta ve direnç gelişmektedir. Ayrıca mikroorganizmalar biyofilm ortamında antibiyotiklerin subMİK konsantrasyonları ile karşı karşıya kalarak, bu durumun hem direnci hem de biyofilm oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (60, 193).

Ceri ve ark. in vitro biyofilm ortamında antibiyotik duyarlılıkları için geliştirdikleri cihazı kullanarak CLSI'ın referans suşlarından *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC 25922 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 ile yaptıkları çalışmada aynı suşun biyofilm formunun planktonik formuna göre antibiyotiklere 100 - 1000 kat daha dirençli olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün seftazidim için MİK değeri 1 µg/ml iken, MBEK değeri >1024 µg/ml, aztreonam için MİK değeri 2 µg/ml iken, MBEK değeri >1024 µg/ml olarak saptanmıştır (6). Aaron ve ark. yaptıkları çalışmada, KF hastalarından izole edilen 12 çoklu dirençli *P.aeruginosa* suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını planktonik ve biyofilm ortamında araştırmışlardır. Seftazidim ve meropenem için biyofilm ortamında mikroorganizmayı eradike edecek konsantrasyonun 32 kata kadar artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir (260). Moskowitz ve ark. 41 KF hastasından elde ettikleri 94 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları kapsamlı çalışmada, antipsödomonal etkinliği olan 12 antibiyotiğin planktonik ve biyofilm

ortamında antimikrobiyal duyarlılığını karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda beta-laktam antibiyotiklerin biyofilm inhibitör konsantrasyonu (BİK) değerlerinin MİK'lerden yüksek ve zayıf bir anti-biyofilm etkisine sahip oldukları yorumuna varmışlardır. Beta laktam antibiyotiklerden, seftazidim için MİK değer aralıkları ≤0,5-512 µg/ml iken BİK değer aralıkları ≤2- >128 µg/ml, meropenem için MİK değer aralıkları ≤1-16 µg/ml iken BİK değer aralıkları ≤1- >64 µg/ml, aztreonam için MİK değeri ≤2-64, BİK değeri ≤2–128 µg/ml saptanmıştır. KF solunum yolu enfeksiyonları için mevcut kullanımdaki yöntemlerden daha etkili antibiyotik kombinasyonları seçmek için uyguladıkları peg temelli biyofilm duyarlılık yönteminin klinik mikrobiyoloji laboratuvarına uyarlanabileceği yorumuna varmışlardır (112). Hill ve ark. aerobik, anaerobik ve biyofilm koşullarında KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında, seftazidimin biyofilm ortamında hiçbir suşa karşı etkili olmadığını, meropenemin ise suşların 11'ine (%69) aerobik olarak ve 5'ine (%31) anaerobik olarak bakterisidal etkisi olduğunu, ancak biyofilm koşullarında bu rakamın 3'e (%19) düştüğünü saptamışlardır (251). Kapoor *P.aeruginosa* biyofilm oluşumunda anti-infektif stratejiler üzerine yaptığı doktora tezinde, KF'li hastalardan izole edilen 4 *P.aeruginosa* suşunu kullanarak peg temelli biyofilm yöntemi ile elde ettiği bulgular sonucunda, seftazidim MBEK değerini 8- >256, meropenem MBEK değerini 0,06-2 aralıkları arasında bulmuştur (264). 2021 yılında Aguilar ve ark. biyofilm ortamında KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı murepavadin'in tobramisin, kolistin ve aztreonam ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, aztreonam için, MİK ve MBEK değerleri arasında büyük bir fark olduğunu tespit etmişlerdir ($MİK_{50}$=4 mg/L'ye karşı $MBEK_{50}$=512 mg/L) (258). Bayındır Bilman peg temelli biyofilm yöntemini kullanarak çeşitli kateter kültürlerinde üremiş olan 15 *P.aeruginosa* suşu ile yaptığı antimikrobiyal duyarlılık çalışmasında, suşların seftazidim MİK değer aralıklarını 2-8 mg/L, biyofilm ortamında ise MBEK değerlerini >1024 olarak bulmuş ve biyofilmde seftazidim direncini %100 olarak yorumlamıştır. Şuşların meropenem MİK değer aralıklarını 0,125-16 mg/L, biyofilm ortamında ise MBEK değerlerini 4-64 olarak bulmuş ve biyofilmde meropenem direncini %87 olarak belirlemiştir (265).

Beta-laktam grubu antibiyotiklere dair bulgularımız yorumlandığında, yapılan çoğu çalışma ile benzer olarak biyofilm ortamında etkin olmadıkları görülmüştür. Çalışmamızdaki biyofilm oluşturmuş *P.aeruginosa* suşlarının; Seftazidim, meropenem ve aztreonam MBEK değerlerinin, MİK değerlerinden yaklaşık 1000 kat daha yüksek

olduğu gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının seftazdim MİK değer aralıkları 0,001-4 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %8'i dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 128- >1024 µg/ml olarak bulunmuş ve hepsi dirençli saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının meropenem MİK değer aralıkları <0,25-16 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %3'ü dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 1024- >1024 µg/ml aralığında bulunmuş ve hepsi dirençli saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının aztreonam MİK değer aralıkları 0,25-128 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %28'i dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 128- >1024 µg/ml olarak bulunmuş ve hepsi dirençli saptanmıştır. Moskovitz ve ark. yaptığı çalışmada beta laktam antibiyotiklerin BİK değerlerini MİK değerlerinden yüksek belirlemelerine rağmen çalışmamızla olan uyumsuzluğu yöntem aşamasında sonikasyon aşamasının 5 dakika olarak yapılması ve BİK değerlerinin MBEK değerleri belirlenirken ki son 24 saatlik inkübasyon aşamasının yapılmamasından dolayı olabileceği fikrindeyiz. Kapoor'un doktora tezinde meropenem için belirlediği MBEK değeri bizim sonuçlarımızdan düşük bulunmuş, bu sonucun 4 *P.aeruginosa* suşu kullanılarak belirlenmesinden olduğu düşüncesindeyiz.

Florokinolonlar iyi bir anti-biyofilm etkilerinin yanı sıra, iyi doku penetrasyonlarına ve oral uygulama kolaylıklarına sahip olduğundan, kemik ve eklem implantı ile ilişkili enfeksiyon ve kronik akciğer enfeksiyonları gibi biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için kombinasyon halinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (266, 267). Kinolonlar yüksüz moleküllerdir ve biyofilm matriksinden kolayca yayılırlar. Yavaş büyüyen veya büyümeyen *P.aeruginosa* suşları üzerinde kinolonların *in vitro* olarak yapılan çalışmada, önemli bakterisidal aktivite gösterdikleri saptanmıştır (268). Ancak, biyofilmlerdeki düşük oksijen konsantrasyonu, biyofilmlerin kinolonlara toleransında rol oynamaktadır (269). Biyofilmlerin hiperbarik oksijen tedavisine (HBOT) maruz bırakılmasıyla düşük oksijen geriliminin hedeflenmesinin, kinolonların anti-biyofilm etkisini iyileştirdiği gösterilmiştir (270). Biyofilm oluşumu pek çok antimikrobiyal madde açısından tedavide sorun yaratsa da florokinolonların biyofilm

matriksinden geçebildiği ve biyofilme iyi nüfuz edebildiği araştırmalarla gözlemlenmiştir. Ali ve ark. biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotik konsantrasyonlarında penetrasyonları araştırdıklarını çalışmalarında florokinolon grubundan siprofloksasinin %90 penetrasyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, kinolonların, aljinata daha yüksek geçirgenliğin yanı sıra daha yüksek bakterisidal aktivite gösterdiğini ve *P.aeruginosa* biyofilmlerinin tedavisinde ilk tercih antibiyotik olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir (271). Drenkard ve ark. yaptıkları çalışmada, biyofilm ortamında yavaş üreme gösteren veya durağan fazda bulunan *P.aeruginosa* suşlarının florokinolon aktivitesinin ise üreme hızıyla etkileşmediği saptanmışlardır (262). Ancak, fosfomisin ve siprofloksasinin *E.coli* ve *P.aeruginosa* biyofilmlerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, ilaç uygulamasından 6 saat sonra antimikrobiyal maddenin %50'sinden fazlası hedefe ulaşmış olsa dahi, tedavinin sonunda bakterinin eradikasyonu açısından istenilen sonuca ulaşılamadığı saptanmış ve bu durum biyofilm direnciyle açıklanmıştır (272). Biyofilm varlığında bakterilerde bazı dışa atım pompalarının ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (59).

Ceri ve ark. *in vitro* biyofilm ortamında siprofloksasin için MİK değeri 0,25 µg/ml iken, MBEK değerini 4 µg/ml saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, biyofilminin eradikasyonu için, siprofloksasinin kullanılabilir olduğunu ifade etmişlerdir (6). KF hastalarından izole edilen 12 çoklu dirençli *P.aeruginosa* suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını planktonik ve biyofilm ortamında incelendiği Aaron ve ark. yaptıkları çalışmada, siprofloksasin için biyofilm ortamında mikroorganizmayı eradike edecek konsantrasyonun 8 kata kadar artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir (260). Moskowitz ve ark. antipsödomonal etkinliği olan 12 antibiyotik için yaptıkları 41 KF hastasından elde ettikleri 94 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları kapsamlı çalışma sonucunda siprofloksasin için MİK değeri ≤0,25-16, BİK değeri <2- >16 µg/ml saptayarak, BİK ve MİK değer aralıklarını birbirine yakın bulmuşlardır. Çalışmanın bir diğer kısmında 20 *P.aeruginosa* suşu üzerinde levofloksasinin MİK ve BİK değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda levofloksasinin için MİK değeri ≤0,25-16, BİK değeri ≤0,25-32 µg/ml saptayarak siprofloksasine göre daha iyi bir antibiyofilm aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir (259). Kapoor doktora tezinde peg temelli biyofilm yöntemi ile yaptığı çalışma sonucunda, siprofloksasini planktonik ve biyofilm hücrelerine karşı tobramisinden daha etkili bir ajan olarak tanımlamıştır (264). Masadeh ve ark. 2019

yılında florokinolonların antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı peg temelli biyofilm yöntemi ile *in vitro* karşılaştırdıkları çalışmalarında, siprofloksasinin hem planktonik hem de sesil hücrelerde en etkili antibiyotik olduğunu, levofloksasinin ise planktonik ve sesil hücrelerde orta düzeyde bir aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. KF hastalarında kullanılan antibiyotiklerle 57 non mukoid *P.aeruginosa* suşunda erken biyofilm oluşumunun *in vitro* önlenmesi isimli çalışmalarında Fernández-Olmos ve ark. siprofloksasin planktonik formunda MİK değer aralıklarını 0,06–2 µg/ml, biyofilm ortamında ise 0,25–32 µg/ml arasında bulmuş, levofloksasin için MİK değer aralıklarını 0,25-2 µg/ml, biyofilm ortamında ise 0,5-64 µg/ml olarak belirlemişlerdir (273). Bayındır Bilman'ın peg temelli biyofilm yöntemini kullanarak çeşitli kateter kültürlerinde üremiş olan 15 *P.aeruginosa* suşu ile yaptığı antibiyotik duyarlılık çalışmasında suşların siprofloksasin MİK değer aralıklarını 0,06-2 mg/L, biyofilm ortamında ise MBEK değerlerini 0,25-0,5 mg/L olarak bulmuş ve biyofilm ortamında siprofloksasine karşı hiç dirençli suş tespit etmemiştir (265).

Kinolon grubu antibiyotiklere dair bulgularımız yorumlandığında, yapılan çoğu çalışma ile benzer olarak biyofilm ortamında siprofloksasin diğer antibiyotiklere göre tedavide kullanılabilir olarak görülmektedir. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının siprofloksasin MİK değer aralıkları 0,008-4 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %16'sı dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı ve standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 0,03-4 µg/ml olarak bulunmuştur. MİK ve MBEK değerlerine göre dirençli suş sayıları göz önüne alındığında, siprofloksasin için MİK değerlerine göre dirençli suş sayısı 15 iken, MBEK değerlerine göre dirençli suş sayısı 60 olmuştur. Direnç oranı artmasına rağmen, bu oran, araştırılan antibiyotikler içerisindeki en az antimikrobiyal direnç oranıdır. Bayındır Bilman'ın biyofilm ortamında siprofloksasine karşı hiç dirençli suş tespit edememesinin sebebinin çalışmanın yapıldığı yıldaki EUCAST sınır değer tablolarına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmada biyofilm ortamında antibiyotik direnç oranlarına bakılmadan önce bakterilerin biyofilm oluşturup oluşturmama özelliğinin değerlendirilmemesi ve çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* suşlarının kateter kültürlerinden izole edilmiş olması direnç oranlarının farklılığına sebep olabilmektedir. Araştırdığımız kadarıyla literatürde biyofilm ortamında levofloksasin için kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmaya dahil edilen *P.aeruginosa* suşlarının levofloksasin MİK değer aralıkları 0,016-64 µg/ml bulunmuş, bu

değer aralıklarına göre suşların %58'i dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 64 - >1024 µg/ml olarak bulunmuş ve hepsi dirençli saptanmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak, yüksek levofloksasin MİK ve MBEK değerlerinin, antibiyotiğin klinikte hem *P.aeruginosa* hem de KF'li hastalarda üreyen diğer mikroorganizmalarda yoğun kullanımına bağlı olduğu kanaatindeyiz.

*P.aeruginosa* biyofilmlerinin aminoglikozid antibiyotiklere karşı toleransında çok sayıda mekanizma rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, biyofilm matriksinin çeşitli bileşenleri tarafından aminoglikozidlerin bağlanmasını ve biyofilm ile ilişkili aminoglikozid toleransını sağlayan spesifik genlerin ekspresyonunu içermektedir (213, 214, 274, 275). *P.aeruginosa* biyofilmlerinin matriksindeki aljinat ve eDNA, aminoglikozid antibiyotikleri bağlayarak antibiyotiklere karşı toleransta rol oynamaktadır. Aljinatın ve siklik glukanların yüksek negatif yükünün, bu pozitif yüklü antibiyotiklerle iyonik etkileşimlerin oluşmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Fakat, aljinat salgılamayan suşlarda, polisakkaritler Pel ve Psl biyofilm oluşumunda yer almaktadır. Pel, tobramisin ve gentamisine karşı koruma sağlarken siprofloksasine karşı koruma sağlamamaktadır (276). Aljinatın aksine Pel katyonik bir EPS'dir ve bu nedenle aminoglikozidlere direnç doğrudan yük etkileşimi ile açıklanamamaktadır. Ancak Pel, negatif yüklü olan ve aminoglikozidlerle etkileşime girebilen eDNA'yı bağlamaktadır. (277). Bu koruyucu etki, Psl üretmeyen *E.coli* ve *S.aureus* türlerinin *P.aeruginosa* ile birlikte polimikrobiyal biyofilmlerinde gözlenmiştir (278). Aminoglikozidlerin sitoplazmik zardan aktif oksijene bağlı alımı, biyofilmlerin daha derin katmanlarındaki oksijen eksikliği ve düşük metabolik hız, aminoglikozidlere toleransın başka nedenlerindendir (269). Ali ve ark. çeşitli antibiyotiklerin biyofilm üreten *P.aeruginosa* suşlarının bakterisidal aktivitesini belirledikleri çalışmalarında, aminoglikozidlerin özellikle olgun biyofilmler için matriks bileşenleri yoluyla sınırlı penetrasyona sahip olabileceğini bildirilmişlerdir (271, 279). Kumon ve ark. aminoglikozidlerin (Gentamisin ve tobramisin) penetrasyonunun oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir (280). Tobramisin gibi aminoglikozidlerin, biyofilm yapısına siprofloksasinden daha yavaş nüfuz etmesi, mikroorganizmaların uyarlanabilir stres tepkileri kazanmasına izin verebilmektedir (195, 281). EPS matriksinin antibiyotik difüzyon hızını azaltabildiği,

aminoglikozidlerin aljinat üretimini uyardığı ve *P.aeruginosa* biyofilm biyokütlesini arttırdığı rapor edilmiştir (282, 283).

Ceri ve ark. in vitro biyofilm ortamında amikasin için MİK değeri 2 µg/ml iken, MBEK değeri 16 µg/ml, gentamisin için MİK değeri 2 µg/ml iken, MBEK değeri 128 µg/ml, tobramisin için MİK değeri 0,5 µg/ml iken, MBEK değeri 2 µg/ml saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün, aminoglikozidlerden tobramisin ve amikasine duyarlı, ancak gentamisin için daha az duyarlı olduğunu belirlemişlerdir (6). KF hastalarından izole edilen 12 çoklu dirençli *P.aeruginosa* suşunun çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarını planktonik ve biyofilm ortamında incelendiği Aaron ve ark. yaptıkları çalışmada, tobramisin ve amikasinde biyofilm ortamında 64 kata kadar artış görmüşlerdir (260). Moskowitz ve ark. antipsödomonal etkinliği olan 12 antibiyotik ile yaptıkları kapsamlı çalışma sonucunda amikasin için için MİK değeri ≤0,5-128, BİK değeri 4- >256 µg/ml, gentamisin için MİK değeri ≤1- >32 µg/ml, BİK değeri ≤1- >64 µg/ml, tobramisin için MİK değeri ≤0,25- >512 µg/ml, BİK değeri ≤1- >64 µg/ml saptayarak BİK ve MİK değer aralıklarını birbirine yakın bulduklarını belirtmişlerdir (259). Aerobik, anaerobik ve biyofilm koşullarında KF'li hastalardan elde edilen *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını inceleyen Hill ve ark., 16 *P.aeruginosa* suşunun tamamını MİK değerlerine göre amikasin için dirençli bulunurken, biyofilm ortamında hiçbir suş için bakterisidal etki görülmediğini gözlemlemişlerdir. Tobramisinde ise MİK değerlerine göre %75'i dirençli bulunan suşların, biyofilm koşulları altında nadir bakterisidal etki gösterdiğini saptamışlardır (251). Serramitjana ve ark. İspanya'da serbest ve nanokapsüllü tobramisinin Pseudomonas'ın planktonik ve biyofilm formları üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında tobramisin MBEK değer aralıklarını 8-32 µg/mL olarak bulmuşlardır. Daha yüksek olan MBEK değerlerinin, biyofilmin anyonik polisakkariti ile katyonik aminoglikozid antibiyotik arasındaki etkileşimden dolayı olduğu sonucunu çıkarmışlardır (239). 2021 yılında Aguilar ve ark. biyofilm ortamında KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı murepavadinin tobramisin ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, tobramisinin, biyofilm ortamında en iyi etkinliği gösteren antibiyotik olduğunu belirlemişlerdir (258). Bayındır Bilman'ın peg temelli biyofilm yöntemini kullanarak çeşitli kateter kültürlerinde üremiş olan 15 *P.aeruginosa* suşu ile yaptığı antibiyotik duyarlılık çalışmasında suşların amikasin MİK değer aralıklarını 2-4 mg/L, biyofilm ortamında ise MBEK değerlerini 8-64 mg/L olarak

bulmuş ve biyofilm ortamında amikasin direncini %7 bulmuştur. Gentamisin MİK değer aralıklarını 0,25-1 mg/L, biyofilm ortamında ise MBEK değerlerini 4-32 mg/L olarak bulmuş ve biyofilm ortamında gentamisin direncini %60 olarak belirlemiştir (265).

Aminoglikozid grubu antibiyotiklere dair bulgularımız yorumlandığında, yapılan çoğu çalışma ile benzer olarak biyofilm ortamında direnç oranı artmasına rağmen, suşların %28'i amikasine, %13'ü tobramisine duyarlı olarak kalmıştır. Amikasin MİK değer aralıkları 0,008-4 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %16'sı dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 0,03-4 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızın amikasin için Hill ve ark. çalışması ile farklılık göstermesi, çalışmalarında yer alan 16 suşun tamamının MİK değerlerine göre de dirençli olmasından ötürü olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda, gentamisin MİK değer aralıkları <0,25-32 µg/ml bulunmuş, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 64->1024 µg/ml olarak bulunmuştur. EUCAST kriterleri uyarınca organizmanın veya grubun ajanla tedavi için iyi bir hedef olduğuna dair yeterli kanıt olmadığı yorumu bulunduğundan suşlar duyarlı veya dirençli olarak yorumlanamamıştır. Ancak gentamisin MİK değerleri amikasin ve tobramisinle uyum gösterse de, MBEK değer aralığı en yüksek olan aminoglikozid antibiyotik olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, tobramisin MİK değer aralıkları 0,008-4 µg/ml bulunmuş, bu değer aralıklarına göre suşların %16'sı dirençli saptanırken, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere MBEK değer aralıkları 0,03 - 4 µg/ml olarak bulunmuştur.

QS inhibitörü olarak bilinen bir makrolid antibiyotik olan azitromisin, KF hastalarının klinik durumlarında görülen iyileşme nedeniyle *P.aeruginosa*'nın neden olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde rağbet görmektedir (284, 285). Azitromisinin etki mekanizmaları çoktur; anti-inflamatuar etki, aljinat üretiminin inhibisyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve/veya QS sisteminin ve virülans faktörlerinin inhibisyonu bunlardan bazılarıdır (286). KOAH, bronşektazi veya KF hastalarında *P.aeruginosa*'ya bağlı kronik solunum yolu enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Yoğun bakım ünitesindeki entübe hastalarda ventilasyonla ilişkili

pnömoniyi önleme eğilimi göstererek ve QS ile düzenlenen virülans özelliklerinin aktivasyonunu önemli ölçüde azaltarak tedaviye katkı sağlamıştır (287). Eritromisin, klaritromisin ve azitromisin uygulamasının kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların klinik semptomlarını ve prognozunu iyileştirdiği bildirilmiştir. Kumon ve ark. mukoid *P.aeruginosa* suşunda çeşitli antibiyotiklerin penetrasyonunu inceledikleri çalışmalarında azitromisinin iyi penetrasyon gösterdiğini saptamışlardır (280). Ali ve ark. çeşitli antibiyotiklerin biyofilm üreten *P.aeruginosa* suşlarının bakterisidal aktivitesini belirledikleri çalışmalarında, azitromisinin %100 oranında penetre olduğunu göstermişlerdir (271).

Moskowitz ve ark. 41 KF hastasından elde ettikleri 94 *P.aeruginosa* suşu ile yaptıkları kapsamlı çalışmada, azitromisinin *P.aeruginosa* biyofilmlerine karşı oldukça aktif olduğunu belirlemişlerdir (259). KF hastalarında kullanılan antibiyotiklerle 57 non mukoid *P.aeruginosa* suşunda erken biyofilm oluşumunun *in vitro* önlenmesi isimli çalışmalarında Fernández-Olmos ve ark. azitromisin planktonik formunda MİK değer aralıklarını 32–128 µg/ml, biyofilm ortamında ise 1–256 µg/ml arasında bulmuştur (273). Yamabe ve ark. 2020 yılında Japonya'da makrolidlerin *Acinetobacter baumannii* üzerindeki doğrudan anti-biyofilm etkilerini araştırdıkları çalışmalarında peg temelli biyofilm yöntemini kullanarak azitromisinin anti-biyofilm etkisinin en güçlü olduğunu, 8 µg/mL'lik bir konsantrasyonda biyofilm biyokütlesini %100 eradike ettiğini saptamışlardır (288).

OS inhibitörü olarak ve biyofilm oluşturan suşlarda iyi bir tercih olabileceğini bildiren çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda azitromisinin biyofilm ortamındaki duyarlılıkları incelenmiştir. EUCAST ve CLSI kılavuzlarında *P.aeruginosa* suşları için azitromisin MİK sınır değerleri bulunmamaktadır. Makrolid grubu antibiyotik olan azitromisine dair bulgularımız yorumlandığında, yapılan az sayıda diğer çalışmalarla benzer olarak biyofilm ortamında etkin olabileceği görülmektedir. Çalışmamızda, azitromisin MİK değer aralıkları 0,5-2 µg/ml bulunmuş, MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 4-256 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, azitromisin MİK sonuçları Fernández-Olmos ve ark. değer aralıklarından düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin çalışmanın yapıldığı ülkedeki tedavi protokollerinden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Ancak MBEK değer aralıklarımız

benzerlik göstermiş olup, elde ettiğimiz en yüksek 256 µg/ml'lik konsantrasyon ilgi çekici bir bulgudur.

Çoğu antimikrobiyal peptitin, aminoglikozidlere benzer şekilde pozitif yüklü olması, *P.aeruginosa* biyofilmlerinin aminoglikozidlere karşı toleransında rol oynayan bazı mekanizmaların, antimikrobiyal peptitlere karşı da biyofilm toleransında rol oynamasına sebep olmaktadır. Örneğin, antimikrobiyal peptitlerin, eDNA gibi negatif yüklü biyofilm matriks bileşenleri tarafından bağlanmasının ve ek olarak Psl ve EPS'nin, kolistin ve polimiksin B'ye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (278). Kolistin, *in vitro* olarak *P.aeruginosa* biyofilmlerinin yalnızca bölünmeyen orta kısmına karşı aktiftir, oysa yüzeysel, biyofilmin metabolik aktif kısmı, iki bileşenli düzenleyici sistemlerden PmrA-PmrB'nin yukarı regülasyonu nedeniyle LPS'nin lipid A'sına aminoarabinoz eklenmesine yol açan katyonik peptitlere karşı adaptif dirençte toleranslı hale gelmektedir (259, 289, 290) Pmr/arn operonunun yukarı regülasyonu, MexAB-OprM dışa atım pompasının aktivasyonu ile birlikte *P.aeruginosa* biyofilmlerinin kolistin toleransında rol oynamaktadır (289). Ayrıca, Chiang ve ark. mexCD-oprJ ve muxABC-opmB genleri tarafından kodlanan dışa atım pompalarının da kolistin maruziyetine yanıt olarak eksprese edildiğini gösterilmiştir (291). Kolistinin, metabolik olarak aktif periferik alt popülasyonu ortadan kaldıramadığı, ancak biyofilmin daha derin katmanlarındaki metabolik olarak aktif olmayan alt popülasyonu ortadan kaldırmada etkili olduğu belirlenmiştir (289). Bu durum, anaerobik koşullar altında oluşan *P.aeruginosa* biyofilmleri üzerinde kolistinin artan bakterisidal aktivitesini gösteren verilerle uyumludur (292). Haagensen ve ark. *P.aeruginosa*'nın, biyofilm oluşumunun erken aşamalarında kolistin tedavisine daha dirençli olduğunu gözlemlemişlerdir (290). Kumon ve ark. mukoid *P.aeruginosa* suşunda çeşitli antibiyotiklerin penetrasyonunu inceledikleri çalışmalarında polimiksin B ve kolistin de 24 saat sonra aljinattan penetrasyon göstermediğini saptamışlardır (280).

Moskowitz ve ark. yaptıkları çalışmanın bir diğer kısmında 20 *P.aeruginosa* suşu üzerinde kolistinin MİK ve BİK değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kolistinin antipsödomonal aktivite gösterdiğini, ancak önemli bir antibiyofilm aktivitesi göstermediğini saptamışlardır (259). Hill ve ark. aerobik, anaerobik ve biyofilm koşullarında KF'li hastalardan elde edilen *P.aeruginosa* suşlarının çeşitli gruplardan antibiyotik duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında, biyofilm ortamında antimikrobiyal duyarlılık etkinliğinin belirgin şekilde azaldığını tespit etseler de

kolistinin en etkili tek ajan olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak biyofilm koşulları altında test edilen 16 suşun yalnızca 4'ü (%25) eradike edilebilmiştir (251). 2021 yılında Aguilar ve ark. biyofilm ortamında KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına karşı murepavadinin tobramisin, kolistin ve aztreonam ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, kolistinin planktonik hücrelere karşı en iyi etkinliği gösterdiğini, ancak $MBEK_{50}$ değerini $MİK_{50}$ değerinin 64 katı olarak saptamışlardır (258). Serramitjana ve ark. İspanya'da nanokapsüllenmiş kolistin sülfatın KF hastalarından izole edilen *P.aeruginosa* üzerindeki öldürücü etkisini araştırdıkları çalışmalarında tüm suşların serbest kolistine duyarlı (MİK≤ 4 µg/mL) olduğunu ancak biyofilmi tamamen eradike etmek için gereken kolistin konsantrasyonlarının 640-2560 µg/mL arasında değiştiğine dikkat çekmişlerdir (239). Hengzhuang ve ark. KF'li hastalarda kronik *P.aeruginosa* ile enfekte hastalarda kolistin doz rejimini optimize etmek için yaptıkları çalışmalarında kullandıkları standart mukoid ve non mukoid *P.aeruginosa* suşlarının MİK değerlerini 2 mg/L, MBEK değerlerini ise 128 mg/L bulmuşlardır. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda, antibiyotik tedavisinin başarısız olmaması için doz rejimlerini optimize ederken MBİK veya MBEK gibi parametrelerin dikkate alınması gerektiği yorumuna varmışlardır (293).

Polimiksin grubu antibiyotiklere dair bulgularımız yorumlandığında, yapılan çoğu çalışma ile benzer olarak biyofilm ortamında kolistin etkisiz bulunmuştur. Çalışmamızda, kolistin MİK değer aralıkları 0,008-4 µg/ml bulunmuş, hiç dirençli suş saptanmayarak bu bulgu planktonik bakterilerde önemini koruduğunu göstermiştir. MBEK değer aralıkları çalışılan suşların tamamı, standart *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve biyofilm pozitif *P.aeruginosa* ATCC 47085 suşları da dahil olmak üzere 128-512 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızın MBEK sonuçlarının, Hengzhuang ve ark.'ndan yüksek çıkmasının sebebinin, çalışmalarında sadece iki adet standart suş kullandıklarından dolayı olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürdeki bu çalışmalara ilave olarak, solunum yolu atakları olan KF'li hastalarda peg temelli biyofilm duyarlılık testlerinin uygulanmasının, klinik iyileşme üzerine etkisinin retrospektif olarak irdelendiği bir çalışmada, MBEK sonucuna göre yapılan tedavinin balgamda bakteri yoğunluğunun ve atak süresinin belirgin oranda azalttığı belirlenmiştir. Çalışmaları sonucunda, geleneksel antimikrobiyal duyarlılık testlerinin biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda güvenilir bir şekilde kullanılamayacağı

yorumuna varmışlardır. Ancak araştırmacılar çalışmanın retrospektif olmasından ötürü bazı kısıtlılıkları olduğunu belirtmişlerdir (294).

Çalışmamızdaki kısıtlılıklardan biri, -80°C'de muhafaza edilen bakterilerin çalışma esnasında dondurup çözmeye maruz kalmasının olası etkisi farklı sürelerde stokta beklemesi olarak karşımıza çıkmıştır. Çalışmanın diğer bir kısıtlılığı, elde edilen suşların mikroçevresinin oksijen oranlarının farklı olmasına rağmen, biyofilm oluşturduğumuz ortamın sadece aerobik olmasıdır. Bir diğer kısıtlılık, ortamdaki besin maddelerinin azalması, konak-patojen etkileşiminin, oluşturulan hareketin *in vivo* hareket ile eş değer olmaması ve konak hücrelerinin hepsinin *in vitro* ortama eklenememesi gibi nedenlerle elde edilen *in vitro* sonuçların *in vivo* ortamı tam olarak yansıtamamasıdır. Örneğin KF'li hastaların akciğer enfeksiyonunu incelemek için musin ile desteklenmiş ortamda biyofilm oluşumu sağlanmalıdır (295). Çalışmamızda, kullandığımız 96 kuyucuklu düz tabanlı Nunc™ MicroWell™ plağı ve bu plağa uygun 96 adet pegleri içeren Nunc™ Immuno TSP Lids kapaktan oluşan iki parçalı sistem, Calgary biyofilm cihazına göre nispeten daha ucuz olmasına rağmen kullanım aşamasında kırılmayan peglerden dolayı her kontrol için farklı mikroplak kullanılması bu yöntemin dezavantajıdır. Bir başka kısıtlılık ise, KF'li hastalarda rutinde kombine antibiyotik tedavisi uygulanmasına rağmen peg temelli biyofilm yöntemi için kullanılan mikroplakların maliyetinden ötürü çalışmamızda sinerji testlerinin uygulanamamış olmasıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda biyofilm ortamında antimikrobiyal duyarlılık testlerini belirlemek için kullandığımız pegleri içeren kapaklar ve bu kapaklara uygun mikroplaklardan oluşan yöntem uygulanabilir, tekrarlanabilir ve pratik bulunmuştur. Tedaviye yanıtı arttırmak amacıyla, hastanemizde rutinde kullanılan antibiyotik tedavi başarısının *in vitro* olarak araştırıldığı çalışmamızın sonuçları MİK ve MBEK uyumu açısından değerlendirildiğinde, bu enfeksiyonlara neden olan *P.aeruginosa* suşları için siprofloksinin, amikasinin, tobramisinin ve azitromisinin biyofilm üzerine en etkili antibiyotikler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda test edilen diğer antimikrobiyallerden seftazidim, meropenem, aztreonam, levofloksasin ve kolistin biyofilm ortamında %100 dirençli hale gelmiştir. Bu veriler; KF'li hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarına bağlı solunum yolu enfeksiyonlarda tedavideki başarısızlığının, suşların biyofilm oluşturması ile paralel olduğunu düşündürmektedir. Biyofilm oluşturmuş suşların varlığında tedaviden cevap alınamamasının nedeni araştırmalardan da görüldüğü üzere

rutinde yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinin plantonik hücrelere karşı uygulanması, ancak biyofilm oluşturmuş suşların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının çok farklı olmasıdır. Mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneğinin bilinmesi ve sonrasında buna dikkat edilerek antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması için MBEK değerlerinin belirlenmesinin tedavi başarısı açısından daha faydalı bir yaklaşım olacağı kanaatindeyiz. Fakat, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların değerlendirilebilmesi için standart bir prosedür bulunmadığından, ileriki dönemlerde MBEK sonuçları için standart bir değerlendirme tablosuna gerek duyulmaktadır. Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin MBEK değerleri MİK değerleri ile karşılaştırıldığında ortalama 32-1024 kat daha fazla olduğu görülmektedir. *İn vitro* çalışmalar biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavi protokollerinin belirlenmesinde antimikrobiyal duyarlılık testlerinin biyofilm ortamında çalışılmasının gerekli olduğunu gösterse de, klinik yanıta olan etkiler henüz pek net olmadığından, prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyofilm çalışmaları; Biyofilm oluşumunun önlenmesini, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisini, biyofilm inhibisyonunu veya eradikasyonunu sağlayan yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması ve bu enfeksiyonlarla mücadele edebilmek için oldukça önemlidir.

Gelecekteki çalışmalarda, çeşitli antimikrobiyal kombinasyonların MBEK sonuçlarının belirlenmesi, bu kombinasyonların biyofilm oluşturulmuş hayvan modelleriyle denenmesi ve *in vivo* ortamda yapılacak yeni çalışmalar KF'li hastalarda *P.aeruginosa*'ya bağlı solunum yolu enfeksiyonlarının eradikasyonuna katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

# 6. KAYNAKLAR


1. Davies JC, Alton EW, Bush A. Cystic fibrosis. *BMJ*. 2007; **335**(7632): 1255-1259. doi:10.1136/bmj.39391.713229.AD.
2. Donaldson SH, Wolfgang MC, Gilligan PH, Boucher RC, JR. Cystic Fibrosis. İçinde Mandell GL, Berrett JE ve Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* (7th ed). Elsevier Press; 2010. s. 947-955).
3. Henry DA, Speert DP. Pseudomonas. İçinde Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. Vol.1. (10th ed) Washington DC, ASM Press; 2011. S. 677-691.
4. Ulusal Kistik Fibrozis Kayıt Sistemi 2020 Verileri. Erişim 01.01.2022, https://www.kistikfibrozisturkiye.org/wp-content/uploads/2021/12/2020-UKKS-raporu-1.pdf.
5. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000; **407**(6805): 762-764. doi:10.1038/35037627.
6. 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. *J Clin Microbiol*. 1999; **37**(6): 1771-1776. doi:10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999.
7. Beaudet AL. Carrier screening for cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*. 1990; **47**(4): 603-605.
8. Türk Toraks Derneği. Kistik fibrozis tanı ve tedavi rehberi. *Türk Toraks Dergisi* 2011; **12**(2): 1-140.
9. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002; **15**(2): 194-222. doi:10.1128/CMR.15.2.194-222.2002
10. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumitech 43, *Cystic Fibrosis Microbiology*. Washington DC: ASM Press; 2006. s. 2-7.
11. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959; **23**(3): 545-549.
12. Shwachman H, Mahmoodian A. Pilocarpine iontophoresis sweat testing results of seven years' experience. *Bibl Paediatr*. 1967; **86**: 158-182.
13. Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzy JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*. 1983; **221**(4615): 1067-1070. doi:10.1126/science.6308769.
14. Norris RF, Tyson RM. The Pathogenesis of Polycystic Pancreas: Reconstruction of Cystic Elements in One Case. *Am J Pathol*. 1947; **23**(3): 485-499.
15. Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N, et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*. 1985; **318**(6044): 380-382. doi:10.1038/318380a0.
16. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published correction appears in Science 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science*. 1989; **245**(4922): 1066-1073. doi:10.1126/science.2475911.
17. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic

fibrosis in cftr(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; **96**(24): 13995-14000. doi:10.1073/pnas.96.24.13995.
18. Walters S, Mehta A. Epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes DM, Bush A, eds. *Cystic fibrosis*, 3rd edn. London: Edward Arnold Ltd; 2007. 21-45.
19. Scotet V, Gillet D, Duguépéroux I, et al. Spatial and temporal distribution of cystic fibrosis and of its mutations in Brittany, France: a retrospective study from 1960. *Hum Genet*. 2002; **111**(3): 247-254. doi:10.1007/s00439-002-0788-1.
20. Bossi A, Casazza G, Padoan R, Milani S; Assemblea Dei Direttori Dei Centri. What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the National Registry (1988-2001). *Hum Biol*. 2004; **76**(3): 455-467. doi:10.1353/hub.2004.0040.
21. Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M Jr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr*. 1998; **132**(2): 255-259. doi:10.1016/s0022-3476(98)70441-x.
22. Dodge JA, Morison S, Lewis PA, et al. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. UK Cystic Fibrosis Survey Management Committee. *Arch Dis Child*. 1997; **77**(6): 493-496. doi:10.1136/adc.77.6.493.
23. Dogru D, Çakır E, Şişmanlar T, et al. Cystic fibrosis in Turkey: First data from the national registry. *Pediatr Pulmonol*. 2020; **55**(2): 541-548. doi:10.1002/ppul.24561.
24. FF, About the Cystic Fibrosis. (Erişim 03.01.2018, https://www.cff.org/What-is-CF/About-CysticFibrosis/).
25. Kumar S, Tana A, Shankar A. Cystic fibrosis--what are the prospects for a cure?. *Eur J Intern Med*. 2014; **25**(9): 803-807. doi:10.1016/j.ejim.2014.09.018.
26. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; **168**(8): 918-951. doi:10.1164/rccm.200304-505SO.
27. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; **352**(19): 1992-2001. doi:10.1056/NEJMra043184.
28. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2013; **22**(127): 58-65. doi:10.1183/09059180.00008412.
29. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003; **361**(9358): 681-689. doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6.
30. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; **24**(1): 29-70. doi:10.1128/CMR.00036-10.
31. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*. 2009; **136**(6): 1554-1560. doi:10.1378/chest.09-0132.
32. Rajan S, Saiman L. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect*. 2002; **17**(1): 47-56. doi:10.1053/srin.2002.31690.
33. The Cystic Fibrosis Foundation. Erişim 01.01.2022, https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry.
34. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading)*. 2007; **153**(Pt 4): 917-923. doi:10.1099/mic.0.2006/004077-0.
35. Thomassen MJ, Klinger JD, Badger SJ, van Heeckeren DW, Stern RC. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1984; **104**(3): 352-356. doi:10.1016/s0022-3476(84)81094-x.

36. Henig NR, Tonelli MR, Pier MV, Burns JL, Aitken ML. Sputum induction as a research tool for sampling the airways of subjects with cystic fibrosis. *Thorax*. 2001; **56**(4): 306-311. doi:10.1136/thorax.56.4.306.
37. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1996; **21**(5): 267-275. doi:10.1002/(SICI)1099-0496(199605)21:5<267:AID-PPUL1>3.0.CO;2-K.
38. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, et al. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999; **28**(5): 321-328. doi:10.1002/(sici)1099-0496(199911)28:5<321::aid-ppul3>3.0.co;2-v.
39. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; **103**(48): 18131-18136. doi:10.1073/pnas.0606428103.
40. Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M. Nucleic Acid Homologies in the Genus Pseudomonas. *INT. J. SYST. BACTERIOL*. 1973; **23**(4): 333-39.
41. Bilgehan H, editör. Fermentasyon yapmayan gram olumsuz bakteriler. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları*. İzmir, Fakülteler Kitapevi; 2000. s. 422.
42. Erdem B. Pseudomonaslar. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Güneş Kitabevi; 1999. s. 551-558.
43. Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; **97**(9): 4885-4890. doi:10.1073/pnas.060030097.
44. Gür D. Hastane enfeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*. 2003; **7**(3): 111-117.
45. Koneman E, Stephan DA, William MJ, Schreckenberger PC, Winn CW Jr. The nonfermentative Gram-negative bacilli. *Konoman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott* 2006. 303-391.
46. Baron E, Finegold S, *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 7th ed. Mosby Co, St Louis, 1986. s. 422-424.
47. Meyer JM. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species. *Arch Microbiol*. 2000; **174**(3): 135-142. doi:10.1007/s002030000188.
48. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007; **67**(3): 351-368. doi:10.2165/00003495-200767030-00003.
49. Speert DP, Campbell ME, Henry DA, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; **166**(7): 988-993. doi:10.1164/rccm.2203011.
50. Grothues D, Koopmann U, von der Hardt H, Tümmler B. Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol*. 1988; **26**(10): 1973-1977. doi:10.1128/jcm.26.10.1973-1977.1988.
51. Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*. 2004; **59**(4): 334-336. doi:10.1136/thx.2003.014258.

52. Anthony M, Rose B, Pegler MB, et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002; **40**(8): 2772-2778. doi:10.1128/JCM.40.8.2772-2778.2002; 40: 2772-2778.
53. Woods DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*. 2004; **12**(10): 437-439. doi:10.1016/j.tim.2004.08.003.
54. Doyle TB, Hawkins AC, McCarter LL. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2004; **186**(19): 6341-6350. doi:10.1128/JB.186.19.6341-6350.2004.
55. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*. 1994; **62**(2) :596-605. doi:10.1128/iai.62.2.596-605.1994.
56. Pier GB, Ramphal R, editor. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Edition, Elsevier Inc; Philadelphia, USA, Pennsylvania, 2005. pp. 2587-2615.
57. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006; **36**(2): 78-91. doi:10.1016/j.medmal.2005.10.007.
58. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, DC, USA, ASM Press; 1994. pp. 260-268.
59. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*. 1995; **61**(3): 860-867. doi:10.1128/aem.61.3.860-867.1995.
60. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol*. 2001; **183**(18): 5395-5401. doi:10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001.
61. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; **100**(13): 7907-7912. doi:10.1073/pnas.1231792100.
62. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*. 1998; **4**(4): 551-560. doi:10.3201/eid0404.980405.
63. Hobden JA. *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. *DNA Cell Biol*. 2002; **21**(5-6): 391-396. doi:10.1089/10445490260099674.
64. Kipnis E, Guery BP, Tournoys A, et al. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock*. 2004; **21**(5): 444-451. doi:10.1097/00024382-200405000-00008.
65. Howe TR, Iglewski BH. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun*. 1984; **43**(3): 1058-1063. doi:10.1128/iai.43.3.1058-1063.1984.
66. Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; **285**(3): L584-L592. doi:10.1152/ajplung.00086.2003.

67. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*. 2004; **72**(7): 4275-4278. doi:10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004
68. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*. 2001; **35**:4 39-468. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913.
69. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1996; **64**(2):518-523. doi:10.1128/iai.64.2.518-523.1996.
70. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**(10): 7072-7077. doi:10.1073/pnas.092016999.
71. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P.aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol (1985)*. 1993; **75**(4): 1661-1669. doi:10.1152/jappl.1993.75.4.1661.
72. Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol*. 1990; **4**(4): 527-535. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00620.x.
73. Woods DE, Iglewski BH. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis*. 1983; 5 **Suppl 4**: S715-S722. doi:10.1093/clinids/5.supplement_4.s715.
74. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon*. 1993; **31**(1): 27-34. doi:10.1016/0041-0101(93)90353-k.
75. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. İçinde Mandell GL, Berrett JE ve Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* (7th ed). Elsevier Press; 2010. s. 2835-2860.
76. Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Eur J Clin Microbiol*. 1985; **4**(2): 175-179. doi:10.1007/BF02013593.
77. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*. 2004; **72**(12): 6969-6977. doi:10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004.
78. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res*. 2004; **95**(2): 196-203. doi:10.1161/01.RES.0000134922.25721.d9.
79. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun*. 2000; **68**(7): 3998-4004. doi:10.1128/IAI.68.7.3998-4004.2000.
80. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA, van Delden C. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiol*. 2007; **7**: 33. Published 2007 Apr 18. doi:10.1186/1471-2180-7-33.
81. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect. 2000; **2**(14): 1721-1731. doi:10.1016/s1286-4579(00)01327-7.

82. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021; **81**(18): 2117-2131. doi:10.1007/s40265-021-01635-6.
83. Kiska D, Gilligan PH. Pseudomonas. Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editor. *Mannual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press; 1999.
84. Palleroni NJ. Pseudomonas. İçinde Borriello SP, Murray PR, Funke G, editor. *Topley-Wılson's Microbiology & Microbial Infections, Bacteriology* volume 2, 10th ed. Edward Arnold Ltd. Mayo Foundation; 2005. s. 1591-1606.
85. Hall GS. Nonfermenting and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. İçinde Mohan CR, Lehman DC, Manuselis G, editor. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fourth ed. Saunders- Elsevier Press; 2011. s. 482-503.
86. EUCAST. Erişim 12.12.2021, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2022/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.1_20220325.pdf.
87. EUCAST. Erişim 12.12.2021, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf.
88. Hancock RE, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002; **56**: 17-38. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160310.
89. Rice LB, Bonomo RA. The Red Menace: Emerging Issues in Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacilli. *Curr Infect Dis Rep*. 1999; **1**(4): 338-346. doi:10.1007/s11908-999-0040-4.
90. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis*. 1998; **27 Suppl 1**: S32-S41. doi:10.1086/514920.
91. Helfand MS, Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; **5**(5): 452-458. doi:10.1016/j.coph.2005.04.013.
92. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; **57**(10): 1451-1470. doi:10.1016/j.addr.2005.04.002.
93. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, et al. Mutations in β-Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; **59**(10): 6248-6255. doi:10.1128/AAC.00825-15.
94. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; **18**(4): 657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
95. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010; **2**(3): 263-274. doi:10.4103/0974-777X.68531.
96. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010; **23**(1): 160-201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
97. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010; **13**(6): 151-171. doi:10.1016/j.drup.2010.08.003.
98. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**(2): 479-487. doi:10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.

99. Jacoby GA, Blaser MJ, Santanam P, et al. Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; **34**(12): 2381-2386. doi:10.1128/AAC.34.12.2381.

100. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom*. 2018; **101**(2): 162-171. doi:10.1111/cxo.12621.
101. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011; **19**(8): 419-426. doi:10.1016/j.tim.2011.04.005.
102. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**(11): 4062-4070. doi:10.1128/AAC.00148-07.
103. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE, Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; **53**(6): 2483-2491. doi:10.1128/AAC.00428-08.
104. Fernández L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance [published correction appears in Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):163]. *Clin Microbiol Rev*. 2012; **25**(4): 661-681. doi:10.1128/CMR.00043-12.
105. Fang ZL, Zhang LY, Huang YM, et al. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol*. 2014; **21**: 124-128. doi:10.1016/j.meegid.2013.10.027.
106. Braz VS, Furlan JP, Fernandes AF, Stehling EG. Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2016; **363**(16): fnw166. doi:10.1093/femsle/fnw166.
107. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Morrow BJ, et al. Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; **53**(7): 2785-2790. doi:10.1128/AAC.00018-09.
108. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; **46**(8): 2696-2699. doi:10.1128/AAC.46.8.2696-2699.2002.
109. El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(3): 1016-1021. doi:10.1128/AAC.00704-06.
110. Boll M, Radziejewska-Lebrecht J, Warth C, Krajewska-Pietrasik D, Mayer H. 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1994; **8**(4): 329-341. doi:10.1111/j.1574-695X.1994.tb00460.x.
111. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; **55**(12): 5761-5769. doi:10.1128/AAC.05391-11.

112. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol*. 2004;186(2):575-579. doi:10.1128/JB.186.2.575-579.2004.
113. Owusu-Anim D, Kwon DH. Differential Role of Two-Component Regulatory Systems (*phoPQ* and *pmrAB*) in Polymyxin B Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microbiol*. 2012;2(1):10.4236/aim.2012.21005. doi:10.4236/aim.2012.21005.
114. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016; **4**(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
115. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2006; **43 Suppl 2**: S49-S56. doi:10.1086/504477.
116. Cavalcanti FL, Mirones CR, Paucar ER, et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; **110**(8): 1003-1009. doi:10.1590/0074-02760150233.
117. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015; **47**(2): 81-97. doi:10.3947/ic.2015.47.2.81.
118. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ. Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(3): 530-536. doi:10.1093/jac/dkl266.
119. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**(12): 4654-4661. doi:10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004.
120. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Emergence of NDM - 1 in the Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. *J Clin Diagn Res*. 2013; **7**(7): 1328-1331. doi:10.7860/JCDR/2013/5509.3137.
121. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016; **8**(3): 253-267. doi:10.1002/wsbm.1335.
122. Taylor PK, Yeung AT, Hancock RE. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol*. 2014; **191**: 121-130. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.09.003.
123. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009; **373**(9678): 1891-1904. doi:10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
124. Döring G, Hoiby N; Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2004; **3**(2):67-91. doi:10.1016/j.jcf.2004.03.008.
125. Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, et al. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS One*. 2010; **5**(9): e12669. Published 2010 Sep 10. doi:10.1371/journal.pone.0012669.

126. Høiby N. Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. *Paediatr Drugs*. 2000; **2**(6): 451-463. doi:10.2165/00128072-200002060-00004.
127. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2003; **9**(6): 486-491. doi:10.1097/00063198-200311000-00007.

128. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; **34**(2): 91-100. doi:10.1002/ppul.10127.
129. Schaedel C, de Monestrol I, Hjelte L, et al. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002; **33**(6): 483-491. doi:10.1002/ppul.10100.
130. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med*. 2016; **16**(1): 174. Published 2016 Dec 5. doi:10.1186/s12890-016-0339-5.
131. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa*–pathogenesis and pathogenic mechanisms. Int J Biol. 2015; **7**(2): 44-67. doi:10.5539/ijb.v7n2p44.
132. Tiddens HAWM, Rosenfeld M. Respiratory Manifestations. Cystic Fibrosis. In: Taussig LM, Landau LI, Le Souef PN, Martinez FD, Morgan WJ, Sly PD; eds. Pediatric Respiratory Medicine. 2nd ed. Philadelphia; Mosby-Elsevier, 2008. 871-887.
133. Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis [published correction appears in N Engl J Med 1996 Oct 10; **335**(15):1167]. *N Engl J Med*. 1996;335(3):179-188. doi:10.1056/NEJM199607183350307.
134. Wolter JM, Bowler SD, Nolan PJ, McCormack JG. Home intravenous therapy in cystic fibrosis: a prospective randomized trial examining clinical, quality of life and cost aspects. *Eur Respir J*. 1997; **10**(4): 896-900.
135. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med*. 1999; **340**(1): 23-30. doi:10.1056/NEJM199901073400104.
136. Murphy TD, Anbar RD, Lester LA, et al. Treatment with tobramycin solution for inhalation reduces hospitalizations in young CF subjects with mild lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2004; **38**(4): 314-320. doi:10.1002/ppul.20097.
137. Dinwiddie R. Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005; **4 Suppl 2**: 45-48. doi:10.1016/j.jcf.2005.05.010, Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2004; **54**(1): 21-28. doi:10.1093/jac/dkh309.
138. Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları ve Kistik Fibrozis Derneği. Hekimler için "Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi. Erişim 2020, https://www.kistikfibrozisturkiye.org/wp-content/uploads/2020/01/Hekim-KF-kitapcik-son-basilan.pdf.
139. Wolfensberger A, Sax H, Weber R, Zbinden R, Kuster SP, Hombach M. Change of antibiotic susceptibility testing guidelines from CLSI to EUCAST: influence on cumulative hospital antibiograms. *PLoS One*. 2013; **8**(11): e79130. Published 2013 Nov 1. doi:10.1371/journal.pone.0079130.
140. Garcia, Lynne Shore; Isenberg, Henry D. 3rd ed. / editor in chief, third edition and 2007 update, Lynne S. Garcia. Washington, DC: ASM Press; 2010.

141. Shetty N., Tang JW. ve Andrews J. Infectious Disease Pathogenesis, Prevention and Case Studies. 1 th Ed., Wiley-Blackwell; İngiltere, 2009. s. 132.).
142. Yao JDC. ve Moellering RC. Antibakteriyel ajanlar. İçinde Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Köksal İ. (Çeviren). 9. Baskı, 1.cilt, Atlas Kitapçılık; Ankara, 2009, s. 1077-1137.

143. Leblebicioğlu H. Parenteral sefalosporinler. İçinde Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, editor. *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*. Bilimsel Tıp Yayınevi; Ankara, 2008, s. 285-298.
144. Özdemir M, Erayman G, Türkdağı H, Baykan M. ve Baysal B. Hastane enfeksiyonu etkeni Pseudomonas suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg.* 2009; **23**(3): 122-126.
145. Hancock RE. The *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability barrier and how to overcome it. *Antibiot Chemother (1971)*. 1985; **36**: 95-102. doi:10.1159/000410475.
146. Raza A, Ngieng SC, Sime FB, et al. Oral meropenem for superbugs: challenges and opportunities. Drug Discov Today. 2021; 26(2): 551-560. doi:10.1016/j.drudis.2020.11.004.
147. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. J Antimicrob Chemother. 1995; 36 Suppl A: 1-17. doi:10.1093/jac/36.suppl_a.1.
148. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012; **302**(2): 63-68. doi:10.1016/j.ijmm.2011.10.001.
149. Sander CC, Thomson KS, Sanders WE. Other ß-lactam antibiotics. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds]. Infectious Diseases. First edition, Philadelphia: WB Saunders, 1992: 182-8.
150. Chambers HF, Neu HC. Other ß-lactam antibiotics. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fourth edition, New York: Curhchill Livingstone, 1995: 264-72.
151. Akova M. Monobaktamlar. Editör. Akalın HE. *Klinik uygulamada antibiyotikler ve diğer antimikrobik ilaçlar,* 1. baskı, Ankara: Feryal Matbaası; 1994. s. 123-31.
152. Neu HC. Aztreonam activity, pharmacology, and clinical uses. *Am J Med*. 1990; **88**(3C): 2S-42S. doi:10.1016/0002-9343(90)90079-s.
153. Aydın K. Makrolidler ve Linkozamidler. *Ankem Derg*. 2007; **21**(Ek 2): 57-61.
154. Alvarez-Elcoro S, Enzler MJ. The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin Proc*. 1999; **74**(6): 613-634. doi:10.4065/74.6.613.
155. Chambers HF. The Aminoglycosides. İçinde Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG editor. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman & Gilman's; USA: 2001. pp. 1219-38.
156. Ahmad MH, Rechenmacher A, Böck A. Interaction between aminoglycoside uptake and ribosomal resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980; **18**(5): 798-806. doi:10.1128/AAC.18.5.798.
157. Bryan LE. Antibiotic uptake and the cytoplasmic membrane. *Antibiot Chemother (1971)*. 1985; **36**: 103-110. doi:10.1159/000410476, Hancock RE. The *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability barrier and how to overcome it. *Antibiot Chemother (1971)*. 1985; **36**: 95-102. doi:10.1159/000410475.

158. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. 2005; **41 Suppl 2**: S113-S119. doi:10.1086/428051.
159. Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; **16**(1): 5-15. doi:10.1016/s0924-8579(00)00192-8.
160. Davis R, Bryson HM. Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1994; **47**(4): 677-700. doi:10.2165/00003495-199447040-00008.
161. Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis*. 2005; **41 Suppl 2**: S113-S119. doi:10.1086/428051.
162. Hooper DC. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis*. 2000; **30**(2): 243-254. doi:10.1086/313677.
163. Martin AR. Antibacterial Antibiotics. İçinde Delgado JN, Remeks WA editor. *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 10. ed. Lippincott, Raven; 1998. pp. 253-325.
164. Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K. A new antibiotic "colistin" produced by spore-forming soil bacteria. *J Antibiot*. 1950; **3**: 457-458.
165. Hoeprich PD. The polymyxins. *Med Clin North Am*. 1970; **54**(5): 1257-1265.
166. Schwartz BS, Warren MR, Barkley FA, Landis L. Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistinmethanesulfonate. *Antibiot Annu*. 1959; **7**: 41-60.
167. Colistin. İçinde O' Neil MJ, Smith A, Haeckelman PE, Obenchain JR, Gallipeau JAR, D'Arecca MA editörler. *An Encylopedia of Chemical, Drugs and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co Inc.; 13th ed. 2001. pp. 433-4.
168. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**(6): 1317-1323. doi:10.1128/AAC.43.6.1317.
169. Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun*. 1996; **64**(12): 4922-4927. doi:10.1128/iai.64.12.4922-4927.1996.
170. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; **25**(1): 11-25. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001.
171. EUCAST. Erişim 12.12.2021, https://www.eucast.org/expert_rules_and_expected_phenotypes/.
172. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections [published correction appears in Clin Infect Dis. 2006 Jun 15;42(12):1819. Dosage error in article text]. *Clin Infect Dis*. 2005; **40**(9): 1333-1341. doi:10.1086/429323/.
173. Hancock RE, Bell A. Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988; **7**(6): 713-720. doi:10.1007/BF01975036.
174. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; **8**(9): 881-890. doi:10.3201/eid0809.020063.
175. Jones HC, Roth IL, Sanders WM 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*. 1969; **99**(1): 316-325. doi:10.1128/jb.99.1.316-325.1969.
176. Costerton J, Geesey G, Cheng K. How bacteria stick. *Scientific American.* 1978; **238**(1): 86-95/**.**

177. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; **15**(2): 167-193. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
178. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010; **8**(5): 340-349. doi:10.1038/nrmicro2313.
179. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; **49**: 711-745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
180. Fletcher M, Loeb GI. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 1979; **37**(1): 67-72. doi:10.1128/aem.37.1.67-72.1979.
181. Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 1983; **45**(3): 811-817. doi:10.1128/aem.45.3.811-817.1983.
182. Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol*. 1993; **59**(11): 3973-3977. doi:10.1128/aem.59.11.3973-3977.1993.
183. Lappin Scott HM Costerton JW. Microbial biofilms. (First ed.). Cambridge: Cambridge University Press; 2003. 130-145.
184. Cowan MM, Warren TM, Fletcher M. Mixed-species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling.* 1991; **3**(1): 23-3.
185. Rosenberg M and Kjelleberg S. Editors. *Advances in Microbial Ecology*. NewYork: Plenum Press; 1986. 353-393.
186. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010; **89**(3): 205-218. doi:10.1177/0022034509359403.
187. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa. *Appl Environ Microbiol*. 1994; **60**(7): 2355-2359. doi:10.1128/aem.60.7.2355-2359.1994.
188. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011; **2**(5): 445-459. doi:10.4161/viru.2.5.17724).
189. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; **73**(2): 310-347. doi:10.1128/MMBR.00041-08.
190. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002; **184**(4): 1140-1154. doi:10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
191. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000; **54**: 49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
192. Joe J. Harrison, Raymond J. Turner, Lyriam L. R. Marques and Howard Ceri. Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. American Scientist Vol. 93, No. 6 (NOVEMBER-DECEMBER 2005), pp. 508-515 (8 pages) Published By: Sigma Xi, The Scientific Research Honor Society.
193. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(4) :999-1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001.

194. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*. 1994; **48**: 585-617. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.003101.
195. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001; **413**(6858): 860-864. doi:10.1038/35101627.
196. McBain A. *In vitro* biofilm models: An overview. Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM (Ed) Advances in Applied Microbiology 69th Edition. Elsevier, ABD, 2009.
197. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc*. 2010; **5**(7): 1236-1254. doi:10.1038/nprot.2010.71.
198. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017; **43**(3): 313-351. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146.
199. Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014; **20**(10): 981-990. doi:10.1111/1469-0691.12651.
200. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*. 2013; **25**(1): 31-42. doi:10.7416/ai.2013.1904.
201. Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; **115**(8): 891-899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
202. Orii T, Okazaki T, Hata N, Sugawara K, Rahman FA, Kuramitz H. Development of an Attenuated Total Reflection Based Fiber-Optic Sensor for Real-time Sensing of Biofilm Formation. *Anal Sci*. 2017; **33**(8): 883-887. doi:10.2116/analsci.33.883.
203. Choong FX, Bäck M, Fahlén S, et al. Real-time optotracing of curli and cellulose in live *Salmonella* biofilms using luminescent oligothiophenes. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016; **2**: 16024. Published 2016 Nov 23. doi:10.1038/npjbiofilms.2016.24.
204. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The Involvement of Cell-To Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. Science, 1998. 280/5361: 295–298.
205. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008; **59**: 415-428. doi:10.1146/annurev.med.59.110106.132000.
206. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*. 2012; **12**(3): 2519-2538. doi:10.3390/s120302519.
207. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007; **362**(1483): 1119-1134. doi:10.1098/rstb.2007.2039.
208. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; **21**: 319-346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
209. Diggle SP, Cornelis P, Williams P, Cámara M. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(2-3):83-91. doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.038.
210. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015; **6**(1): 26-41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x.

211. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003; **426**(6964): 306-310. doi:10.1038/nature02122.
212. Alan ve Ozer. Erişim 01.01.2022, http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/posters.pdf.
213. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; **35**(4): 322-332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
214. Webb JS, Thompson LS, James S, et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol*. 2003; **185**(15): 4585-4592. doi:10.1128/JB.185.15.4585-4592.2003.
215. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; **322**: 107-131. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_6.
216. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*. 2003; **5**(13): 1213-1219. doi:10.1016/j.micinf.2003.08.009.
217. Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002; **49**(2): 309-314. doi:10.1093/jac/49.2.309.
218. Alipour M, Suntres ZE, Omri A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2009; **64**(2): 317-325. doi:10.1093/jac/dkp165.
219. Foley I, Marsh P, Wellington EM, Smith AW, Brown MR. General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *J Antimicrob Chemother*. 1999; **43**(1): 164-165. doi:10.1093/jac/43.1.164.
220. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005; **13**(1): 34-40. doi:10.1016/j.tim.2004.11.010.
221. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; **9**(1): 34-39. doi:10.1016/s0966-842x(00)01913-2.
222. Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47**(1): 317-323. doi:10.1128/AAC.47.1.317-323.2003.
223. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**(8): 3382-3386. doi:10.1128/AAC.49.8.3382-3386.2005.
224. Oliver A, Sánchez JM, Blázquez J. Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; **217**(1): 31-35. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11452.x.
225. Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; **105**(34): 12503-12508. doi:10.1073/pnas.0801499105.
226. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; **284**(5418): 1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318.

227. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(23): 7116-7121. doi:10.1128/AEM.02636-13.
228. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017; **41**(3): 276-301. doi:10.1093/femsre/fux010.
229. ATCC (American Type Culture Collection). Erişim, 01.02.2021, https://www.atcc.org/products/27853).
230. ATCC (American Type Culture Collection). Erişim, 01.02.2021, https://www.atcc.org/products/47085.
231. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger BC, Winn WC. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. JH. Philadelphia: Lippincott; 2006.
232. Unat EK. *Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi*. 2nd. ed. İstanbul: Dergah Yayınları; 1986.
233. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011; (47): 2437. Published 2011 Jan 30. doi:10.3791/2437.
234. M100 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition. March 23, 2021. CLSI, Wayne, PA, USA.
235. British Standard ISO 20776-1, 2006. Erişim 01.01.2021, https://www.iso.org/standard/41630.html.
236. Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 11th ed. M07. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.
237. Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int*. 2004; **24**(1): 65-67.
238. FF, About the Cystic Fibrosis. Erişim, https://www.cff.org/What-is-CF/About-CysticFibrosis/ 03.01.2018.
239. Sans-Serramitjana E, Fusté E, Martínez-Garriga B, Merlos A, Pastor M, Pedraz JL, Esquisabel A, Bachiller D, Vinuesa T, Viñas M. Killing effect of nanoencapsulated colistin sulfate on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2016 Sep; **15**(5): 611-8. doi: 10.1016/j.jcf.2015.12.005. Epub 2015 Dec 18. PMID: 26708265.
240. Hutchison ML, Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect*. 1999; **1**(12): 1005-1014. doi:10.1016/s1286-4579(99)80518-8.
241. Davies JC. Current and Novel Antimicrobial Approaches. İçinde Bush A, Alton EWFW, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A, editör. Cystic Fibrosis in the 21st Century. Prog Respir Res. Basel, Karger: 2006. pp. 180-86.
242. Frederiksen B, Koch C, Høiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1997; 23: 330-335.
243. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991; **4**(1): 35-51. doi:10.1128/CMR.4.1.35.
244. Marchetti F, Giglio L, Candusso M, Faraguna D, Assael BM. Early antibiotic treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis: a critical

review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004; **60**(2): 67-74. doi:10.1007/s00228-004-0735-2.

245. Şener D. 2014. Kistik fibrozisli hastalardan izole edilen pseudomonas aeruginosa izolatlarının fenotipik özelliklerinin, antibiyotik duyarlılıklarının ve genotiplerinin klinik takipteki önemi. İstanbul Üniversitesi / Cerrahpaşa Tıp Fakültesi / Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, İstanbul, Türkiye.

246. Perez LR, Costa MC, Freitas AL, & Barth AL. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Brazilian journal of microbiology:* [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 2011. **42**(2), 476–479. https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000011.
247. Sayın MS. 2018. Kistik Fibrozlu Hastalarin Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalarin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep.
248. Yılmaz M. 2014. Kistik Fibrozis Hastalarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Moleküler Tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul.
249. Ç. Bozkurt-Güzel ve ark Katyonik steroid antibiyotik CSA-13'ün, kolistin ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı üçlü sinerjistik etkileri. *ANKEM Derg*. 2013; **27**(4): 196-205 doi:10.5222/ankem.2013.196.
250. Pompilio et al. *BMC Microbiology*. 2012, 12: 145 http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/145.
251. Hill D, Rose B, Pajkos A, et al. Antibiotic susceptabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**(10): 5085-5090. doi:10.1128/JCM.43.10.5085-5090.2005.
252. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL. Use of Pseudomonas biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J Antimicrob Chemother*. 2005; **56**(5): 879-886. doi:10.1093/jac/dki338.
253. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, et al. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev*. 2018; **31**(3): e00084-16. Published 2018 Apr 4. doi:10.1128/CMR.00084-16.
254. Franklin MJ, Chang C, Akiyama T, Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol Spectr*. 2015; **3**(4): 10.1128/microbiolspec.MB-0016-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0016-2014.
255. Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules*. 2018; 8(2): 29. Published 2018 May 21. doi:10.3390/biom8020029.
256. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001; **183**(23): 6746-6751. doi:10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001.
257. Çoban AY, Çiftci A, Onuk EE, Erturan Z, Çayci YT, Durupinar B. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araşırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2009; **43**: 563-573.

258. Díez-Aguilar M, Ekkelenkamp M, Morosini MI, et al. Anti-biofilm activity of murepavadin against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2021; **76**(10): 2578-2585. doi:10.1093/jac/dkab222.
259. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**(5): 1915-1922. doi:10.1128/JCM.42.5.1915-1922.2004.

260. Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2002; **40**(11):4172-4179. doi:10.1128/JCM.40.11.4172-4179.2002.
261. Marr AK, Overhage J, Bains M, Hancock REW. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology (Reading)*. 2007; **153**(Pt 2): 474-482. doi:10.1099/mic.0.2006/002519-0.
262. Drenkard E, Ausubel FM. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 2002; **416**(6882): 740-743. doi:10.1038/416740a.
263. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001; **358**(9276): 135-138. doi:10.1016/s0140-6736(01)05321-1.
264. Priya Kapoor. 2014. Anti-infective strategies in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. PhD Thesis. Dublin.
265. Bayındır Bilman F. Kateter ilişkili hastane enfeksiyonlarında sık karşılaşılan biyofilm oluşturan bakterilerde, biyofilm ilişkili antibiyotik direncinin araştırılması. Uzmanlik tezi. Ankara. 2010.
266. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015; **21 Suppl 1**: S1-S25. doi:10.1016/j.cmi.2014.10.024.
267. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017; **125**(4): 304-319. doi:10.1111/apm.12673.
268. Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; **35**(9): 1824-1828. doi:10.1128/AAC.35.9.1824.
269. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; **59**(7): 3838-3847. doi:10.1128/AAC.00433-15.
270. Kolpen M, Lerche CJ, Kragh KN, et al. Hyperbaric Oxygen Sensitizes Anoxic *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; **61**(11): e01024-17. Published 2017 Oct 24. doi:10.1128/AAC.01024-17.
271. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; **27**(3): 196-200. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.10.007.
272. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; **30**(4): 366-368. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005.

273. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R. In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; **40**(2): 173-176. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.006.
274. Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; **36**(7): 1347-1351. doi:10.1128/AAC.36.7.1347.
275. Hunt BE, Weber A, Berger A, Ramsey B, Smith AL. Macromolecular mechanisms of sputum inhibition of tobramycin activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; **39**(1): 34-39. doi:10.1128/AAC.39.1.34.
276. Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*. 2011; **7**(1): e1001264. Published 2011 Jan 27. doi:10.1371/journal.ppat.1001264.
277. Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; **112**(36): 11353-11358. doi:10.1073/pnas.1503058112.
278. Billings N, Millan M, Caldara M, et al. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*. 2013; 9(8): e1003526. doi:10.1371/journal.ppat.1003526.
279. Fong IW. *Emerging Issues and Controversies in Infectious Disease*. Springer Science & Business Media, LLC, New York, USA. 2009.
280. Kumon H, Tomochika K, Matunaga T, Ogawa M, Ohmori H. A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through Pseudomonas exopolysaccharides. *Microbiol Immunol*. 1994; **38**(8): 615-619. doi:10.1111/j.1348-0421.1994.tb01831.x.
281. Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy*. 1997; **43**(5):340-345. doi:10.1159/000239587.
282. Hodges NA, Gordon CA. Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and beta-lactams by homologous alginate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; **35**(11): 2450-2452. doi:10.1128/AAC.35.11.2450.
283. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**(4): 1175-1187. doi:10.1128/AAC.48.4.1175-1187.2004.
284. Equi A, Balfour-Lynn IM, Bush A, Rosenthal M. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet*. 2002; **360**(9338): 978-984. doi:10.1016/s0140-6736(02)11081-6.
285. Tateda K, Comte R, Pechere JC, Köhler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(6): 1930-1933. doi:10.1128/AAC.45.6.1930-1933.2001.
286. Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, et al. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic P. aeruginosa lung infection in Cftr(-/-) mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**(10): 3677-3687. doi:10.1128/AAC.01011-06.

287. Van Delden C, Köhler T, Brunner-Ferber F, François B, Carlet J, Pechère JC. Azithromycin to prevent *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia by inhibition of quorum sensing: a randomized controlled trial. *Intensive Care Med*. 2012; **38**(7): 1118-1125. doi:10.1007/s00134-012-2559-3.
288. Yamabe K, Arakawa Y, Shoji M, et al. Direct anti-biofilm effects of macrolides on *Acinetobacter baumannii*: comprehensive and comparative demonstration by a simple assay using microtiter plate combined with peg-lid. *Biomed Res*. 2020; **41**(6): 259-268. doi:10.2220/biomedres.41.259.
289. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol*. 2008; **68**(1): 223-240. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x.
290. Haagensen JA, Klausen M, Ernst RK, et al. Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2007; **189**(1): 28-37. doi:10.1128/JB.00720-06.
291. Chiang WC, Pamp SJ, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65(2): 245-256. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00929.x.
292. Kolpen M, Appeldorff CF, Brandt S, et al. Increased bactericidal activity of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in anaerobic conditions. *Pathog Dis*. 2016; **74**(1): ftv086. doi:10.1093/femspd/ftv086.
293. Hengzhuang W, Green K, Pressler T, Skov M, Katzenstein TL, Wu, X, & Høiby N. Optimization of colistin dosing regimen for cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lung infections. *Pediatric pulmonology*. 2019; **54**(5): 575–580. https://doi.org/10.1002/ppul.24269.
294. Keays T, Ferris W, Vandemheen KL, et al. A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: a better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. *J Cyst Fibros*. 2009; **8**(2): 122-127. doi:10.1016/j.jcf.2008.10.005.
295. Haley CL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Characterization of biofilm-like structures formed by *Pseudomonas aeruginosa* in a synthetic mucus medium. *BMC Microbiol*. 2012; **12**: 181. Published 2012 Aug 18. doi:10.1186/1471-2180-12-181.

## 8. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KİSTİK FİBROZİSLİ HASTALARDAN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGİNOSA SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞUMU VE TEDAVİDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER İLE İLİŞKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

| %16 | %15 | %5 | %6 |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | acikbilim.yok.gov.tr<br>İnternet Kaynağı | %3 |
| 2 | nek.istanbul.edu.tr:4444<br>İnternet Kaynağı | %2 |
| 3 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 4 | 9lib.net<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 5 | dspace.gazi.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 6 | docplayer.biz.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 7 | adudspace.adu.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 8 | euroasiajournal.org<br>İnternet Kaynağı | %1 |