

---

# İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojide Biyofilm

Füsun BEĞENDİK\*

\* Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ZONGULDAK

Mikrobiyal biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunmaları, tutundukları bölgelerde çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleri ile oluşmaktadır. Mikroorganizma üretmiş olduğu polimer yapılar ile etrafını çevrelemekte, kendini bir matriks içine gömerek yaşamını sürdürebilmektedir. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar genel olarak süspansiyon halindeki (planktonik) mikroorganizmalardan farklı özellikler sergilemektedirler. Bu farklılığın klinik mikrobiyolojide en çarpıcı yansıması, belirgin olarak artmış antibiyotik direncidir. Biyofilm oluşumu, derin su altı dışında tüm doğal ekosistemlerde gösterilmiştir. Endüstriyel alanda oldukça önemli sorunlara neden olduğunun anlaşılması üzerine, basit biyofilm örnekleme yöntemleri geliştirilmiş ve ucuz yollu uzaklaştırma metodları araştırılmıştır<sup>[1-3]</sup>. Medikal sistemlerde aynı uygulamaları yapmak günümüzde pek mümkün görülmektedir.

Biyofilm, ilk kez Van Leeuwenhoek tarafından 17. yüzyılda kendi dişinde oluşan plakta gösterilerek animalcules olarak adlandırılmıştır. Biyofilm teorisi 1976 yılında Marshall'ın 'bakteriyi yüzeye adeta demirleyen, oldukça iyi hücre dışı fibriller' olarak tanımlamasına kadar resmen duyulmamıştır<sup>[1]</sup>. Costerton ve arkadaşları, sıvı ile temas eden yüzeylere tu-

tunan bakterilerin oldukça hidrate, aniyonik bir matriks olan glikokaliks ile kaplı olduğunu bildirmişlerdir<sup>[4,5]</sup>. Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da yapılan biyofilm tanımlarında ortak temel faktörler; mikroorganizma, yüzey ve glikokaliks olarak görülmektedir<sup>[6,7]</sup>. Bu faktörlerden birinin eksikliği durumunda biyofilm oluşmamaktadır<sup>[3]</sup>.

Günümüzde nozokomiyal infeksiyonların %65'i biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Kateterler, yapay kalp kapakları, eklem replasmanları mikroorganizmaların kolaylıkla tutunabildikleri önemli yüzeylerdir. Oluşan infeksiyonlar, sıklıkla ve yalnızca mevcut implantın çıkarılması ile tedavi edilebilmektedirler. Dolayısıyla hastanın maruz kaldığı travma sayısı ve tedavi maliyeti yükselmektedir<sup>[8]</sup>.

Kullanılmakta olan tıbbi aletler üzerinde biyofilm, bakteriler ve mayalarca oluşturulabilmektedir. Biyofilm ile ilişkili infeksiyonlardan en sık izole edilen mikroorganizmalar Tablo 1'de özetlenmiştir. Bu mikroorganizmalar için kaynak, hastanın kendi florası, sağlık çalışanlarının elleri, çeşme suyu veya çevresel yüzeyler olabilmektedir<sup>[1]</sup>. Biyofilmi oluşturan mikroorganizma tek bir tür olabileceği gibi, farklı türler de birarada bulunabilmektedir. Dental biyofilmlerde 500'den fazla farklı tür mikroorganizmanın birlikteliği gözlenmiştir<sup>[8,9]</sup>.

Mikroorganizmaların serbest bulunmak yerine, neden bazı ortamlarda topluluk halinde bulunmayı tercih ettikleri sorusunun yanıtı henüz net değildir.

---

**Biofilms in Infectious Diseases and Clinical Microbiology**

**Key Words:** Biofilm, Clinical microbiology, Infection.

**Anahtar Kelimeler:** Biofilm, Klinik mikrobiyoloji, İnfeksiyon.

**Tablo 1. Biyofilm ilişkili infeksiyonlardan sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar**

• Gram-pozitif bakteriler	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus viridans</i>
• Gram-negatif bakteriler	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
• Mantarlar	<i>Candida albicans</i>

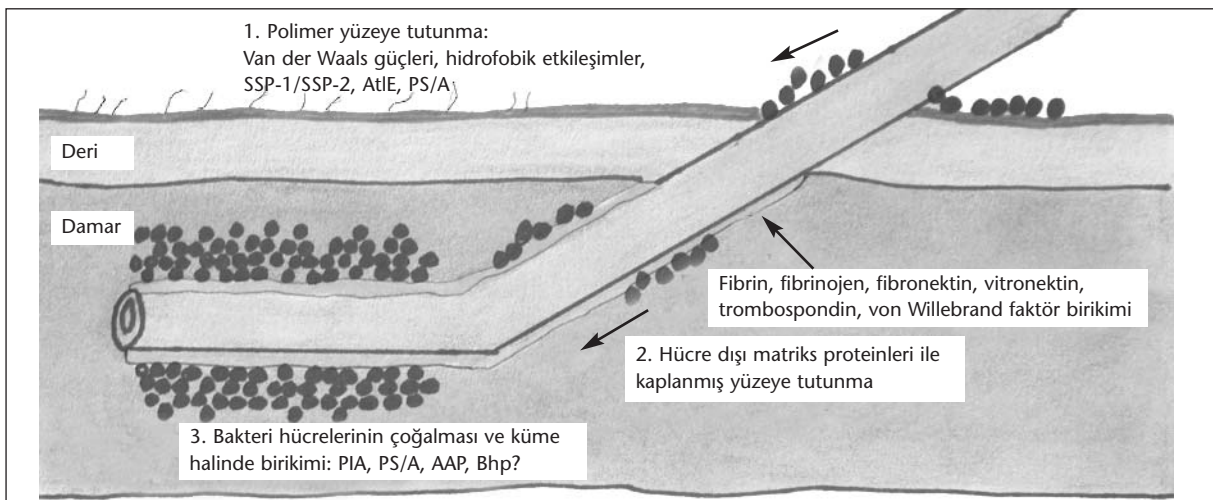
Biyofilm oluşumunun belli durumlarda mikroorganizma için avantajlı olabileceği düşünülmektedir. Bazı yazılarda biyofilm, mikroorganizmalardan oluşan bir şehre benzetilmiştir<sup>[9]</sup>. Mikroorganizmaların birbirlerine tutunmayı kolaylaştıran çeşitli ligant veya reseptörler içerdikleri bilinmektedir<sup>[1]</sup>.

### BİYOFİLM OLUŞUMU

Biyofilm oluşumu için öncelikle mikroorganizmanın yüzeye tutunması gereklidir. Tutunma, cansız yüzeylerde gerçekleşen özgül olmayan bir reaksiyon gibi görülmesine rağmen, son yıllarda mikroorganizmaya ait çeşitli yüzey yapılarının oldukça önemli olduğu gözlenmiştir. Yüzey ve ortam özellikleri mikroorganizma tutunması üzerinde aktif etki göstermektedir<sup>[1]</sup>.

Tutunmanın ilk basamağı, mikroorganizma ve yüzey arasında 1 nm'den daha az mesafe kalacak şekilde yaklaşmanın sağlanmasıdır. Yakınlaşma, yüzeyde akımı devam eden sıvı, motilite veya kemotaksis gibi faktörler ile sağlanabilmektedir. Bundan sonraki basamakta bağlanmanın olabilmesi, yüzey ve mikroorganizma arasındaki çekici ve itici güçlerin (elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, van der Waals güçleri, sıcaklık, hidrodinamik güçler) dengesine bağlıdır. Çoğu mikroorganizmanın ve cansız yüzeylerin negatif yüklü olması nedeni ile elektrostatik güçler, sayılan faktörlerin arasında en çok ele alınan olmuştur<sup>[3]</sup>.

Mikroorganizmaya ait faktörler konusunda üzerinde en fazla çalışılmış mikroorganizma grubu olan koagülaz-negatif stafilokoklar için belirlenmiş olan yüzey faktörleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Bu faktörlerden "surface specific protein (SSP)"-1 ve SSP-2 tutunma ile ilişkili olduğu gösterilen ilk proteinlerdir. Polistren yüzeylere tutunma için önemli olan bu proteinler fimbria benzeri polimerik yapılardır. Bu proteinleri kodlayan genler henüz tanımlanmamıştır. Yüzey ilişkili bir otolizin olan AtlE, tutunmanın başlangıcında rol alan diğer bir protein olarak daha sonra tanımlanmıştır<sup>[10]</sup>. *Pseudomonas aeruginosa* için *flgK* geni tarafından kodlanan flajella ilişkili protein, *Escherichia coli* suşlarında tip I fimbria, *Klebsiella pneumoniae*'da Tip III pili aynı görevden sorumludur<sup>[11-14]</sup>. Diğer bakteriler üzerinde çalışmalar devam etmektedir<sup>[15]</sup>. *Staphylococcus epidermidis* kaynaklı biyofilm oluşumu ve rol oynayan bakteriyel faktörler Şekil 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1. *S. epidermidis* biyofilm oluşumu ve rol oynayan bakteriyel faktörler.**

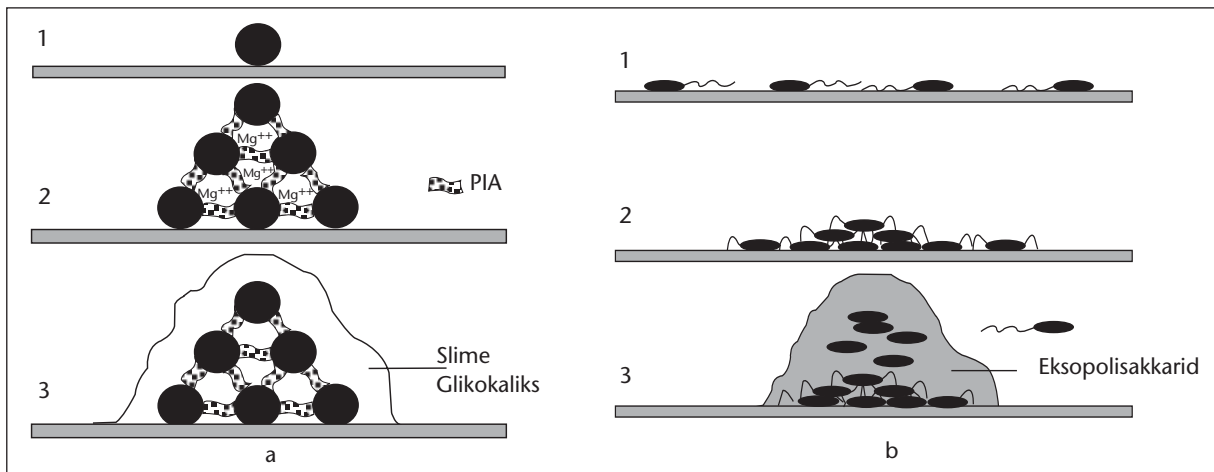
SSP-1/SSP-2: Stafilokokal yüzey proteini, AtlE: Otolizin, PS/A: Polisakarid/adezin, Bhp: Biyofilm ilişkili protein, Fbe: Fibrinojen bağlayan protein, SdrG: Serine-aspartate-repeat-containing protein G, PIA: Hücrelerarası adezin, AAP: Akümülyasyon ilişkili protein (kaynak 10'dan uyarlanmıştır).

**Tablo 2. Biyofilm oluşumunda önemli stafilkokal yüzey yapıları ve fonksiyonları<sup>[10]</sup>**

Yüzey proteini	Fonksiyon
• Stafilkokal yüzey proteinleri (SSP-1, SSP-2)	<i>S. epidermidis</i> , polistren yüzeye tutunma
• Otolizin (AtlE)	<i>S. epidermidis</i> , polistren veya konak biyofilm kaplı yüzeye tutunma
• Biyofilm ilişkili protein (Bap)	<i>S. aureus</i> , polimer yüzeylere tutunma ve biyofilm birikimi
• Bap-homolog protein (Bhp)	<i>S. epidermidis</i> biyofilm oluşumu
• Fibrinojen bağlayıcı protein (Fbe)	<i>S. epidermidis</i> , fibrinojen beta zincirine bağlanma
• Tekrarlayan serin-aspartat içeren proteinler: SdrG (Fbe homoloğu), SdrF, SdrH	SdrG: <i>S. epidermidis</i> , fibrinojen beta zincirine bağlanma ve trombin inhibisyonu, SdrF ve SdrH: Bilinmiyor
• Hücrelerarası adezyon gen bölgesi ( <i>icaADBC</i> )	PIA yapımı
• Slime ilişkili antijen (SAA)	PIA ile yapısal ve fonksiyonel olarak aynı
• Akümüasyon ilişkili protein (AAP)	<i>S. epidermidis</i> , biyofilm birikimi
• Otolizin (aas)	<i>S. saprophyticus</i> ; fibronektin ve üroepitelyal hücrelere tutunma
• <i>Staphylococcus saprophyticus</i> yüzey ilişkili protein (Ssp)	<i>S. saprophyticus</i> , üroepitelyal hücrelere tutunma

Mikroorganizma tutunması üzerinde, konağın kendine ait hücre dışı proteinleri de en az mikroorganizmaya ait yüzey faktörleri kadar etkilidir. Uygulanan her türlü invaziv girişim çeşitli düzeylerde doku hasarı oluşturmaktadır. Tıbbi sistemlerde kullanılan yüzeyler, uygulanmalarından kısa bir süre sonra plazma, fibronektin, fibrinojen, vitronektin, trombospondin, von Willebrand faktör gibi konağa ait hücre dışı matris proteinleri ve plazma ile kaplanmaktadır (Şekil 1). Bu birikimin *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* için özgül hücre yüzey reseptörleri yolu ile tutunmayı kolaylaştırdığı gösterilmiştir<sup>[1,16,17]</sup>.

Yüzeye tutunan hücrelerin yanı sıra, bölünme ile yeni oluşan hücreler de birlikte bulunma eğilimi göstermektedirler. Koagülaz-negatif stafilkokoklar için "Polysaccharide Intercellular adhezin (PIA)", hücreler arası bağlantıların oluşumunu tetikleyen polisakarid bir antijendir (Şekil 2a). *icaADCB* gen bölgesinin bir ürünü olan bu antijen, yabancı cisim infeksiyonlarında önemli bir virülans faktörü olarak tanımlanmaktadır<sup>[3]</sup>. *P. aeruginosa* suşlarında tip IV pili bakteriler hücre kümelerinin oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2b). Kasılma-gevşeme hareketleri ile tip IV pili, aynı zamanda bakteriye yüzey üzerinde ve biyofilm içinde psödopod benzeri hareket kazandırmak-

**Şekil 2a, 2b. Biyofilm oluşumunun şematik görünümü.**

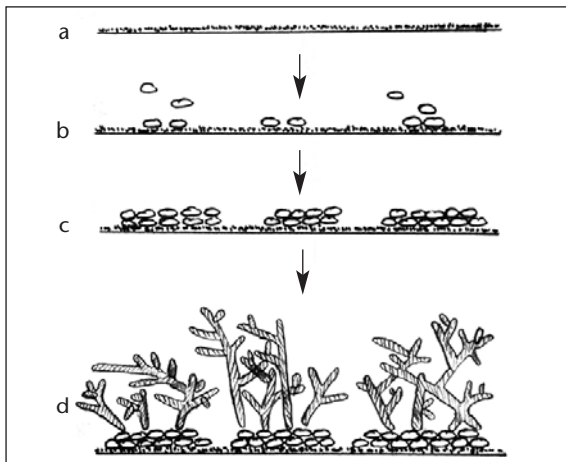
a. *S. epidermidis* hücrelerinin PIA aracılığı ile bir arada tutulması,

b. *P. aeruginosa* hücrelerinden tip IV pili aracılı mikrokoloni oluşumu (kaynak 3'ten alınmıştır).

tadır<sup>[11,18,19]</sup>. *E. coli*'de ise antijen 43 aynı işlevden sorumludur<sup>[20]</sup>.

Biyofilm olgunlaşmasında son basamak slime glikokaliks oluşumudur. Bu yapı, biyofilm stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu nedenle slime üreten suşlar ile oluşan biyomedikal implant kolonizasyonunun sterilizasyonu güçtür. Slime tabakası genellikle polisakkarid yapıdadır. Kimyasal kompozisyonu mikroorganizmaya göre değişmektedir. *P. aeruginosa*, alginik asit yapısında olan ve *alg ACD* gen bölgesi tarafından kodlanan glikokaliks tabakası oluşturmaktadır. Bu gen bölgesi, yüksek ozmolarite, yüksek oksijen basıncı, etanol uygulaması, nitrojen azalması gibi çevresel faktörler ve ortamdaki hücre sayısının artması ile aktive edilebilmektedir<sup>[3]</sup>.

*Candida albicans*, germ tüp oluşturmalarının ardından kateter yüzeyine üç-altı saat içinde tutunmaktadır. Olgun biyofilm oluşumu 48 saatlik inkübasyon sonucunda maya, hif ve psödohiplerin birleşimi ile gerçekleşmektedir. Bakterilerde gözlenen oluşumlardan farklı olarak, *C. albicans* biyofilminde morfolojik olarak iki farklı katman mevcuttur. Maya hücreleri ince ve oldukça sıkı olan bazal tabakayı, hifler ise kalın ve daha gevşek olan üst tabakayı oluşturmaktadır (Şekil 3). Hif oluşturmamayan mutant suşlarda sadece bazal tabaka, maya oluşturmamayan suşlarda ise daha kalın olan dış tabaka bulunmaktadır. Dış tabakanın uzaklaştırılabilmesinin daha kolay olması nedeniyle bazal tabakanın tutunmada daha önemli olduğu düşünülmektedir. *C. albicans* için kullanılan



Şekil 3. Polivinilklorid kateter üzerinde *C. albicans* biyofilm oluşumu. a. Kateter yüzeyinin konak proteinleri ile kaplanması, b. Maya hücrelerinin yüzeye tutunması, c. Maya hücrelerinden mikrokoloni oluşumu, d. Hifal yapıların ve matriksin eklenmesi ile biyofilm oluşumunun tamamlanması (kaynak 21'den alınmıştır).

yüzey materyalinin biyofilm oluşumunda oldukça önemli olduğu ve temas sonrası indüklenen bir gen ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Oluşan glikokaliks yapısal olarak karbonhidrat, protein, fosfor, heksosamin içermektedir<sup>[21]</sup>.

### BİYOFİLMİN KLİNİK ÖNEMİ

Kistik fibrozis, periodontitis gibi özel durumlarda, kateter ilişkili kan dolaşımı ve üriner sistem infeksiyonlarında biyofilmin rolü kesin olarak bilinmektedir. İnfeksiyon patogenezinde kesinlik kazanmış mekanizmalar; yüzeyler üzerine tutunan mikroorganizma topluluklarının ayrılması, endotoksin üretimi, konak bağışıklık sistemine karşı gözlenen dirençtir. Kan ile ilişkili yüzeylerde, kantitatif kültür sonrasında elde edilen  $10^4$  "colony forming unit (cfu)" /mL düzeyinde üreme sepsis ile korelasyon göstermektedir. Değişik amaçlar ile kullanılmakta olan tüm yüzeyler için de benzer sayıların infeksiyon için anlamlı olduğu düşünülmektedir<sup>[22]</sup>.

Biyofilmin klinik açıdan belirgin önemi, biyofilm içine gömülü olan mikroorganizmaların, antibiyotik tedavisine serbest olanlara göre belirgin olarak dirençli olmasıdır. Direncin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Son dönemde geliştirilmiş olan deneysel modeller bu konuya açıklık getirmiş görünmesine rağmen, halen yanıtlanmayan sorular mevcuttur. Biyofilm içinde mikroorganizma direnç mekanizmaları aşağıdaki faktörler ile açıklanmaya çalışılmaktadır:

1. Fiziksel ve kimyasal bariyer nedeniyle antimikrobiyal penetrasyonunda azalma,
2. Genel stres yanıtı olarak metabolizma ve çoğalma hızında yavaşlama,
3. Heterojenite,
4. Biyofilme özgü fenotip oluşumu,
5. Direnç genlerinin aktarımı.

### Penetrasyon Azalması

Hacminin %97'si sudan oluşan biyofilm tabakası, antimikrobiyal maddelerin penetrasyonunu engelleyen fiziksel ve kimyasal bir bariyer olarak görülmektedir. İnce ve kalın biyofilm tabakalarında hidrojen peroksit penetrasyonu araştırıldığında, kalın biyofilm tabakasına penetrasyon düzeyinin belirgin olarak düşük olduğu görülmüştür. Katalaz enzimi olmayan bakterilerde penetrasyonun sağlanabilmesi üzerine, biyofilmin bariyer görevinde tek başına belirleyici olamayacağı, mikroorganizma özelliğinin de önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, beta-laktamaz aktivitesi gösteren bakterilerden olu-



şan biyofilm içine beta-laktam antibiyotiklerin penetrasyon başarısızlığı, tek başına biyofilm bariyerine bağlanamamıştır. Antimikrobialer için biyofilm tabakasının penetre olunamaz bir bariyer olmadığı, mevcut dirençte çoğul mekanizmaların geçerli olduğu sonucuna varılmıştır<sup>[8,23]</sup>.

Tüm antimikrobialerin biyofilm bariyerinden benzer biçimde etkilenmediği gözlenmektedir. Glikopeptid yapıdaki antibiyotikler en fazla etkilenen grup iken, rifampin, klindamisin ve makrolidler daha az etkilenmektedirler. Polisakkarid hücre ekstrelerinin glikopeptid antibiyotik etkisini interfere ettiği, glikopeptid-aminoglikozid sinerjistik etkisini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Beta-laktam antibiyotiklerin alginat tabaka içine aminoglikozidlerden daha hızlı penetre oldukları gözlenmiştir<sup>[1,8]</sup>. Ayrıca, biyofilm içinde oluşan mikroçevrenin antimikrobial etkisi olumsuz etkileyebileceği ileri sürülmüştür<sup>[3]</sup>.

### Azalmış Metabolizma ve Çoğalma Hızı

Kullanımda olan antimikrobiallerin ortak özelliği, metabolik olarak aktif ve çoğalan mikroorganizmalar üzerine etkilerinin belirgin olmasıdır. Metabolizma ve çoğalma hızında yavaşlama, mikroorganizmayı olumsuz çevre koşullarından koruyan genel bir stres yanıtıdır. Mikroorganizmada *rpoS* (stres düzenleyici protein) gen bölgesi tarafından kontrol edilen stres yanıtı, aynı zamanda biyofilm oluşumunu tetiklemektedir. *rpoS* kaybı olan *E. coli* hücrelerinin normal biyofilm yapısı oluşturamadıkları bildirilmiştir. *P. aeruginosa*'da salgılanan ilave bir stres faktörü AlgT olup, *rpoS* ile birlikte çalışmaktadır<sup>[8,24]</sup>.

### Heterojenite

Besin gradienti, metabolik atıklar ve uyarılar, biyofilm tabakasında bulunan mikroorganizmalarda metabolizma hızında farklılıklara neden olmaktadır. İlk kez 1990 yılında Characklis ve Marshall tarafından ileri sürülen heterojenite kavramı, antimikrobial yanıtı etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Akridin orange boyama ile yaklaşık RNA-DNA oranına göre hızlı ve yavaş çoğalan hücreler gösterilebilmektedir<sup>[1]</sup>.

### Özgün Fenotip

Mikroorganizmalar yüzeye tutunduktan sonra, çoğul ilaç direnci sağlayan pompa sistemlerinde aktivasyon, dış membran proteinlerinde şekilsel farklılaşmalar, hücresel ileti sistemlerinde aktivasyon gibi fenotipik değişiklikler oluşabilmektedir. Biyofilm içindeki hücreler yeniden süspanse edildiğinde, bu fenotipik özelliklerin geri dönüşümlü olduğu gözlenerek, genotipik değişimin olmadığı düşünülmüştür<sup>[8,23]</sup>.

Bu teorilerin yeni çalışmalarla desteklenmeleri gerekmektedir.

### Direnç Genlerinin Aktarımı

Biyofilm içinde bulunan mikroorganizmalar arasında direnç genlerinin aktarıldığı çeşitli deneysel modeller de gösterilmiştir<sup>[25-27]</sup>.

### SIK GÖRÜLEN BİYOFİLM İLİŞKİLİ İNFEKSİYONLAR

Santral venöz kateterler, yapay kalp kapakları ve üriner kateterler en sık biyofilm oluşumunun gözlenildiği yüzeylerdir. Santral venöz kateter biyofilmlerinden sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar; *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis*'tir. Bu kateterler için ilk 24 saat içinde konak kaynaklı platelet, plazma ve doku proteinlerini içeren biyofilm oluşumu söz konusudur. Santral venöz kateterlerde mikrobiyal biyofilm oluşumu genellikle benzer olup, genişleme veya lokalizasyon kateterizasyonun süresine bağlıdır. Kısa süreli (10 günden kısa) kateterlerde dış yüzeyde daha geniş bir oluşum varken, uzun süreli (30 günden uzun süreli) kateterlerde iç lümendeki oluşum daha fazladır. Kateterden uygulanan sıvının özelliği mikrobiyal üremeyi etkileyebilmektedir. Gram-pozitif bakteriler intravenöz (IV) sıvılarda iyi üreyemezken, gram-negatif bakteriler iyi üreme göstermektedirler<sup>[1,22]</sup>.

Yapay kalp kapağı biyofilmleri, endokardit gelişimine neden olmaktadır. Bu durumda sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar; stafilokoklar, streptokoklar, gram-negatif basiller, difteroidler, enterokoklar ve kandida türleridir. Mekanik kapak uygulaması doku hasarı nedenidir. Hasar bölgesinde konak kaynaklı biyofilm oluşmaktadır. Bunun mikroorganizma birikimini kolaylaştırıcı etkisi nedeniyle, kapak replasmanı süresince genellikle antibiyotik uygulaması yapılmaktadır<sup>[22]</sup>.

Üriner kateterler lateks ve silikon yapıdadır. Uygulama sonrası iç ve dış yüzeylerde hızla biyofilm kazanımı olmaktadır. Üriner kateter ilişkili infeksiyonlardan sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar; *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve diğer gram-negatif bakterilerdir. Hastaların %10-50'si kısa süreli (yedi günden az) kateterize edilmektedir. Uzun dönemde (28 günden fazla) hastaların hemen hepsi infekte olmaktadır<sup>[22]</sup>.

### BİYOFİLM ile MÜCADELE

Biyofilm ilişkili infeksiyonlarda uygulanacak antimikrobialer, sadece yüzeyde zayıf bağlı, seyrek ya

da serbest bulunan mikroorganizmalar üzerine etki yaparak, infeksiyon tablosunun bir süre için gerilemesine neden olabilmektedir. Altta kalan yoğun tabaka sağlam kaldığından, bir süre sonra infeksiyonun tekrar ettiği gözlenecektir. Antimikrobiyalın biyofilm içinde gömülü olan mikroorganizmalara istenilen biçimde etki edebilmesi için normalin 10-100 ve hatta bazen 1000 kat yüksek konsantrasyonda uygulanması gerekmektedir<sup>[23]</sup>. Bu pratik olarak mümkün olamadığından biyofilm ile mücadelede en önemli faktör kolonizasyonun engellenmesidir. Ayrıca, bazı antibiyotiklerin biyofilm tabakaya daha iyi penetre olma özelliklerine rağmen *ica* gen bölgesini aktive ederek istenmeyen etkiler oluşturabilecekleri bildirilmiştir<sup>[28]</sup>.

Bakteri kolonizasyonunun engellenmesi için uygulanacak materyalin geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ile kaplanması pratik ve mantıklı bir yöntem olarak düşünülmüştür. Ancak uygulamada bu yöntem, materyalin fizikokimyasal özelliklerinin (kayganlık, konak dokusu ile uyumluluk gibi) bozulmaması ve uygulanan antimikrobiyal ajanın kateter kullanımını süresince dokuya yeterli miktarda salınımının sağlanması gibi oldukça ayrıntılı hesaplamalar ve ileri teknoloji gerektirmektedir. Özgül ve özgül olmayan antimikrobiyaller ile yapılmış çalışmalarda, kullanılan tıbbi aletin iç ya da dış yüzeyinin kaplanması ve kontrollü salınımın sağlanması sonucunda kolonizasyonun bir süre geciktirebildiği gözlenmesine rağmen arzu edilen başarıya ulaşılamamıştır. Ayrıca bu tür uygulamaların, topikal antibiyotik uygulamalarında olduğu gibi dirençli mikroorganizma kolonizasyonuna zemin oluşturma özelliği tartışılmaktadır. Konak faktörlerine bağlı biyofilm oluşumunun engellenmeden kolonizasyonun önlenemeyeceği gözlenmektedir.

Antimikrobiyaller üzerine yapılan çalışmalarda uğranılan hayal kırıklığı, yeni fikirlerin oluşmasını sağlamış, bakterisidal olmayan antimikrobiyal uygulamaların araştırılmasına yöneltmiştir. Bu araştırmalarda mikroorganizmaların temel yüzey molekülleri hedeflenmiş olup, moleküler ve genetik düzeyde yeni savaş yöntemleri geliştirilmiştir. Stafilokoklar için PIA, gram-negatif bakteriler için tip I fimbria ve Pap pili hedefler arasındadır. Yeterli in vivo çalışma bulunmamasına rağmen pilisid uygulamalar yararlı olabilecek gibi görünmektedir. Memeli kaynaklı doğal immün yanıtta etkili olan proteinler denenmektedir. Bu proteinlerden birisi olan laktoferrinin demir şelasyon mekanizması yoluyla *P. aeruginosa* için biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Bakteri ve yüzey arasındaki fizikokimyasal adeziv güçlerin den-

gesinin bozulmaya çalışılmasıyla tutunma engellenmeye çalışılmıştır. Bunun için elde edilen biyosümfaktan maddeler hayvan modellerinde başarılı bulunmuştur. Ayrıca, bakteri iletişim sisteminin (quorum sensing) inhibisyonu da yeni hedefler arasındadır<sup>[29]</sup>.

Kullanılan yüzeylerin, konak faktörleri ve mikroorganizma kolonizasyonunu engellemek üzere modifiye edilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Üriner kateterlerin eritrosit membranının ana polar grubu olan fosforil kolin ile kaplanarak doğal membran yapısı taklit edilmeye çalışılmış ancak başarılı olunamamıştır<sup>[30]</sup>.

## DENEYSSEL MODELLER

Biyofilm ile ilişkili deneysel çalışmaların yapılabilmesi için geliştirilmiş modeller ve görüntüleme yöntemleri mevcuttur. Bakteriyel adezyon çalışmalarında arzu edilen modele uygun mikroorganizma seçimi, örnek yüzeyin hazırlanması, deneysel olarak biyofilmin oluşturulması ve araştırmalar için biyofilmin örneklenmesi dikkatlice planması gereken basamaklardır. Oluşturulan biyofilmin görüntülenmesinde ışık mikroskobu, epifloresan mikroskopi, "Scanning Electron Microscopy (SEM)" gibi direkt yöntemlerin yanı sıra kültür plağında koloni sayımı, boyanmış bakterinin spektrofotometrik olarak sayılması, radyoaktif madde ile işaretleme, metabolik aktivitenin ATP markerleri ile belirlenmesi ve nükleik asit problemleri gibi indirekt yöntemler kullanılabilir. Yöntemlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Biyofilm morfolojisinin incelenmesinde "Scanning Confocal Laser Microscopy (SCLM)", oluşan yapının dehidrate edilmeden olduğu gibi incelenmesine olanak sağlaması nedeniyle ümit vericidir<sup>[31]</sup>.

## DUYARLILIK TESTLERİ

Biyofilm içinde bulunan mikroorganizmaların farklı fenotipik özelliklere sahip olması, standart antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının biyofilm ilişkili infeksiyon tedavisi için yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından etken mikroorganizma ile biyofilm oluşturularak geliştirilmiş antimikrobiyal duyarlılık test modelleri bulunmasına rağmen, önerilen dozların klinikte uygulanabilir düzeylerin üzerinde olması, bu yöntemlerin gelecekteki yerinin ne olacağı sorusunu akla getirmektedir<sup>[32,33]</sup>.

## SONUÇ

Biyofilm çalışmaları özellikle son üç yıl içinde oldukça artan hızla devam etmektedir. İnsan karşısında mikroorganizma tek başına zaten tam olarak yenilmemişken, yeni hedef farklı görünüşte ve daha güçlü bir topluluk halindedir. Tıbbi aletler üzerinde

biyofilm oluşumunun kontrol edilmesi için güvenilir örnekleme ve ölçüm tekniklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Uygulama sırasında oluşan doku hasarıyla doğrudan ilişkili olması nedeniyle, biyofilm kaynaklı infeksiyonlar ile mücadele oldukça güç görünmektedir. Bu nedenle, invaziv girişimler sırasında insan kaynaklı biyofilm kontaminasyonunun engellenmesi için antisepsi kurallarına dikkatle uyulması gerekmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Donlan RM, Costerton WJ. Biofilms: Survival mechanisms of clinical relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
2. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:999-1007.
3. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155-16.
4. Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK. How bacteria stick. *Sci Am* 1976;238:86-956.
5. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64.
6. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993;75:499-511.
7. Elder MJ, Stapleton EE, Dart KG. Biofilm related infections in ophthalmology. *Eye* 1995;9:102-9.
8. Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiol* 2001;9:34-9.
9. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-9.
10. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:677-85.
11. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar twitching motility are necessary for *P. aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30:295-304.
12. Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2003;48:2 53-67.
13. Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* 2002;292:195-205.
14. Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol* 2003;154:9-16.
15. Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Letter* 2002;216:69-75.
16. Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peter G. Interaction of von Willebrand factor with *S. aureus*. *J Infect Dis* 1997;176:984-91.
17. Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen binding protein of *S. epidermidis*. *Infect Immun* 1998;66:2666-73.
18. Darzins AL, Russell MA. Molecular genetic analysis of type IV pilus biogenesis and twitching motility using *P. aeruginosa* as a model system- a review. *Gene* 1997; 192:109-15.
19. Whitchurch CB, Hobbs M, Livinston SP, Krishnapillai, Mattick JS. Characterization of *P. aeruginosa* twitching motility gene and evidence for specialized protein export system widespread in eubacteria. *Gene* 1990;101:33-44.
20. Schembri MA, Hjerrild L, Gjermansen M, Klemm P. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* 2003;185:2236-42.
21. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003;11:30-6.
22. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001;7:277-81.
23. Costerton JW, Philip SS. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.
24. Foley I, Marsh P, Wellington EMH, Smith AW, Brown MR. General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: A possible role in chronicity. *J Antimicrobial Chemother* 1999;49:164-5.
25. Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* spp. Strain BD413 biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:1721-7.
26. Wang BY, Chi B, Kuramitsu HK. Genetic Exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:108-12.
27. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiology Letters* 1999;177:63-6.
28. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3357-63.
29. Danese PN. Antibiofilm approaches: Prevention of catheter colonization. *Chemistry and Biology* 2002;9:873-80.
30. Stickler DJ, Evans A, Morris N, Hughes G. Strategies for the control of catheter encrustation. *Int J Antimicrobial Agents* 2002;19:499-506.
31. Yuehuei HA, Friedman FJ. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods* 1997; 30:141-52.
32. 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;37:1771-6.
33. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001;45:2475-9.

### Yazışma Adresi:

Dr. Füsün BEĞENDİK

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ZONGULDAK

Makalenin Geliş Tarihi: 15.07.2003

Kabul Tarihi: 03.10.2003