

Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü

Aybala TEMEL, Bayrı ERAÇ

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Biyofilmler, gerek tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde gerekse konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen ve pek çok farklı hastalıkta rol oynayan mikro-ekosistemlerdir.

Biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, biyofilm enfeksiyonlarının engellenebilmesi için oldukça önemlidir. Biyofilm oluşumunu saptamada sıklıkla kullanılan kolorimetrik esaslı yöntemlerin çeşitli dezavantajları bulunduğundan, standart, hızlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Biyofilm saptama amacıyla da kullanılabilen çeşitli yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlar arasında, elektrik akımına dirençteki değişimin saptandığı “gerçek zamanlı hücre analizi” yöntemi, kızılötesi ışınların penetrasyonundaki değişimin ölçüldüğü “fiber-optik sensör” yöntemi ve biyofilm matrisi komponentlerini saptamaya dayalı “luminisan konjuge oligotiyofen” yöntemi umut vadetmektedir. Bu yöntemler ile daha duyarlı, hızlı ve kantitatif olarak biyofilm yapısı belirlenebilmektedir.

Planktonik hâldeki bakterilerin antibiyotik direncinin yanı sıra, biyofilm yapısından kaynaklanan direnç, biyofilm enfeksiyonlarında tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Biyofilm direncinin multifaktöriyel bir olay olduğu ve birden fazla mekanizmanın eşzamanlı etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Derlememizde, bakteriyel biyofilmlerin oluşumu ile bunu etkileyen faktörler, biyofilm saptama yöntemleri, biyofilm enfeksiyonları ve biyofilm direncinde rol oynayan etkenler incelenmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, biyofilm saptama, antibiyotik direnci

ABSTRACT

Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance

Biofilms are micro-ecosystems that can occur on medical devices and biomaterials, or on host epithelial cells and mucosal surfaces, and play a role in many different diseases.

Methods for determining the formation of biofilm are very important for preventing biofilm infections. Since colorimetric methods which are frequently used to detect biofilm formation have various disadvantages, there is a need for standard, rapid and reliable methods. Various new technologies have been developed that can also be used for biofilm detection. Among these; “real-time cell analysis” method that detects the change in resistance to electric current, “fiber-optic sensor” method in which the change in penetration of infrared rays is measured, and “luminescent conjugated oligothiophene” method based on detecting biofilm matrix components are promising. With these methods, the structure of biofilm can be determined more sensitively, quickly and quantitatively.

In addition to the antibiotic resistance of planktonic bacteria, resistance that results from the biofilm structure, further complicates treatment of biofilm infections. It is thought that the biofilm resistance is a multifactorial event and multiple mechanisms occur simultaneously. In this review, the formation of bacterial biofilms and factors affecting them, biofilm detection methods, biofilm infections and factors that play a role in biofilm resistance are examined.

Keywords: Biofilm, biofilm detection, antibiotic resistance

GİRİŞ

Mikrobiyoloji alanında yaşanan gelişmelerin ışığında, günümüzde çeşitli enfeksiyon hastalıklarının patogeneğinde mikroorganizmaların planktonik formlarının yanı sıra mikrobiyal biyofilmlerin önemli rol oynadığı

bilinmektedir⁽¹⁾. Doğal çevrede sık rastlanabilen bir mikrobiyal yaşam formu olan biyofilm, çeşitli mikrobiyal türlerin çevresel etkenlerden korunmak ve yaşamsal faaliyetleri açısından elverişli ortamda kalabilmek adına oluşturdukları bir mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir⁽²⁾.

Alındığı tarih: 25.09.2017

Kabul tarihi: 10.12.2017

Yazışma adresi: Bayrı Eraç, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

Tel: (0232) 311 40 83

e-posta: erac@yahoo.com

Mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik ekzopolisakkarit yapılar aracılığıyla, canlı veya cansız bir ara yüzeye, geri dönüşümsüz olarak tutunmaları sonrasında oluşturdukları biyofilm yapısı, mikroorganizmaya konak savunmasından kaçış, antibiyotiklere direnç açısından avantaj sağlamaktadır. Su arıtma tesisleri, endüstriyel su soğutma kuleleri gibi cansız ortamlarda biyofilm oluşumu, bakteriyi pek çok dezenfektana, pH değişimi ve kuruluğa dayanıklı hâle getirmektedir^(2,3).

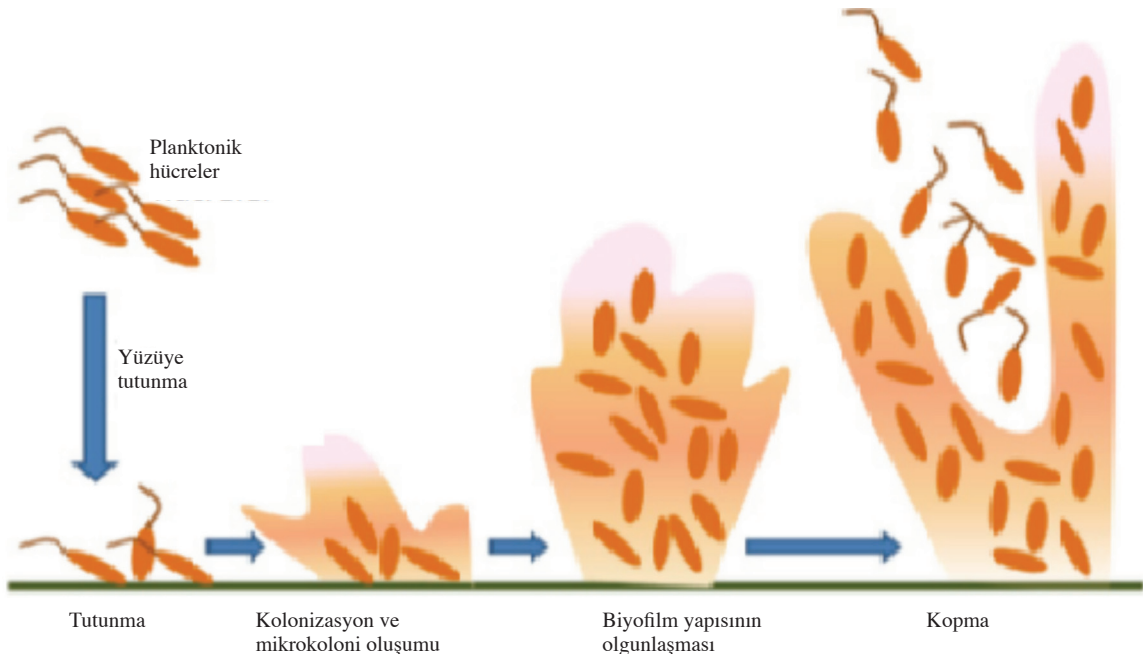
Yüzeylerde mikrobiyal biyofilm oluşumu, uzun yıllardır araştırılmakta olup, günümüzde kronik doku hasarıyla seyreden pek çok bakteriyel enfeksiyonda majör etkenlerden birisi olarak kabul edilmektedir⁽³⁾. İntravenöz kateterler, implantlar, kalp kapakçıkları, kontakt lensler gibi farklı tıbbi araç ve biyomateryaller üzerinde oluşan biyofilmler sonucu gelişen enfeksiyonlar hastalarda ciddi terapötik sorunlara neden olmaktadır⁽⁴⁾. Kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden fazlası biyofilmler ile ilişkilendirilirken nozokomiyal enfeksiyonların %65'inden de biyofilm yapısının sorumlu olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur⁽¹⁾. Ayrıca, biyofilmler yalnızca

klินิก olarak değil çevresel ve endüstriyel ortamlarda da sorunlara neden olabilen yapılardır.

Biyofilm oluşumu

Bakteri hücreleri doğada planktonik formda bulunabildikleri gibi canlı veya cansız bir yüzeye adezyon sonrası çoğalarak mikroorganizma toplulukları hâlinde de bulunabilir⁽¹⁾. Bu topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabilir veya farklı türde mikroorganizmaları içerebilir⁽⁵⁾. Mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu biyofilm yapısı, mikroorganizmanın kolonizasyonunu destekleyen, pH değişikliği, besin yetersizliği gibi olumsuz dış ortam koşullarına, antibiyotik, dezenfektan madde gibi kimyasallara karşı dayanıklı olmasını sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Polisakkaritler, protein, ekstraselüler DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içeren kompleks bir yapı olan biyofilm yapısının oluşumu dinamik bir süreçtir^(2,6).

Biyofilm oluşumu, Şekil 1'de⁽⁷⁾ görüldüğü gibi mikroorganizmanın bir yüzeye tutunması, geri



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları⁽⁷⁾.

dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma evreleri olmak üzere dört basamakta gerçekleşmektedir^(4,8).

1) Tutunma: Planktonik yapıda mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlandığı biyofilm oluşumunun ilk evresidir. Bakteri, flagella hareketi ve tutunduğu yüzeye arasındaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler (Brownian hareketi) sonucu kısa sürede yüzeye tutunur⁽⁹⁾.

2) Geri Dönüşümsüz Bağlanma: Yüzeye tutunmuş bakterinin hücre membranındaki proteinlerinin uyarımı gerçekleşir ve bakteri hücreleri arası iletişim mekanizmaları devreye girer. Bakteri hücresi, ekstraselüler polimerik maddeler sentezlemeye başlar⁽⁴⁾. Bakterinin türüne ve çevresel koşullara göre değişik yapıda olabilen bu maddeler biyofilm matriksinin ana bileşenleri olup çoğunlukla ekzopolisakkaritler, ekstraselüler DNA ve proteinlerden oluşmaktadır. Bu matriks ve içeriğindeki maddeler mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz bağlanmasına aracılık eder⁽¹⁰⁾.

3) Kolonizasyon ve Mikrokoloni Oluşumu: Yüzeye tutunmuş bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturur⁽¹¹⁾. Farklı türden mikroorganizma topluluklarını içeren biyofilm yapılarında her tür kendi mikrokolonisini oluşturmakta ve bu mikrokoloniler arasındaki kanallarla suyun ve besin maddelerinin difüzyonu sağlanmaktadır. Ortamdaki planktonik bakterilerin de mikrokolonilere yapışmasıyla kolonizasyon desteklenir⁽¹²⁾.

Yeni oluşan mikrokolonilerle bakteri popülasyonu gittikçe büyür. Bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasına yarayan Quorum Sensing (QS) sinyal sistemi devreye girer. Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinden oluşan bu sistem, bakteri hücresinde spesifik genlerin ekspresyonunu etkileyerek olgun biyofilm yapısının oluşumunu des-

tekler. Bu aşama aynı zamanda biyofilm fenotipinin ortaya çıkmaya başladığı evre olup, mikroorganizmanın dirençli bir yapı kazanmasıyla sonuçlanabilmektedir^(13,14).

4) Kopma: Biyofilm oluşumu ve olgunlaşması sonrasında biyofilmde yer alan bakteri hücrelerinde genetik düzenlemeler sonucunda flajeller sentezlenir. Bu sayede hareketlenen bakteri hücresi biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılır. Kopan planktonik hücreler yeni odaklara göç eder. Bu durum biyofilmin yayılımına ve bazen yerel enfeksiyonların sistemik hâle geçişine neden olabilmektedir^(2,15).

Bakteriler arası iletişim (Quorum sensing) ve biyofilm

Bir bakteri hücresinin canlılığını sürdürebilmesi ve patogenezi açısından, çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirmesi ve yeni çevre koşullarına uyum sağlaması gerekmektedir. Besin kaynağı ve miktarı, popülasyon yoğunluğu, ozmolarite, pH gibi çevresel faktörlerde değişiklik meydana geldiğinde bakteri bu değişime adapte olmak amacıyla metabolizmasında birtakım düzenlemeler yapmaktadır⁽¹⁴⁾. “Minimum popülasyon birimi algılama” olarak belirtilen, bakteri hücresinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan QS sistemi, bu adaptasyon ve düzenlemelerde önemli rol oynayan bir sistemdir. QS sistemi yardımıyla, bakteri değişen besin kaynaklarına uyum sağlar, aynı besin için yarışan diğer bir bakteriyle rekabet edebilir ve enfeksiyon sırasında çeşitli virülans faktörlerinin regülasyonunu düzenleyerek konak immün yanıtından kaçabilir. QS sisteminde yer alan sinyal molekülleri ile bakterinin bir odakta toplanması sağlanabilmekte ve böylece biyofilm yapısının temeli oluşmaktadır^(16,17).

Sinyal molekülleri, bakteri tarafından normal koşullarda bazal seviyede üretilmektedir. Ortamdaki bakteri sayısının artması durumunda

sinyal molekülleri de belli bir eşik değere ulaşmakta ve bu durumda hem sinyal molekülünün kendisinin hem de bu molekül aracılığıyla kontrol edilen virülans faktörlerinin üretiminde artış gözlenmektedir^(18,19). Üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki gösterdikleri için bu sinyal molekülleri “Otoindükleyiciler” olarak da adlandırılmaktadır^(14,20). QS sinyal moleküllerinin farklı bakteri türlerinde bulunan birçok farklı sınıfı tanımlanmıştır. Açıl Homoserin Lakton (AHL) sınıfı sinyal molekülleri Gram negatif bakterilerde, otoindükleyici peptidler Gram pozitif bakterilerde ve otoindükleyici-2 olarak bilinen moleküller hem gram negatif hem Gram pozitif bakterilerde en çok araştırılan sinyal moleküllerindedir^(16,21). Farklı yapıdaki QS sinyal moleküllerinin oluşturduğu yanıtlar farklı olabildiğinden sinyal moleküllerindeki bu çeşitlilik, aynı türden veya farklı türden mikroorganizmalar arası iletişim açısından önem taşımaktadır⁽²²⁾.

QS sinyal molekülleri aracılığıyla farklı türden mikroorganizmalar arasında pozitif veya negatif yönde etkileşimler gerçekleşebilmektedir. Riedel ve ark.⁽²³⁾ farklı türde mikroorganizmalar olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* ile yaptıkları çalışmada her iki bakteri türünün AHL sinyal moleküllerine dayalı QS sistemine sahip olduklarını ve yine bu sinyal molekülleri aracılığıyla birbirlerinin virülans faktörlerinin sentezini desteklediklerini göstermişlerdir^(22,24).

Kistik fibrozisli hastalarda, hastalığın erken döneminde akciğerlerde görülen *Staphylococcus aureus* kolonizasyonu ilerleyen dönemde yerini *P. aeruginosa*'ya bırakmaktadır. Qazi ve ark.⁽²⁴⁾ yaptıkları çalışmada bu durumun *P. aeruginosa*'nın sinyal moleküllerinin, *S. aureus*'un efektör molekülü olan RNAlII ekspresyonunu inhibe etmesi ve *S. aureus*'un virülans faktörlerinin oluşumunu engellemesinden kaynaklandığını göstermişlerdir. Sinyal

molekülleri aracılığıyla gerçekleşen bu tür çapraz etkileşimlerin, mikroorganizmaların biyofilm oluşumu başta olmak üzere farklı virülans faktörleri üzerinde etkili olduğu ileri sürülmektedir⁽²⁴⁾.

Biyofilm saptama yöntemleri

Biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığının artmasıyla birlikte biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Biyofilm oluşumunun engellenebilmesi, direncin mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve biyofilm enfeksiyonları için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, bu yöntemlerin doğru uygulanması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde gelişen teknolojinin yardımıyla biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı in vitro yöntemden ve deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyonu oluşturulmasına dayalı in-vivo yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikroplak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitesinin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemlerle floresan mikroskopisi, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve elektron mikroskopisinin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Kongo kırmızılı agar yönteminde; biyofilm oluşturma özelliği araştırılacak bakterinin, içeriğinde belirli miktarlarda sukroz, beyin kalp infüzyon buyyonu, kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerine tek koloni ekimleri yapılır. Genellikle 37°C'de 24 saat olacak şekilde uygulanan inkübasyon sonunda, kolonilerde oluşan renk değişimine göre değerlendirme yapılmaktadır. Siyah-koyu kırmızı renkli koloni oluşumu görülen

suslar biyofilm üretimi açısından pozitif olarak, pembe-kırmızı renkli koloni oluşumu görülenler ise biyofilm üretimi açısından negatif suslar olarak yorumlanmaktadır^(27,28).

Standart cam tüp yönteminde belirli miktarda triptik soy buyyon (TSB) besiyeri içeren cam tüplere bakteri inokulasyonu sonrasında tüpler genellikle 37°C de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüp içeriği boşaltılarak tüplere metilen mavisi eklenir. Belirli bir süre beklendikten sonra tüp içeriği tekrar boşaltılır. Tüpün iç çeperinde boyalı bir tabaka varlığı biyofilm oluşumu açısından pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir⁽²⁹⁾.

Christensen yöntemi olarak da bilinen modifiye tüp aderans yönteminde glikozlu TSB besiyeri içeren tüplere bakterinin inokulasyonu ve 37 °C de 24-48 saat inkübasyonu sonrasında tüp içerikleri boşaltılır ve fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır. Her tüpe belirli ve eşit hacimde olacak şekilde “trypan blue”, safranin veya kristal viyole koyularak yavaşça karışması sağlanır. Bir süre bekletildikten sonra tüp içerisindeki boya dökülerek tüpler yeniden boşaltılır. Boşaltılan tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilir ve kurumaya bırakılır. Tüplerin iç çeperinde renkli tabaka varlığı pozitif sonuç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca rengin koyuluğu ve kalınlığına göre susların biyofilm oluşturma kapasitesi çok güçlü, güçlü ve zayıf olarak derecelendirilerek değerlendirme yapılabilmektedir. Renk değişiminin oluşmaması ise negatif sonuç olarak kaydedilir. Ayrıca besiyerinin havayla temas ettiği kısımda boya kalıntısı olabildiği gibi bu durum da negatif sonuç olarak değerlendirilmektedir⁽³⁰⁾.

Mikroplakların kullanıldığı yöntemler, biyofilm oluşumunu saptamaya yönelik araştırmalarda çeşitli modifikasyonlarla sık yeğlenen yöntemlerdendir. Özellikle spektrofotometrik mikrop-lak yöntemiyle diğer yöntemlerden daha hassas,

spesifik ve kantitatif sonuçlar elde edilebildiği belirtilmektedir⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Spektrofotometrik mikrop-lak yönteminde genellikle 96 kuyucuklu mikrop-laklar kullanılmaktadır. Belirli hacimde uygun besiyeri [%1-3 glukoz içeren beyin-kalp infüzyon buyyon veya TSB), içeren mikrop-lak kuyucuklarına bakteri süspansiyonu inokule edilir ve uygun koşullarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda mikrop-laklar ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltılır. Boşaltılan kuyucuklar yavaşça PBS gibi uygun bir yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra her kuyucuğa eşit miktarda boya maddesi eklenir. Bu aşamadan önce metanol veya sodyum asetat gibi bir ajanla biyofilmin fiksasyonu sağlanabilir. Boyama amacıyla safranin veya “trypan blue” kullanılabileceği gibi sıklıkla kristal viyole yeğlenmektedir. Kuyucuklara kristal viyole eklenmesinin ardından boyanın biyofilme penetrasyonu için belirli bir süre beklenir ve sonra kuyucuklar boşaltılarak yeniden yıkama işlemi yapılır. Bu aşamada kristal viyole biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerini boyamakta olup biyofilm yapısına katılmamış diğer hücre ve maddeler yıkama adımlarıyla uzaklaştırılmaktadır. Yüzeğe tutunmuş bakteri hücrelerine ve biyofilme zarar vermemek ve doğru sonuçlar elde edebilmek adına yıkama işlemlerinin yavaş yapılması gerekmektedir. Yıkama sonrasında mikrop-laklar oda ısısında en az otuz dakika süreyle kurumaya bırakılır. Kuruma sonrasında mikrop-laklar etanol, asetik asit veya aseton gibi ajanlarla muamele edilir ve spektrofotometrik ölçüm yapan mikrop-lak okuyucu cihazda belirli bir dalga boyunda ölçüm yapılarak, her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlenir. Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değeriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptanabilir^(25,26).

Kullanılan farklı yöntemlerde çalışılan mikroorganizmanın türüne göre inokulum miktarı, besi-

yeri, inkübasyon koşulları değişebilmektedir. Bu durum yöntemlerin uygulanmasında modifikasyonları beraberinde getirmekte ve yöntemlerin standardizasyonunu zorlaştırmaktadır. Ayrıca in vitro biyofilm modellerinde ortamdaki besin maddelerinin azalması, konak-patojen etkileşiminin olmaması gibi nedenlerle elde edilen sonuçların in vivo ortamı tam olarak yansıtamadığı düşünülmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarıyla mücadelede antibiyofilm ajanların ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için yapılan araştırmalarda kullanılan klasik in vitro yöntemlere alternatif olabilecek yeni yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Yukarıda sözü edilen kolorimetrik esaslı yöntemler, kullanılan boyaların penetrasyon zorlukları, toksisite ve uygulama zorluğu gibi dezavantajlar taşımaktadır. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (real time cell analyzer-RTCA) yöntemi bu alanda hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilecek, kolay uygulanan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Bu yöntemde yüzeyi altın mikroelektrodlarla kaplanmış özel mikroplaklar kullanılır. Aderan hücrelerin yüzeye tutunması ile elektrik akımına karşı direnç olarak tanımlanan impedansta değişim olur ve bu değişim de hücre sayısı ve biyofilm oluşumu ile orantılıdır⁽³¹⁾. Başka bir söylemle, impedans değişimi ölçümüne dayalı bu yöntemde mikroelektrot taşıyan mikroplakalar kullanılarak biyofilm oluşumu gerçek zamanlı olarak izlenebilmekte ve farklı maddelerin biyofilm oluşumu üzerine etkinlikleri değerlendirilebilmektedir. Ayrıca bu yöntemle elde edilen sonuçların klasik yöntemlerle uyumlu olduğu da belirtilmiştir⁽³²⁾. Benzer bir mantıkla çalışan bir diğer yöntem de biyofilm gelişimini yine gerçek zamanlı izlemeye olanak veren fiber-optik sensörlerin kullanılmasıdır⁽³³⁾. Bu yöntem, fiber-optik çekirdek üzerinde gelişen biyofilm tabakanın, yakın kızılötesi ışınların penetrasyonunda değişim yaratması esasına dayanmaktadır. Biyofilm tabakanın kalınlığı arttıkça geçirgenlik yani transmitans azalmaktadır.

Bu yöntemle biyofilm inhibitörlerinin etkisi de değerlendirilebilmektedir. Biyofilm oluşumunu belirlemede, fimbria proteini ve bakteriyel selüloz gibi ekstraselüler matriks komponentlerinden yararlanan yenilikçi bir yaklaşım daha kullanılmıştır. Burada “luminisan konjuge oligotiyofen” molekülleri konformasyonel ve spesifik olarak söz konusu ekstraselüler komponentlere bağlanmakta ve hücrelere zarar vermeden biyofilm oluşumunu gözlemlemeye olanak vermektedir⁽³⁴⁾. Bu yöntem, söz konusu ekstraselüler matriks komponentlerinin oranları hakkında da bilgi verebilmekte, sıvı kültürlerde, biyotik ve abiyotik yüzeylerde kullanılabilir.

Biyofilm enfeksiyonları

Mikrobiyal enfeksiyonların patogenezi anlamak amacıyla yapılan bilimsel araştırmalarda önceleri patojen mikroorganizmaların yalnızca planktonik formları dikkate alınmışsa da günümüzde gelişen teknoloji ve mikroskopik yöntemler sayesinde mikrobiyal biyofilmlerin enfeksiyonlar açısından önemi ortaya konmuştur. Biyofilm yapısı konakçı immün sistemiyle etkileşerek immün yanıt oluşumuna neden olan ciddi bir enfeksiyon ve enflamasyon etkeni olarak kabul edilmektedir⁽³⁵⁾. Mikroorganizma tarafından çevresel stres koşullarında oluşturulan bu yaşam formu, biyotik ve abiyotik farklı yüzeylerde oluşabilmektedir. Gerek tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde gerekse konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen biyofilmler, kronik yara enfeksiyonlarında, kistik fibrozis, endokardit gibi pek çok farklı hastalıkta rol oynamaktadır^(7,17,36).

Günümüzde implantlar, yapay kalp kapakçıkları, protezler gibi kalıcı tıbbi cihazların kullanımındaki artışa paralel olarak biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığı artış göstermektedir. İnsanlarda gelişen yumuşak ve sert doku enfeksiyonlarının %80'inin biyofilm ilişkili enfeksiyonlar olduğu belirtilmektedir^(7,36). Kalıcı tıbbi

cihazlarda gelişen biyofilm enfeksiyonlarında, etken mikroorganizma normal flora üyesi veya nozokomiyal bir patojen olabilmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarında sıklıkla etken olan mikroorganizmalar ve ilişkili tıbbi araçlar Tablo 1'de gösterilmektedir^(17,37).

Kullanılan tıbbi araç veya biyomateryalde biyofilm oluşumu, cihazda fonksiyon kaybının yanı sıra hasta için sürekli bir enfeksiyon kaynağı olma riski taşımaktadır. Biyofilm enfeksiyonu başlangıçta asemptomatik seyredebilir. Ancak konakçı immün direncinin düştüğü durumlarda akut enfeksiyon gelişimiyle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle invaziv girişimler öncesi özellikle immün sistemi baskılanmış ve yüksek risk grubunda olan hastalarda profilaktik amaçlı antibiyotik tedavisi uygulanmaktadır^(17,38,39).

Mikroorganizmanın planktonik formuna etkili olan antibiyotiğin koruyucu dozunun biyofilmde etkisiz kalması bu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırarak mortalite riskini yükseltmektedir⁽¹⁷⁾. ABD'de yapılan araştırmalarda tıbbi cihazlarda gelişen biyofilm enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranları; penis implantları, meme implantları ve protezlerde %1-3, santral venöz kateterlerde %3-8, idrar kateterlerinde %10-30 olarak belirtilirken, kardiyak tıbbi cihazların bazıları için bu oranın %25-50'lere ulaştığı saptanmıştır^(37,40).

Bakteriyel biyofilmlerin yanı sıra fungal patojenlerin etken olduğu biyofilm enfeksiyonlarıyla da karşılaşmaktadır. Fırsatçı patojen bir mantar

türü olan *Candida albicans*'ın kateterler başta olmak üzere çeşitli tıbbi cihazların yüzeyinde kolonizasyonu ve biyofilm oluşturması yüksek mortaliteyle seyreden kandidiazis tablolarına yol açmaktadır. *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* ve *Candida tropicalis* kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olan diğer mantar türleridir⁽⁴¹⁾.

Ventrikulo-pulmoner şant kullanan hastalarda tekrarlayan menenjitlerinin *Coccidioides immitis*'e bağlı biyofilm enfeksiyonlarıyla, protez kalp kapakçığı kullanan hastalarda endokardit gelişiminin *Aspergillus* biyofilmleriyle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. *Candida* ve *Aspergillus* biyofilmleri implant kullanan hastalarda gelişen enfeksiyonların %8'inden sorumlu tutulurken, hastanın hayatta kalma oranını %50'ye kadar düşürmeleriyle dikkat çekmektedir⁽¹⁷⁾.

Yabancı cisimle ilişkili olmaksızın canlı organizmada çeşitli koşullarda farklı dokularda, epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde biyofilm oluşabilmektedir. Daha çok streptokok türlerinin neden olduğu ve diş çürüklerinde önemli rol oynayan dental plaklar, üropatojenik *Escherichia coli*'nin etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'in etken olduğu kronik otitis media, *Staphylococcus lugdunensis* ve *Enterococcus durans*'in etken olduğu doğal kapak endokarditi canlı dokuda oluşan biyofilm enfeksiyonlarına örnek gösterilebilir. Bu enfeksiyonlarda ilk ola-

Tablo 1. Biyofilm enfeksiyonlarıyla ilişkili tıbbi araçlar ve etken mikroorganizmalar.

Tıbbi araç	Etken mikroorganizmalar
Yapay kalp kapakçıkları	KNS, <i>Staphylococcus aureus</i> , Streptokoklar
Koroner stentler	<i>Staphylococcus aureus</i> , KNS, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Santral venöz kateterler	KNS, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Enterokoklar, <i>Candida</i> spp.
Üretral kateterler	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i> spp., KNS
Periton diyaliz kateterleri	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Meme implantları	Stafilokoklar, <i>Escherichia coli</i>
Koklear implantlar	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Streptokoklar
Ortopedik protezler	Stafilokoklar, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok

rak amprik antimikrobiyal tedavi uygulanmaktadır. Ancak biyofilmdeki bakterinin antibiyotiklere duyarlılığının farklı olabileceği göz ardı edilmemeli ve biyofilm etkinliği açısından uygun antimikrobiyal tedavi yaklaşımı yeğlenmelidir^(17,42,43).

Biyofilm direnci

Antibiyotik direnci, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi olup, artan direnç oranlarına kıyasla geliştirilen yeni bileşik sayısı oldukça azdır. Planktonik hâldeki bakterilerin antibiyotik direncinin yanı sıra hem konak immün sistemi hem de antimikrobiyal ajanlar açısından önemli bir bariyer olan biyofilm yapısının neden olduğu direnç, biyofilm enfeksiyonlarında tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır^(44,45). Yapılan araştırmalarla, biyofilmde yer alan mikroorganizmaların planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Dezenfektanların etkinliği açısından bakıldığında benzer şekilde biyofilm yapısı içerisinde bakterilerin dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençli olabildikleri saptanmıştır^(13,46).

Biyofilm direncinde dışa atım pompaları, enzi-

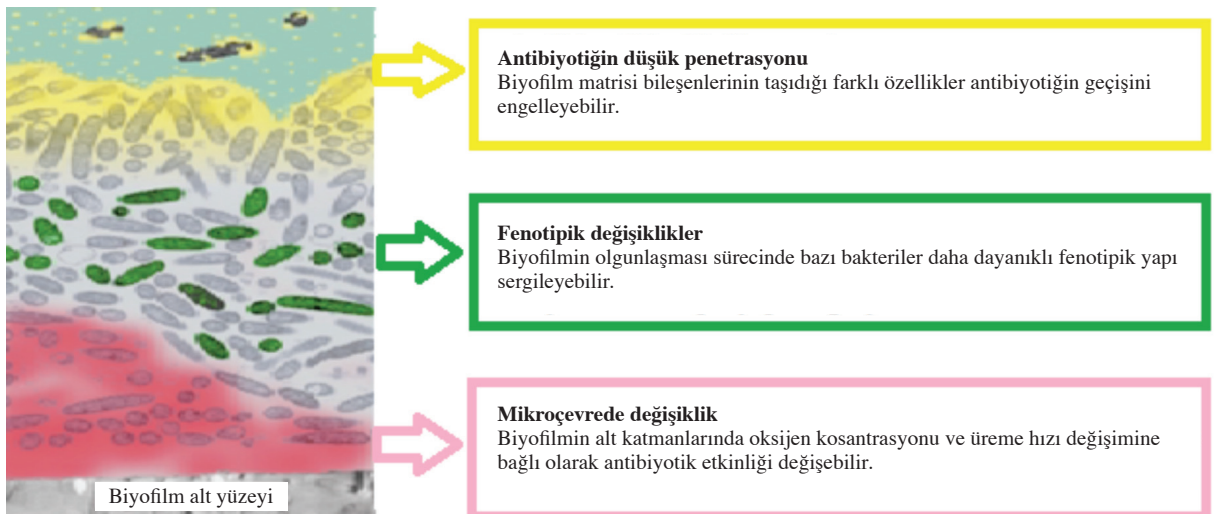
matik inaktivasyon, ilaç hedefinde mutasyon gibi bilinen antibiyotik direnç mekanizmaları temel sorumlu mekanizmalar olarak görülmemektedir. Ayrıca, biyofilm direncinin multifaktöriyel bir olay olduğu ve birden fazla mekanizmanın eşzamanlı etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir^(7,46).

Antibiyotiğin biyofilm içerisine düşük penetrasyonu, biyofilmi oluşturan mikro-çevrede meydana gelen değişiklikler ve biyofilmi oluşturan bakterilerdeki fenotipik ve metabolik değişiklikler, biyofilm direncinin nedenlerine ilişkin ileri sürülen farklı tezler olup, Şekil 2’de sunulmaktadır^(46,47).

Antibiyotiğin Biyofilme Düşük Penetrasyonu

Biyofilm matriksi sahip olduğu mekanik ve fizikokimyasal özellikler aracılığıyla antibiyotik ve antiseptikler de dâhil olmak üzere pek çok bileşiğin penetrasyonunu azaltarak biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerine ulaşmasını engellemektedir⁽⁴⁸⁾.

Antibiyotiğin penetrasyonundaki düşüşün nedenlerinden birisi olarak biyofilm matriksiyle ilaç molekülü arasında gerçekleşen elektriksel



Şekil 2. Biyofilm direnç mekanizmalarına ilişkin ileri sürülen farklı tezler.

etkileşimler gösterilmektedir. Negatif yüklü matriks polimerinden oluşan biyofilm yapısında, pozitif yüklü antibiyotiğin penetrasyonu bozulmakta ve antibiyotiğin difüzyonu olumsuz etkilenmektedir⁽⁴⁷⁾. Örneğin *P. aeruginosa* biyofilmlerinde negatif yüklü biyofilm polimeri nedeniyle pozitif yüklü aminoglikozid grubu antibiyotiklerin penetrasyonunda düşüş olduğu çalışmalarla saptanmıştır⁽⁴⁹⁾. *E. coli* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinde fosfomisin ve siprofloksasin ile yapılan bir başka çalışmada, ilaç uygulamasından 6 saat sonra ilaçların %50'sinden fazlası hedefe ulaşmışsa da tedavi sonunda bakterinin eradikasyonu açısından istenilen sonuca ulaşılmadığı belirtilmekte ve bu durum biyofilm direnciyle ilişkilendirilmektedir⁽⁵⁰⁾.

Antibiyotiğin düşük penetrasyonu ve gecikmiş difüzyonu, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmanın yanında antibiyotiğin subinhibitör konsantrasyonlarına maruz kalan bakterilerde direnç gelişimini tetikleyebilecek bir durum olarak dikkat çekmektedir⁽⁵¹⁾.

Biyofilm pek çok antibiyotik açısından tedavide sorun yaratan bir yapı olsa da florokinolonlar, ampisilin ve rifampin gibi bazı antibiyotiklerin biyofilm matriksinden geçişte sorun yaşamadığı ve biyofilme iyi nüfuz edebildiği çalışmalarla saptanmıştır. Ancak biyofilm enfeksiyonlarında bu antibiyotiklerle uygulanan tedavilerde istenilen sonuca ulaşamaması ilacın düşük penetrasyonunun tek başına direnci açıklamaya yeterli olmadığını göstermektedir⁽⁵⁰⁾.

Mikroçevrede Değişiklik

Biyofilmin farklı katmanlarında oksijen konsantrasyonu, besin maddelerinin yoğunluğu, pH gibi faktörler değişkenlik gösterebilmektedir. Bu durum biyofilmi oluşturan bakteri popülasyonunda üreme hızı ve antibiyotiklere duyarlılık açısından farklılıkları beraberinde getirmektedir⁽⁵²⁾.

Oksijen konsantrasyonunun biyofilmin alt katmanlarında yüzeye oranla daha düşük olması ve mikroaerofil-anaerobik ortam oluşumu, bu bölgelerde aminoglikozid grubu antibiyotiklerin etkinliğini azaltmaktadır. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde alt katmanlarda düşük oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak tobramisin ve siprofloksasinin bakterisidal etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bazı atık maddelerin biyofilmin alt katmanlarında birikimi sonucu oluşan asidik ortam ve pH değişikliği de antibiyotik aktivitesi açısından olumsuz etkiler yaratmaktadır⁽⁵³⁾.

Pek çok antibiyotiğin metabolik olarak aktif olan ve üreme fazındaki bakterilere etkinlik gösterdiği bilinmektedir. Özellikle olgun biyofilm yapısında, mikroorganizmalar genellikle daha düşük üreme hızı sergilemektedir. Besin miktarının sınırlı oluşuyla ilişkilendirilen düşük üreme hızının, antibiyotiklerin etkinliğini düşürerek dirence neden olduğu düşünülmektedir. Biyofilm yapısı içerisinde yavaş üreme hızına sahip *P. aeruginosa* suşlarıyla yapılan çalışmada, biyofilmdeki bakterinin beta-laktam antibiyotiklere ve tetrasiklinlere duyarlılığın önemli ölçüde azaldığı, florokinolon aktivitesinin ise üreme hızından etkilenmediği gözlenmiştir^(54,55).

Fenotipik Değişiklikler

Bakterinin bir yüzeye tutunmasından olgun biyofilm yapısının oluşumuna kadar geçen süreçte bakteri hücresi çeşitli fizyolojik, metabolik ve fenotipik değişikliklere uğramaktadır. Bu süreçte mikroorganizmada QS sisteminin devreye girdiği ve çeşitli sinyal moleküllerinin salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. Bu olayların regülasyonunda görevli genlerin ekspresyonunda yaşanan değişikliklere dayanarak biyofilm direncinin temelinde genetik mekanizmaların olabileceği ileri sürülmektedir.

Mah ve ark.⁽⁵⁶⁾ biyofilm oluşturma özelliğine sahip *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada,

bakteride siklik- β -glukan yapıları ve bunların sentezinde görevli enzimi kodlayan *ndvB* geni üzerinde araştırmalar yapmıştır. Çalışma sonucunda, *ndvB* geni aracılığıyla sentezlenen glukan yapılarının periplazmik aralıkta aminoglikozidlerle etkileşek antibiyotığın hedefe ulaşmasını engellediği gözlemlenmiştir. *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine yapılan bir başka araştırmada, aminoglikozid grubu antibiyotiklerin bakteri dış membranına afinitesinde azalmanın bakterideki *tolA* geni aktivasyonuna bağlı olabileceği belirtilmektedir^(56,57).

Bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarından olan atım pompalarının bakteride biyofilm direncini arttıran faktörlerden birisi olabileceği ileri sürülmektedir⁽⁴⁷⁾. Biyofilm varlığında bakterilerde bazı atım pompalarının ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarla çok sayıda atım pompasına sahip olan *E. coli*'de AcrAB-TolC pompasının, *P. aeruginosa*'da kinolon direncine aracılık eden mexAB-OprM pompasının biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerinde normal hücrelere kıyasla indüklenmiş durumda oldukları saptanmıştır^(47,58). Bazı atım pompalarının dirençle ilişkisini gösteren farklı çalışmalar sonuçları mevcutsa da doğrudan biyofilm yapılarıyla ilişkili atım pompalarının varlığı tartışmalıdır⁽⁵⁹⁾.

Persistan Hücreler

Persistan hücreler, biyofilm direncini açıklamaya yönelik bir diğer yaklaşım olup, bakteri popülasyonlarında persistan hücrelerin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Persistan hücreler, 1944'te Joseph Bigger tarafından *S. aureus* ile yapılan çalışmalar sonucu tanımlanmıştır. Bigger yaptığı çalışmada 3 günlük penisilin tedavisi uyguladığı 250.000.000 bakteriden oluşan popülasyonda tedavi sonrasında sayıları 100'den az olsa da canlılığını sürdüren bakteri hücreleri olduğunu saptamıştır. Diğer bakterileri öldüren penisilin konsantrasyonunda canlılığını koruyan

bu persistan bakteri hücrelerinin büyümeye devam ettiği gözlenmiştir. Aynı çalışma sonucunda bakteri popülasyonu içerisinde toplam nüfusun %1'inden daha azını oluşturan persistan hücrelerin, popülasyondaki diğer bakteri hücreleriyle izogenik yapıda olup, fenotipik farklılıklar taşıdığı, ve bu sayede diğer bakterileri öldüren antibiyotik konsantrasyonlarında yaşamda kalabilen daha dayanıklı hücreler oldukları belirtilmektedir^(52,60). Persistan hücrelerin yüksek dozda antibiyotik maruziyeti sonrasında dahi canlılıklarını koruyabilmeleri tedavide karşılaşılan biyofilm direncinin yanı sıra yineleyen enfeksiyonların nedenleri arasında gösterilmektedir⁽⁶¹⁾.

Günümüzde biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığında yaşanan artış ve mortalite oranlarındaki yükselme endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar ve elde edilen bilgiler ışığında, biyofilm oluşumunda ve direnç mekanizmalarında başta mikroorganizmanın türü ve kullanılan antimikrobiyal ajan olmak üzere pek çok faktör ve farklı mekanizma olabileceği anlaşılmaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarıyla mücadelede uygulanabilecek temel yaklaşımlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Klinikte öncelikli hedef, etkin temizlik ve dezenfeksiyon işlemleriyle yüzeylerde biyofilm oluşumunun önlenmesi olmalıdır.
- Biyofilm oluşumunu saptamada modern teknolojilerden yararlanan, hızlı, duyarlı ve güvenilir yöntemlerin kullanılması önem taşımaktadır. Bunlar arasında, elektrik akımına dirençteki değişimin saptandığı "gerçek zamanlı hücre analizi" yöntemi, kızılötesi ışınların penetrasyonundaki değişimin ölçüldüğü "fiber-optik sensör" yöntemi ve biyofilm matriks komponentlerini saptamaya dayalı "luminisan konjue oligotiyofen" yöntemi sayılabilir.
- Biyofilm yapısına daha iyi difüze olduğu bilinen florokinolon ve rifampin gibi antibi-

yotikler ile asetilsistein gibi anti-biyofilm ajanların veya QS inhibitörlerinin kombine kullanımı yararlı olabilecektir.

- Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik olarak, biyofilme etkili solüsyonlar ve yeni antibiyofilm ajanların geliştirilmesi özendirilmelidir.

Terapötik sorunların yanı sıra tedavi maliyetlerinde ciddi artışa yol açan bu enfeksiyonların ortadan kaldırılmasında biyofilm direncinin mekanizmaların aydınlatılması da oldukça önemlidir. Yakın gelecekte bu alanda yapılan çalışmaların hızla artması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
2. Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. Antibiotic resistance: a "dark side" of biofilm associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn*. 2013;123(6):309-13.
3. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011;3(2):55-65. <https://doi.org/10.4248/IJOS11026>
4. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*. 2006;64(4):313-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
5. Jones HC, Roth IL, Saunders WM 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*. 1969;99(1):316-25.
6. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*. 2017;5(2):E15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
7. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*. 2016;198(1):1-15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
8. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000;182(10):2675-9. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>
9. Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: What a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol*. 2003;11(4):179-84. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00047-7)
10. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
11. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. 1994;176(8):2137-42. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994>
12. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev*. 1990;54(1):75-87.
13. Omar A, Wright J, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017;5(1):E9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
14. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*. 2003;46(4):207-14. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1120>
15. Vlassova N, Han A, Zenilman JM, James G, Lazarus GS. New horizons for cutaneous microbiology: The role of biofilms in dermatological disease. *Br J Dermatol*. 2011;165(4):751-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10458.x>
16. Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol*. 2002;10(8):365-70. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02400-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02400-9)
17. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008;59:415-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>
18. Kempner ES, Hanson FE. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol*. 1968;95(3):975-9.
19. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1300-7. <https://doi.org/10.1172/JCI20074>
20. Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T. Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 2009;191(12):3919-27. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-08>
21. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol*. 2002;184(10):2576-86. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2576-2586.2002>
22. Mdownell P, Affas Z, Reynolds C, et al. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2001;41(12):503-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02539.x>
23. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*. 2001;147(pt 12):3249-62. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3249>
24. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, et al. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2006;74(2):910-9. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.910-919.2006>
25. Öztürk İ, Yurtman AN, Eraç B, Gül-Yurtsever S, Ermertan Ş, Hoşgör-Limoncu M. In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(8):483-6.
26. 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):891-9.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
27. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:417247.
<https://doi.org/10.1155/2012/417247>
 28. Kart Yasar K, Aybar Bilir Y, Pehlivanoglu F, Sengoz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*. 2011;25(2):89-93.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2011.089>
 29. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. *Inönü Univ Tıp Fak Derg*. 2006;13(3):193-7.
 30. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):996-1006.
 31. Valdes L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Monitoring in real time the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* upon the intestinal epithelial cell line HT29. *J Microbiol Methods*. 2015;119:66-73.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.022>
 32. Gutiérrez D, Hidalgo-Cantabrana C, Rodríguez A, García P, Ruas-Madiedo P. Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. *PLoS One*. 2016;11(10):1-17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163966>
 33. 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):883-7.
<https://doi.org/10.2116/analsci.33.883>
 34. 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.
<https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.24>
 35. Hänsch GM. Host defence against bacterial biofilms: "Mission Impossible"? *ISRN Immunol*. 2012;2012:853123.
 36. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(2):201-8.
<https://doi.org/10.1586/14787210.6.2.201>
 37. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
<https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
 38. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):34-40.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
 39. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001;183(23):6746-51.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
 40. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1567-72.
<https://doi.org/10.1086/323130>
 41. Thomas JG, Litton I, Rinde H. Economic impact of biofilms on treatment costs In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, eds. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. Taylor & Francis Group, CRC Press, 2005: 21.
 42. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003;301(5629):105-7.
<https://doi.org/10.1126/science.1084550>
 43. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*. 2006;296(2):202-11.
<https://doi.org/10.1001/jama.296.2.202>
 44. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012;272(6):541-61.
<https://doi.org/10.1111/joim.12004>
 45. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(5):580-9.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
 46. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect*. 2004;57(2):97-104.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.01.004>
 47. Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
 48. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. 2003;185(5):1485-91.
 49. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*. 2003;5(13):1213-9.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>
 50. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(4):366-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005>
 51. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2467-73.
<https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005>
 52. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):510-43.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
 53. Walters MC, 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):317-23.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>
54. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*. 2002;41(6882):740-3.
<https://doi.org/10.1038/416740a>
55. Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT, McFeters GA. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol Prog*. 1996;12(3):316-21.
<https://doi.org/10.1021/bp9600243>
56. 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):306-10.
<https://doi.org/10.1038/nature02122>
57. Sadvskaya I, Vinogradov E, Li J, Hachani A, Kowalska K, Filloux A. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: The *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1 \rightarrow 3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology*. 2010;20(7):895-904.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwq047>
58. 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):860-7.
59. Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(23):7376-82.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08>
60. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):999-1007.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
61. Lebeaux D, Fernández-Hidalgo N, Chauhan A, et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: Challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(2):146-59.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70266-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70266-4)