Hastanede Yatan Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyofilm Formasyon Aktiviteleri

Biofilm Formation Activities of Isolated Microorganisms from Hospitalized Patients

Abdulhamit Çalı¹, Cem Çelik², Uğur Tutar³, Mustafa Zahir Bakıcı²

1Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sivas, Türkiye

2Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Sivas, Türkiye

3Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sivas, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Günümüzde antimikrobiyallere dirençli mikroorganizmaların giderek artması bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Antimikrobiyal maddelere karşı direncin önemli nedenlerinden birisi de biyofilmlerdir. Biyofilm, mikroorganizmalar için korunaklı bir yapıdır ve bu yapının içinde yaşayan mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara ve dezenfektanlara karşı planktonik formlara oranla 1000 kata kadar daha dirençli olabilmektedir. Bu çalışmada, hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarının biyofilm formasyon aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM ve GEREÇLER: Bu çalışmada, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi servislerinde ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden yapılan kültürlerde üreyen 25'er adet *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarının biyofilm üretim kapasiteleri mikrotitre plak yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Biyofilm formasyonları negatif kontrol değeri baz alınarak; biyofilm oluşturmayan = 0, zayıf biyofilm = I, orta dereceli biyofilm = II ve güçlü biyofilm = III olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR: Yapılan çalışma sonrasında izolatların toplam % 89'unda zayıf, orta ve güçlü düzeylerde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma oranları sırası ile % 100, % 88, % 92 ve % 76 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Hastane kaynaklı *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarının önemli oranlarda biyofilmler oluşturduğu görülmüştür. Mikroorganizmalarda direnç gelişimi ile ilgili çalışmalarda bu durumun da göz önünde bulundurulması önemli olabilir. Çalışmamızda elde edilen verilerin bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalar için literatüre veri sunacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Aile içi istismar; anne; çocuk; örselenme

ABSTRACT

INTRODUCTION: Increasing numbers of antimicrobial-resistant microorganisms today are causing serious problems in the treatment of bacterial infections. One of the major causes of resistance to antimicrobials is biofilms. Biofilm is a sheltered structure for microorganisms and microorganisms living within this structure can be up to 1000 times more resistant to antimicrobial agents and disinfectants than planktonic forms. In this study, it was aimed to evaluate biofilm formation activities of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* microorganisms which are frequently isolated from hospital infections.

METHODS: In this study, the biofilm production capacities of 25 *A. baumannii*, 25 *P. aeruginosa*, 25 *S. aureus* and 25 *C. albicans* microorganisms that were cultured in various clinical specimens sent from the patients hospitalized in Cumhuriyet University Faculty of Medicine Practice and Research Hospital services and intensive care units were evaluated by microtiter plate method. Biofilm formations were evaluated based on negative control value how non-biofilm = 0, weak biofilm = I, moderate biofilm = II and strong biofilm = III.

RESULTS: At the end of the study, 89% of the isolates were found to have weak, moderate and strong biofilm formation. Biofilm formation rates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* were 100%, 88%, 92% and 76%, respectively.

DISCUSSION and CONCLUSION: Hospital-borne *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* and *C. albicans* microorganisms were found to form biofilms at significant proportions. Consideration of this situation may be important in studies on resistance development in microorganisms. We think that the data obtained in our study will provide literature data for further studies in this regard.

Keywords: Biofilm, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

İletişim / Correspondence:

Abdulhamit Çalı

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Sivas, Türkiye

E-mail: abdul.hamit.c2@gmail.com

Başvuru Tarihi: 20.03.2018

Kabul Tarihi: 08.11.2018

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonları, morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini arttırmalarından dolayı önemini ve güncelliğini korumaya devam eden sağlık sorunlarıdır (1). Antibiyotiklere karşı direncin önemli bir nedeni mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarıdır. Biyofilm, cansız veya canlı bir yüzeye yapışan, kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matriks (EPM) içinde hareketsiz halde bulunan ve bir katı yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (2). Biyofilmler, mikroorganizmaları birçok olumsuz koşullardan korur. Biyofilm içerisindeki bakteri, mantar gibi birçok mikroorganizma varlığını sürdürebilir. Bu mikroorganizmalar özellikle immün sistemi baskılanmış ve kalıcı tıbbi araç veya kateteri olan hastalarda önemli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. İnsan vücudunda kateterler, kontakt lens, kalp pilleri, protez kalp kapakçıkları, rahim içi araç, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde biyofilmler oluşabilir (3).

Biyofilmler, özellikle çevresel ve kimyasal strese karşı oluşturmuş olduğu hücre dışı EPM ile koruma, hayatta kalma, antimikrobiyaller tarafından öldürülme ve fagositoza karşı direnç sağlar (4). Enfeksiyonlar ile ilişkili patojenlerin biyofilmler içerisinde planktonik formlarına göre antimikrobiyal maddelere karşı 1000 kata kadar dirençli olabildikleri bilinmektedir (5,6). Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların yüksek direncini açıklamak için çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar; biyofilm yapısına antimikrobiyal maddelerin sınırlı nüfuz etmesi, besin ve oksijen sınırlaması nedeniyle yavaş büyüme, genel stres yanıtına katılan genlerin ekspresyonu ve biyofilmin kendine özgü mimarisinin ortaya çıkmasıdır (7).

Çalışmamızda, yüksek mortalite ve morbiditeye neden olabilen, sıklıkla hastane enfeksiyonlarından izole edilen *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*'ın biyofilm formasyon aktivitelerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Yaptığımız çalışmanın mikroorganizmaların biyofilm oluşturma mekanizmalarının anlaşılması, biyofilmlerin önlenmesi, biyofilmler ve antimikrobiyallere

direnç konularında yapılacak daha ileri çalışmalar için literatüre veri sunacağını düşünmekteyiz.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi servislerinde ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden hastanede yatışlarından en az üç gün sonra üretilen ve hastane direnç surveians programınca hastane enfeksiyonu olarak kabul edilen *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans*'ın biyofilm formasyonları Christensen ve arkadaşlarının (8) tanımladığı mikrotitre plak test yöntemi kullanılarak incelendi.

Laboratuvara 49'u dahili servislerden, 11'i cerrahi servislerden ve 40'ı yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik örnekler özelliklerine uygun olarak % 5 koyun kanlı agar, Eosin Metilen Blue (EMB) agar, ve Çukulatamsı agar besiyerlerinden bir veya birkaçına ekilerek 36 + 1 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikroorganizmalar koloni morfolojisi, Gram boyama ve konvansiyonel test yöntemleri ile değerlendirildi. Maya olduğu anlaşılan mikroorganizmaların Sabouraud dekstrozağara (SDA) pasajları yapıldı. Mikroorganizmalar Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı kullanılarak matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi yöntemi ile üretici firma çalışma prosedürlerine göre tanımlandı.

Bu çalışmada kullanılan örneklem büyüklüğü güç analizi $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,10$ ve $(1 - \beta) = 0,90$ olarak alındığında 25'er *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* alınmasına karar verildi ve testin gücü power = 0,9038 olarak tespit edildi. Çalışmada her bir mikroorganizmadan 25'er adet olmak üzere toplamda 100 adet izolat kullanıldı. *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* izolatları mikrosantrifüj tüplerinin içinde süt ile karıştırılarak -20 oC'de saklandı.

Biyofilm Oluşturma Yöntemi

Buzdolabında -20 oC'de saklanan 100 adet izolat, kanlı agar besiyerine pasajlanarak 37 °C'de 24 saat, maya izolatları ise SDA besiyerine pasajlanarak 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Çalışmada kullanılan izolatlar, % 0,25 glukoz

içeren Tryptic soy broth (TSB) içinde süspansiyon haline getirilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Süspansiyonlar 0,5 McFarland ölçüsüne göre hazırlandı ve her birinin 108 cfu/ml olması sağlandı. Her bir süspansiyondan 200 µl alınarak 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikropklara transfer edildi. Mikroorganizma eklenmemiş 200 µl TSB negatif kontrol olarak kullanıldı. Süspansiyon ilave edilmiş 96 kuyucuklu mikropklar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Kuyucuklardaki planktonik hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için kuyucuklar yavaşça boşaltılarak iki kez fosfat buffer saline (PBS) ile yıkandı. Oda sıcaklığında kuruyan kuyucuklara 200 µl % 0,1'lik kristal viyole eklenerek oluşan biyofilmler boyandı. 30 dakika beklendikten sonra, kuyucuklar tekrar PBS ile iki kez yıkanarak boşaltıldı. Oda sıcaklığında kuruyan kuyucuklara % 95'lik etanol eklenerek Triturus mikro ELISA (Grifols, İspanya) cihazında 550 nm'deki absorbans değerleri okundu. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz izolatlardan hazırlanan süspansiyonlar üç tekrarlı olarak çalışıldı ve elde edilen optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması alınarak mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktiviteleri belirlendi. Biyofilm oluşumları Chusri ve arkadaşları tarafından bildirilen ve **Tablo 1'de** gösterilen negatif kontrol absorbans değerine dayalı ölçeğe göre değerlendirildi (9).

Tablo 1. Mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktivitelerini değerlendirme ölçeği		
OD değeri	Adezyon	Biyofilm derecesi
OD kontrol > OD MB	Nonadhere (Yapışma olmayan)	0
OD kontrol < OD MB < 2 OD kontrol	Zayıf Adhere (Zayıf yapışma)	I
2 OD kontrol < OD MB < 4 OD kontrol	Orta Derecede Adhere (Orta derecede yapışma)	II
4 OD kontrol < OD MB	Güçlü Adhere (Güçlü yapışma)	III
OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi, Adhere: Biyofilm oluşturma düzeyi.		

Çalışmamız Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 20.01.2016 tarih ve 2016-01/13 nolu uygunluk kararı ile yapıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada değerlendirilen mikroorganizmalara karşı elde edilen OD değerleri ve biyofilm formasyon aktiviteleri tablo 2, 3, 4, 5'de gösterildi.

Tablo 2. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının OD değerleri ve biyofilm formasyon aktiviteleri			
Mikroorgani zmlar	OD Kontrol Ao. OD ± SD	OD MB Ao. OD ± SD	Biyofilm Derecesi
<i>P.A-01</i>	0,344 ± 0,282	1,395 ± 0,543	III
<i>P.A-02</i>	0,344 ± 0,282	1,125 ± 0,900	II
<i>P.A-03</i>	0,344 ± 0,282	1,848 ± 0,211	III
<i>P.A-04</i>	0,344 ± 0,282	1,899 ± 0,145	III
<i>P.A-05</i>	0,344 ± 0,282	1,496 ± 0,512	III
<i>P.A-06</i>	0,344 ± 0,282	2,055 ± 0,010	III
<i>P.A-07</i>	0,344 ± 0,282	1,903 ± 0,113	III
<i>P.A-08</i>	0,344 ± 0,282	2,004 ± 0,026	III
<i>P.A-09</i>	0,344 ± 0,282	1,468 ± 0,414	III
<i>P.A-10</i>	0,344 ± 0,282	0,508 ± 0,082	I
<i>P.A-11</i>	0,344 ± 0,282	1,385 ± 0,046	III
<i>P.A-12</i>	0,344 ± 0,282	1,740 ± 0,202	III
<i>P.A-13</i>	0,344 ± 0,282	2,094 ± 0,004	III
<i>P.A-14</i>	0,344 ± 0,282	2,055 ± 0,019	III
<i>P.A-15</i>	0,344 ± 0,282	2,030 ± 0,020	III
<i>P.A-16</i>	0,344 ± 0,282	1,829 ± 0,275	III
<i>P.A-17</i>	0,344 ± 0,282	2,089 ± 0,002	III
<i>P.A-18</i>	0,344 ± 0,282	0,334 ± 0,010	0
<i>P.A-19</i>	0,344 ± 0,282	0,326 ± 0,092	0
<i>P.A-20</i>	0,344 ± 0,282	1,378 ± 0,581	III
<i>P.A-21</i>	0,344 ± 0,282	1,035 ± 0,512	II
<i>P.A-22</i>	0,344 ± 0,282	1,421 ± 0,585	III
<i>P.A-23</i>	0,344 ± 0,282	0,948 ± 0,078	II
<i>P.A-24</i>	0,344 ± 0,282	2,048 ± 0,004	III
<i>P.A-25</i>	0,344 ± 0,282	0,236 ± 0,013	0
OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma, PA: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			

Tablo 3. *A. baumannii* suşlarının OD değerleri ve biyofilm formasyon aktiviteleri

Mikroorganizma	OD Kontrol	OD MB	Biyofilm Derecesi
	Ao. OD $\pm$ SD	Ao. OD $\pm$ SD	
<i>A.baumannii</i> -01	0,344 $\pm$ 0,282	1,199 $\pm$ 0,858	II
<i>A.baumannii</i> -02	0,344 $\pm$ 0,282	2,058 $\pm$ 0,006	III
<i>A.baumannii</i> -03	0,344 $\pm$ 0,282	1,843 $\pm$ 0,121	III
<i>A.baumannii</i> -04	0,344 $\pm$ 0,282	2,049 $\pm$ 0,023	III
<i>A.baumannii</i> -05	0,344 $\pm$ 0,282	1,989 $\pm$ 0,010	III
<i>A.baumannii</i> -06	0,344 $\pm$ 0,282	1,970 $\pm$ 0,005	III
<i>A.baumannii</i> -07	0,344 $\pm$ 0,282	2,063 $\pm$ 0,004	III
<i>A.baumannii</i> -08	0,344 $\pm$ 0,282	2,039 $\pm$ 0,024	III
<i>A.baumannii</i> -09	0,344 $\pm$ 0,282	2,003 $\pm$ 0,053	III
<i>A.baumannii</i> -10	0,344 $\pm$ 0,282	1,979 $\pm$ 0,014	III
<i>A.baumannii</i> -11	0,344 $\pm$ 0,282	2,063 $\pm$ 0,006	III
<i>A.baumannii</i> -12	0,344 $\pm$ 0,282	2,057 $\pm$ 0,003	III
<i>A.baumannii</i> -13	0,344 $\pm$ 0,282	1,963 $\pm$ 0,018	III
<i>A.baumannii</i> -14	0,344 $\pm$ 0,282	1,460 $\pm$ 0,552	III
<i>A.baumannii</i> -15	0,344 $\pm$ 0,282	1,876 $\pm$ 0,007	III
<i>A.baumannii</i> -16	0,344 $\pm$ 0,282	1,840 $\pm$ 0,112	III
<i>A.baumannii</i> -17	0,344 $\pm$ 0,282	1,100 $\pm$ 0,670	II
<i>A.baumannii</i> -18	0,344 $\pm$ 0,282	2,040 $\pm$ 0,008	III
<i>A.baumannii</i> -19	0,344 $\pm$ 0,282	1,915 $\pm$ 0,119	III
<i>A.baumannii</i> -20	0,344 $\pm$ 0,282	2,053 $\pm$ 0,029	III
<i>A.baumannii</i> -21	0,344 $\pm$ 0,282	2,000 $\pm$ 0,024	III
<i>A.baumannii</i> -22	0,344 $\pm$ 0,282	2,030 $\pm$ 0,014	III
<i>A.baumannii</i> -23	0,344 $\pm$ 0,282	2,023 $\pm$ 0,021	III
<i>A.baumannii</i> -24	0,344 $\pm$ 0,282	2,030 $\pm$ 0,001	III
<i>A.baumannii</i> -25	0,344 $\pm$ 0,282	0,968 $\pm$ 0,060	II
OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma			

Tablo 4. *S. aureus* suşlarının OD değerleri ve biyofilm formasyon aktiviteleri

Mikroorganizma	OD Kontrol	OD MB	Biyofilm Derecesi
	Ao. OD $\pm$ SD	Ao. OD $\pm$ SD	
<i>S. aureus</i> -01	0,344 $\pm$ 0,282	1,056 $\pm$ 0,056	II
<i>S. aureus</i> -02	0,344 $\pm$ 0,282	0,793 $\pm$ 0,206	II
<i>S. aureus</i> -03	0,344 $\pm$ 0,282	0,594 $\pm$ 0,118	I
<i>S. aureus</i> -04	0,344 $\pm$ 0,282	0,288 $\pm$ 0,044	0
<i>S. aureus</i> -05	0,344 $\pm$ 0,282	0,553 $\pm$ 0,063	I
<i>S. aureus</i> -06	0,344 $\pm$ 0,282	0,969 $\pm$ 0,087	II
<i>S. aureus</i> -07	0,344 $\pm$ 0,282	0,950 $\pm$ 0,180	II
<i>S. aureus</i> -08	0,344 $\pm$ 0,282	2,045 $\pm$ 0,007	III
<i>S. aureus</i> -09	0,344 $\pm$ 0,282	2,042 $\pm$ 0,004	III
<i>S. aureus</i> -10	0,344 $\pm$ 0,282	2,063 $\pm$ 0,000	III
<i>S. aureus</i> -11	0,344 $\pm$ 0,282	1,813 $\pm$ 0,225	III
<i>S. aureus</i> -12	0,344 $\pm$ 0,282	0,632 $\pm$ 0,162	I
<i>S. aureus</i> -13	0,344 $\pm$ 0,282	2,015 $\pm$ 0,015	III
<i>S. aureus</i> -14	0,344 $\pm$ 0,282	2,028 $\pm$ 0,001	III
<i>S. aureus</i> -15	0,344 $\pm$ 0,282	2,053 $\pm$ 0,021	III
<i>S. aureus</i> -16	0,344 $\pm$ 0,282	1,651 $\pm$ 0,297	III
<i>S. aureus</i> -17	0,344 $\pm$ 0,282	0,673 $\pm$ 0,032	I
<i>S. aureus</i> -18	0,344 $\pm$ 0,282	0,813 $\pm$ 0,181	II
<i>S. aureus</i> -19	0,344 $\pm$ 0,282	1,062 $\pm$ 0,121	II
<i>S. aureus</i> -20	0,344 $\pm$ 0,282	0,260 $\pm$ 0,003	0
<i>S. aureus</i> -21	0,344 $\pm$ 0,282	1,210 $\pm$ 0,273	II
<i>S. aureus</i> -22	0,344 $\pm$ 0,282	0,743 $\pm$ 0,106	II
<i>S. aureus</i> -23	0,344 $\pm$ 0,282	1,138 $\pm$ 0,381	II
<i>S. aureus</i> -24	0,344 $\pm$ 0,282	1,252 $\pm$ 0,433	II
<i>S. aureus</i> -25	0,344 $\pm$ 0,282	0,561 $\pm$ 0,07	I
OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma			

Tablo 5. *C. albicans* suşlarının OD değerleri ve biyofilm formasyon aktiviteleri

Mikroorganizma	OD Kontrol	OD MB	Biyofilm Derecesi
	Ao. OD $\pm$ SD	Ao. OD $\pm$ SD	
<i>C. albicans</i> -01	0,336 $\pm$ 0,162	0,167 $\pm$ 0,039	0
<i>C. albicans</i> -02	0,336 $\pm$ 0,162	0,830 $\pm$ 0,029	II
<i>C. albicans</i> -03	0,336 $\pm$ 0,162	0,712 $\pm$ 0,071	II
<i>C. albicans</i> -04	0,336 $\pm$ 0,162	0,277 $\pm$ 0,021	0
<i>C. albicans</i> -05	0,336 $\pm$ 0,162	0,333 $\pm$ 0,014	0
<i>C. albicans</i> -06	0,336 $\pm$ 0,162	0,245 $\pm$ 0,003	0
<i>C. albicans</i> -07	0,336 $\pm$ 0,162	0,421 $\pm$ 0,024	I
<i>C. albicans</i> -08	0,336 $\pm$ 0,162	0,239 $\pm$ 0,072	0
<i>C. albicans</i> -09	0,336 $\pm$ 0,162	0,520 $\pm$ 0,061	I
<i>C. albicans</i> -10	0,336 $\pm$ 0,162	0,541 $\pm$ 0,070	I
<i>C. albicans</i> -11	0,336 $\pm$ 0,162	0,584 $\pm$ 0,051	I
<i>C. albicans</i> -12	0,336 $\pm$ 0,162	1,091 $\pm$ 0,483	II
<i>C. albicans</i> -13	0,336 $\pm$ 0,162	2,572 $\pm$ 0,052	III
<i>C. albicans</i> -14	0,336 $\pm$ 0,162	1,244 $\pm$ 0,445	II
<i>C. albicans</i> -15	0,336 $\pm$ 0,162	1,029 $\pm$ 0,420	II
<i>C. albicans</i> -16	0,336 $\pm$ 0,162	0,914 $\pm$ 0,314	II
<i>C. albicans</i> -17	0,336 $\pm$ 0,162	0,737 $\pm$ 0,215	II
<i>C. albicans</i> -18	0,336 $\pm$ 0,162	0,592 $\pm$ 0,161	I
<i>C. albicans</i> -19	0,336 $\pm$ 0,162	0,383 $\pm$ 0,014	I
<i>C. albicans</i> -20	0,336 $\pm$ 0,162	0,787 $\pm$ 0,393	II
<i>C. albicans</i> -21	0,336 $\pm$ 0,162	0,598 $\pm$ 0,118	I
<i>C. albicans</i> -22	0,336 $\pm$ 0,162	0,595 $\pm$ 0,038	I
<i>C. albicans</i> -23	0,336 $\pm$ 0,162	1,325 $\pm$ 0,703	II
<i>C. albicans</i> -24	0,336 $\pm$ 0,162	0,954 $\pm$ 0,098	II
<i>C. albicans</i> -25	0,336 $\pm$ 0,162	0,318 $\pm$ 0,088	0

OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma

Çalışmamızda hastanede yatan hastalardan sıklıkla izole edilen *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *S. aureus*'un biyofilm oluşturabilme özellikleri araştırılmış ve yüksek düzeyde biyofilm oluşturabildikleri tespit edildi. Bu mikroorganizmalara ait biyofilm formasyon oranları Tablo 6'da verildi.

Tablo 6. Hastanelerde sıklıkla izole edilen bazı mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme oranları

Mikroorganizmalar	Biyofilm				
	Oluşturan				Oluşturma- yan
	Güçlü Biyofilms	Orta Biyofilms	Zayıf Biyofilms	Toplam s (%)	s (%)
<i>C. albicans</i> (25)	1	10	8	19 (76)	6 (24)
<i>P. aeruginosa</i> (25)	18	3	1	22 (88)	3 (12)
<i>A. baumannii</i> (25)	22	3	0	25 (100)	0 (0)
<i>S. aureus</i> (25)	8	10	5	23 (92)	2 (8)
Toplam (100)	49	26	14	89	11

s: Sayı

TARTIŞMA

Biyofilmin tıbbi açıdan önemi bakteri adezyonu, antibiyotik direnci ve inflamasyona etkisidir (10). *A. baumannii*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* giderek artan oranlarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak bildirilmektedir (11). Bu yüzden hastane enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktivitelerinin de bilinmesi önem arz etmektedir.

Hastanelerde nemli ortamlardan ve hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonlarında önemli bir fırsatçı patojendir. Son zamanlarda bu bakterinin virulans faktörlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Virulans özelliklerinden olan biyofilm, kronik enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır (12). Çalışmamızda *P. aeruginosa* izolatlarının önemli oranda biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir. Sanchez ve ark. (13) mikrotitre plak yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, hastalardan izole ettikleri *P. aeruginosa* izolatlarının % 83'ünün biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Sanchez ve ark.'nın çalışmalarında elde ettikleri sonuç bizim çalışma sonuçlarımız ile benzer görülmektedir. Sebit ve ark. (14) çoklu ilaç direncine sahip *P. aeruginosa* izolatları ile yaptıkları çalışmada izolatların % 40'ında biyofilm oluşumu gözlediklerini bildirmişlerdir. Tepeli (15) 2009 yılında yaptığı çalışmada 100 *P. aeruginosa* suşunun mikrotitre plak yöntemi ile biyofilm düzeylerini incelemiş ve % 16 güçlü biyofilm, % 46

orta düzeyde biyofilm ve % 38 zayıf biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Tepeli'nin yaptığı çalışmada tespit edilen veriler bizim çalışma sonuçlarımız ile benzer görünmektedir.

A. baumannii tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de, özellikle YBÜ'de gelişen hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biridir. Günümüzde, kullandığımız tüm antimikrobiyal dirençli suşların varlığı bilinmektedir. Bu direncin oluşmasında serum direnci, hareket, demir kazanımı gibi çeşitli etkenlerin yanında biyofilm oluşturmalarının da rol oynadığı bildirilmektedir (16). Çalışmamızda A. baumannii izolatlarının tamamı biyofilm oluşturmıştır. Sanchez ve ark. (13) yaptıkları çalışmada hastaların klinik örneklerinden izole ettikleri 53 A. baumannii izolatından 29'unun (% 55) biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sebit ve ark. (15) ise yaptıkları çalışmada A. baumannii izolatları için % 74 biyofilm formasyon oranı bildirmişlerdir. Can ve ark. (17) A. baumannii izolatlarında toplam % 52,9 biyofilm oluşumu gözlemlemişlerdir.

S.aureus sağlıklı yetişkin bireylerin % 30 - 50'sinde kolonizedir ve % 10 - 20 dirençli kolonizasyon göstermektedir. Kolonize kişiler sonradan oluşacak enfeksiyonlar için yüksek risk taşımaktadır. Hastane enfeksiyonlarının çoğu ise hastane personeli aracılığı ile yayılmaktadır. Hastane enfeksiyonlarına neden olan hastane personelleri kendileri taşıyıcı olabileceği gibi, enfekte hastalarla temas sonucu edindikleri mikroorganizmalarla da enfeksiyonlara neden olabilirler. (18). Stafilokokların, sahip oldukları ekzotoksinler, yüzey proteinleri ve enzim gibi virulans faktörlerinin yanı sıra biyofilm üretiminin de, artan oranda önemli bir virulans faktörü olduğu bilinmektedir (19). Çalışmamızda S. aureus izolatlarının % 92 oranında biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. S. aureus izolatlarının % 32'si güçlü biyofilm, % 40'ı orta derecede biyofilm ve % 20'si zayıf biyofilm oluşturmıştır. Sanchez ve ark. (13) mikrotitre plak yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada 23 insan kaynaklı klinik S. aureus izolatının % 91'inin biyofilm formasyon aktivitesini pozitif olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışmamızda elde edilen S. aureus biyofilm sonuçları ile oldukça yakın görünmektedir. Demir ve İnanc (16) yaptıkları çalışmada 127 S.

aureus izolatının % 69,3'ünün biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Biyofilm oluşturan bu izolatların % 37,8'i orta derecede biyofilm, % 31,5'inin ise güçlü biyofilm oluşturduğunu gözlemişlerdir. Şahin (18) hastalardan izole edilmiş olan S. aureus izolatları ile yaptığı çalışmada % 80,6 biyofilm formasyonu saptamıştır.

Çalışmamızdaki C. albicans izolatları yüksek oranda biyofilm oluşturmışlardır. Yapılan çalışmalarda, Candida türlerinde saptanan biyofilm oranları % 8 - 85 arasında değişmektedir. Bu oranlar suşların izolasyon bölgelerine, enfeksiyon etkeni olup olmasına ve izole edilen Candida türüne göre farklılık göstermektedir (20). Yazar'ın (21) yaptığı çalışmada, C. albicans suşlarının biyofilm aktiviteleri mikrotitre plak yöntemiyle incelenmiş, izolatların % 87,9'unun biyofilm aktivitesi pozitif, % 12,1'inin ise negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan izolatların % 66,4'ünün zayıf biyofilm, % 12,1'inin orta derecede biyofilm, % 9,3'ünün ise güçlü biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışma sonuçlarımıza benzer görünmektedir. Mahmoudabadi ve ark. (22) yaptıkları çalışmada 120 C. albicans suşunun tamamının biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Demirbilek ve ark. (20) yaptıkları çalışmada 79 C. albicans suşunun % 23'ünün biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi farklı çalışmalarda benzer sonuçlar kadar farklı bazı sonuçlar da bildirilmektedir. Bu durum çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklılığından, çalışma yapılan merkezlerin ve kullanılan izolatların farklı özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak yapılan tüm çalışmaların ortak noktası hepsinde de biyofilm oranlarının yüksek olmasıdır.

Çalışmaya alınan P. aeruginosa, A.baumannii, S. aureus ve C. albicans izolatlarının yüksek oranlarda biyofilm oluşturmaları, servislerde ve özellikle YBÜ gibi birimlerde bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların ciddiyetinin ve öneminin büyüklüğünü göstermektedir. Mikroorganizmalarda direnç gelişimi ile ilgili çalışmalarda bu durumun da göz önünde bulundurulması önemli olabilir. Çalışmamızda elde edilen verilerin bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalar için literatüre veri sunacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Orucu M, Geyik MF. Yoğun Bakım Ünitesinde Sık Görülen Enfeksiyonlar. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 10: 40-3.
2. Yüksekdağ ZN, Baltacı N. Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2013; 43: 77-83.
3. Lindsay D, Von Holy A. Bacterial Biofilms Within the Clinical Setting: What Healthcare Professionals Should Know? J Hosp Infect 2006; 64: 313-25.
4. Balcázar JL, Subirats J, Borrego C. The Role of Biofilms As Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. Front Microbiol 2015; 6: 1216.
5. Gülgör G, Korukluoğlu M. Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2014; 28: 83-92.
6. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. Int J Med Microbiol 2017; 8: 481-9.
7. Myszk K, Czaczyk K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 2011; 61: 173-80.
8. 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: 996-1006 .
9. Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai SP. Anti-biofilm Activity of Quercus Infectoria G. Olivier Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology 2012; 54: 511-7.
10. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve Yabancı Cisim Enfeksiyonları. Klimik Dergisi 2008; 21: 79-86.
11. Can F, Azap ÖK, Demirebilek M, Karabay G, Ergin F ve Arslan H. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Acinetobacter baumannii Suşlarında Biyofilm Oluşumu. Enfeksiyon Dergisi 2006; 20: 159-63.
12. Altun HU, Şener B. Biyofilm Enfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39: 82-8.
13. Sanchez C, Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm Formation by Clinical Isolates and The Implications in Chronic Infections. BMC Infect Dis 2013; 13: 47.
14. Sebit B, Aksu B, Yağcı AK. Biofilm Production and Biocidal Efficacy in Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii Isolates. International Journal of Antisepsis Disinfection Sterilization. 2016; 1: 7-12.
15. Tepeli EÇ. Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Biyofilm Yapımının ve Quorum Sensing'de Rol Alan Genlerin Araştırılması [Uzmanlık Tezi]. [Denizli]: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2009. 85 s.
16. Demir C, İnanç BB. Nazal Kolonize Stafilocok Türlerinde Biyofilm Üretiminin Araştırılması. Journal of Clinical and Analytical Medicine 2013; 6: 414-8.
17. Ferrara AM. Potentially Multidrug-resistant Non-fermentative Gram-negative Pathogens Causing Nosocomial Pneumonia. International Journal of Antimicrobial Agents 2006; 27: 183-95.
18. Şahin R. Staphylococcus aureus Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif Ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. [Denizli]: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2007. 94 s.
19. Özdemir T. Yara Yerinden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarının Biyofilm Oluşumunun Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. [Ankara]: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2014. 105 s.
20. Demirebilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap Ö, Arslan H. Hastane Kaynaklı Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılık Paternleri. Mikrobiyol Bul 2007; 41: 261-9.
21. Yazar M. Klinik Materyallerden İzole Edilen Candida Albicans Suşlarında Sap Genlerinin Araştırılması [Uzmanlık tezi]. [Denizli]: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2014. 80 s.
22. Mahmoudabadi AZ, Zarrin M, Kiasat N. Biofilm Formation and Susceptibility to Amphotericin B and Fluconazole in Candida albicans. Jundishapur Journal of Microbiology. 2014; 7: e17105.