

Biyofilm ve Diyabetik Ayak İnfeksiyonları

Biofilm and Diabetic Foot Infections

Aslı Vatan, Neşe Saltoğlu

Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Özet

Biyofilm doğada varlığı yüzyıllardır bilinen ve tıptaki önemi de gün geçtikçe daha iyi anlaşılan bir yapıdır. Yabancı cisim infeksiyonlarında sıklıkla karşımıza çıkan biyofilm, kronik yara infeksiyonlarında da önemli bir yere sahiptir. Diyabetik ayak yaraları içerdikleri hasarlı dokular ve bozulmuş konak immün yanıtıyla biyofilm oluşumu için elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Diyabetin en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olan diyabetik ayak infeksiyonları, içerdikleri biyofilm nedeniyle eradikasyonu oldukça güç, zahmetli ve uzun süreli infeksiyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Derlememizde biyofilmin yapısı ve diyabetik ayak yaralarında biyofilmin yeri, tespiti ve tedavisinin önemi tartışılmıştır.

Klimik Dergisi 2017; 30(3): 101-7.

Anahtar Sözcükler: Biyofilmler, diyabetik ayak, mikrobiyal ilaç direnci.

Abstract

Biofilm is a well known issue with increasing importance, especially in the field of medicine. The biofilm formation is usually observed in foreign body infections as well as chronic wound infections. The diabetic foot ulcer is suitable for biofilm formation due to its rich wound exudate and debris content and impaired host immune response. The diabetic foot infection has emerged as one of the most important causes of mortality and morbidity in diabetes mellitus which needs special efforts to eradicate infection due to high rate of biofilm formation. In this review, we discuss the characteristic features of biofilms and the importance of the biofilm formation in diabetic foot infections. We also highlight the diagnosis and management of the biofilm formation.

Klimik Dergisi 2017; 30(3): 101-7.

Key Words: Biofilms, diabetic foot, microbial drug resistance.

Giriş

Diyabet hastalarında yaşam boyunca %15-25 oranında diyabetik ayak ülseri gelişmektedir (1). Diyabetik ayak infeksiyonu, diyabetin en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir; uzuv ampütasyonlarının da en sık nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Diyabetik hastaların dörtte birinde hayatlarının bir döneminde diyabetik ayak infeksiyonu gelişmekte ve bu komplikasyon uzun süreli hastane yatışlarına, önemli iş gücü kayıplarına, sosyal sorunlara neden olmakta ve yüksek maliyetlerle sonuçlanmaktadır (2,3).

Ülkemizde diyabetik ayak infeksiyonu tanılı hasta sayısı yaklaşık 500 000 olup bu infeksiyonların tedavisi oldukça güçtür. Diyabetik ayak infeksiyonunun tedavisi birçok açıdan değerlendirme gerektiren kompleks bir sorundur. Bu hasta grubunda uygun antibiyotik tedavisi yanında nekrotik ve ölü dokuların debridmanı yapılarak

hastanın ayağının ve yaşamının kurtarılması hedeflenmelidir (4).

Açık yaralarda derinin koruyucu etkisinin ve endojen mikrofloranın kaybı konak immün yanıtından korunarak biyofilmin erken formasyonunun oluşumuna olanak sağlar. Süreç kronikleştiğinde ise matür biyofilm oluşarak eradikasyonu daha da güçleşir. Kronik yara, bileşeni olan kolajen, fibronektin gibi proteinlerle ve hasarlı doku gibi bağlanmayı sağlayan özellikleriyle biyofilm oluşumu için ideal koşullar sağlar. Kronik yaralarda matür biyofilm içindeki bakteri toplulukları direkt olarak litik enzim ve toksinlerin salınımıyla, indirekt olarak da kronik inflamasyonu uyarak yara iyileşmesini geciktirir. Kronik yaralarda peptidoglikan, lipopolisakarid ve DNA gibi virülans faktörlerine yanıt olarak IFN- α , IFN- γ , TNF- α ve interlökin-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artar (5). Sonuçta serbest radikal-

Cite this article as: Vatan A, Saltoğlu N. [Biofilm and diabetic foot infections]. *Klimik Derg.* 2017; 30(3): 101-7. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Aslı Vatan, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-posta/E-mail: asli_oner@hotmail.com

(Geliş / Received: 5 Ocak / January 2017; Kabul / Accepted: 2 Nisan / April 2017)

DOI: 10.5152/kd.2017.27



lerin oluşması ve salınan proteazlar, kolajenaz ve jelatinazlarla yara iyileşmesinde gerekli olan "transforming growth factor" (TGF- β), "platelet-derived growth factor" (PDGF), "fibroblast growth factor" (FGF) ve "epidermal growth factor" (EGF) gibi büyüme faktörleri ve doku proteinlerinin parçalanması, biyofilm oluşumuna uygun bir ortam oluşturur. Biyofilm içinde mikrobiyal yükün artışıyla biriken eksüda, matriks metalloproteinazlarının yıkımına sebep olarak kronik yarada iyileşmeyi bozar (6). Diyabetik ayak gibi kronik yaralarda biyofilm oluşumuna zemin hazırlayan bu mekanizmalara farklı faktörler de eklenmektedir. Diyabetik hastalarda kronik yara enfeksiyonları bozulmuş ve yetersiz immün yanıtla birlikte uzamış inflamasyon, yetersiz reepitelizasyon ve anjiyogenez, fibroblast fonksiyon bozukluğu ve düzensiz matriks oluşumu nedeniyle iyileşmesi zorlaşan yaralar olarak karşımıza çıkar. Yara yüzeyindeki hasarlı doku biyofilm oluşumunun ilk basamağı adezyonu kolaylaştırır. Diyabetik yaralarda eşlik eden mikro- ve makrovasküler iskemiye bağlı yetersiz beslenme, oksijen perfüzyonunda azalma ve antibiyotiklerin ülser içine yeterince nüfuz edememesi biyofilm oluşumuna elverişli bir ortam oluşturmaktadır (7). Diyabetik yaralarda hipoksi ve hiperglisemi reaktif oksijen radikalleri antioksidan düzeyi aştığında serbest radikal salınımla oksidatif strese neden olarak sürecin uzamasına ve biyofilm oluşumuna katkı sağlar (8,9). Kontrolsüz diyabette hiperglisemi, hücrel ve humoral immün yanıtı bozarak yarada hücrel disfonksiyona neden olur (10,11). Bakteriler tarafından "quorum sensing" (QS) sinyal molekülleri aracılığıyla üretilen virülans faktörleri polimorfonükleer lökositlerin fagositik aktivitesine karşı koruyucu rol oynar. Biyofilm yapısında fiziksel bir bariyer görevi olan ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) fagositik hücrelerin biyofilme penetrasyonunu azaltır. Nötrofiller biyofilm içindeki bakteriyi öldüremez; ancak salgıladıkları proinflamatuvar sitokinler kronik inflamasyona neden olur. Ayrıca glukozun bakteriler tarafından kullanılması EPS ekspresyonunu artırarak biyofilm oluşumunu artırır (12). Farklı bakterilerin kökenleriyle yapılmış bir çalışmada yüksek glukoz konsantrasyonunun (1000 mg/dl) biyofilm oluşumunu artırdığı; yine bir çalışmada metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında 250 ve 500 mg/dl glukoz düzeylerinin biyofilm oluşumunu artırdığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (13).

Biyofilm Yapısı ve Oluşumu

Biyofilm varlığı ilk olarak 17. yüzyılda Loewenhoek'un kendi dışından aldığı plaklar içinde yaşayan mikroorganizmaları tanımlamasıyla ortaya konmuştur. Biyofilm, mikroorganizmaların bir yüzeye ve birbirlerine yapışmak için oluşturduğu ve gen transkripsiyonları sonucu farklı yapısal özellikler gösterebilen mikroorganizmanın içinde yerleştiği ekstraselüler matriks yapısıdır (14). Biyofilmin tıpta yabancı cisim enfeksiyonları öncelikli olmak üzere, pek çok kronik seyirli enfeksiyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok çalışmada nozokomiyal

enfeksiyonlarda mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm oranı yaklaşık %65 olup buna bağlı zorlaşan tedavi oranları ciddi maliyet artışına sebep olmaktadır (15). Mikroskopik incelemede biyofilm, organik ve inorganik moleküllerden oluşmuş matriks yapı içinde koni ve mantar şekilli, birbirine ve çevreye yapışmış yapılar ve arasında basit su kanallarından oluşan bir sistemdir (16). Bir biyofilmin yapısında %90'dan fazla su olmak üzere kalan kısmını mikroorganizmalar ve az miktarda DNA, polisakarid ve protein yapılarıyla birlikte iyonlar oluşturur. Biyofilm yapısı içinde birçok mikroorganizma türü bulunabileceği gibi biyofilmi yalnız bir tek mikroorganizma türü de oluşturabilir. Aralarındaki su kanallarıyla birbirinden ayrılan farklı türden mikroorganizmalara ait mikrokoloniler de bir biyofilmin yapısını oluşturabilir. Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu besin ve oksijen bu su kanallarıyla sağlanmaktadır. Biyofilm oluşma süresi değişken olmakla birlikte mikroorganizmanın türü, ayrıca çevresel faktörler de bu süreyi etkilemektedir. Örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa* 30 saniye içinde elektriksel yüklü yüzeye yapışırken, başka bir türde bu süre birkaç haftayı bulabilmektedir (17). Biyofilm oluşumu çevresel, kimyasal ve fiziksel faktörlerle oldukça ilişkilidir. Sıcaklık, oksidatif stres ve sitokinler konak immün yanıtı üzerinden biyofilm oluşumuna etki eder (18). pH, oksijen, glukoz gibi çevresel etmenlerle biyofilm oluşumu arasında önemli bir ilişki vardır. Planktonik formda dar pH aralığında yaşayabilen bakteriler biyofilm içinde daha geniş aralıklarda yaşayabilmektedir (19). pH'ye bağlı değişiklikler, gen transkripsiyonu, antimikrobiyal duyarlılık ve enzimatik aktivite değişikliklerine bağlıdır (20). Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Vibrio cholerae* izolatlarında artan pH ile biyofilm oluşumunun arttığı gösterilmiştir (21). Yine farklı bir *in vitro* çalışmada asidik pH'de biyofilm oluşumunun arttığı gösterilmiş, *in vivo* gerçek ortam koşullarında daha doğru sonuçlar elde edileceği belirtilmiştir (22). Çevresel faktörlerden değişen ozmolarite ve nütrisyonel durum da biyofilm oluşumu üzerine etkilidir. Hidrodinamik ve biyokimyasal etkileşimler sonucu da biyofilm yapısı şekillenmektedir (23).

Bakteriler hücreler arasında iletişim sağlayan QS sistemiyle biyofilm oluşumunu kontrol etmektedir. Bir bakteri bu sinyallerle çevreden aldığı uyarılara cevap geliştirir ve metabolizmasını çevresel faktörlere göre düzenleyerek ortama uyum sağlamaya çalışır (24). Bakteriler bu sistemle çevrelerinde bulunan bakterilerin yoğunluğunu algılar (24,25). Bu sinyal sistemiyle bir odakta topluluk oluşturan mikroorganizmalar biyofilm oluşumunun başlangıcını oluşturur. Mikroorganizmalar doğada serbest (planktonik) veya durağan fazda bulunabilir. Besin miktarının az olduğunu algılayan bakteriler kendilerini biyofilm yapısı içinde metabolizmalarını yavaşlatarak durağan fazda koruma altına alırlar (26). QS sistemi bakteriye yaşamını sürdürebilmesi için birçok avantaj sağlar. Bakteriler bu sistemle davranışlarını düzenleyerek ortamda bulunan besin kaynakları için farklı bakterilerle yarışabilir. Biyofilm yapısı aslında bir virülans faktörü olup bunu koordine

eden QS sistemi konağın immün cevabından kaçışı düzenler. Bu sistem içinde iletişimi sağlayan başlıca rolü "autoinducer (AI)" olarak da bilinen sinyal molekülleri oluşturur. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde bu düzenlemeyi yapan birbirinden farklı sinyal molekülleri bulunmaktadır. "N-acyl homoserine lactones (AHLs)" Gram-negatif bakterilerde, oligopeptid veya "autoinducing peptid (AIP)" Gram-pozitif bakterilerde, "autoinducer-2 (AI-2)" ise her iki grupta bu görevi yapan sinyal molekülleri (27).

Bakterilerin biyofilm geliştirmesinin pek çok sebebi vardır. Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan adezyonda en önemli faktörler, bakteri yüzey proteinleriyle ortamda bulunan elastin, fibrinojen ve fibronektin gibi matriks proteinleridir. Bakteriler çoğaldıkça gelişen biyofilm yapısı da bakterilerin adezyonunu kolaylaştırır (28). Bakteriler, biyofilm içinde topluluk oluşturarak ortamdaki besin maddelerinin yeterliliği, uygun pH gibi özelliklere göre uygun gen ekspresyonları sonucu serbest ya da uykudaki ("dormant") formları geliştirme kararı verirler (16). Çevreden aldıkları tehlikeli uyarılara karşı biyofilm içinde kendilerini koruma altına alırlar. Çevresel stres faktörlerine karşı savunma için biyofilm yapısını oluştururlar (29).

Biyofilm oluşum basamakları şunlardır: [1] Yüzeğe geri dönüşümlü bağlanma; [2] yüzeğe geri dönüşümsüz bağlanma; [3] mikrokoloni oluşumu; [4] olgun biyofilm oluşumu; [5] planktonik hücrelerin biyofilmden kopması.

Yüzeğe geri dönüşümlü bağlanma: Başlangıçta bakteri ve yüzey arasında yeterli yakınlık oluştuğunda sıkı olmayan bir bağlanma gerçekleşir. Bu aşamada iki yüzey arasında elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri, ısı ve hidrodinamik güçler gibi etkilere bağlı olarak gelişen itme ve çekme sonucu bağlanma gerçekleşir (30,31). Burada en etkin güç hidrofobik etkileşimlerdir. Henüz geri dönüşümlü olan bu evrede bağlantı sadece yıkama gibi işlemlerle kolaylıkla bozulabilir. Mikroorganizmalar bu aşamada çevrede yaşamlarını idame ettirmek için yeterli besin kaynağı varlığını da araştırmaktadır (32).

Yüzeğe geri dönüşümsüz bağlanma: Bakteriler çevre koşulları uygun olduğunda yüzeğe daha güçlü bağlanmaktadır. Kovalan bağlar, dipol-dipol ve iyon-dipol etkileşimleri, iyonik bağlar ve hidrojen bağlarıyla geri dönüşümsüz bağlanma gerçekleşir. Kamçı, pilus ve kirpik gibi yapıları aracılığıyla ökaryot hücrelerdeki ligandlara geri dönüşümsüz ve spesifik olarak bağlanır (33). Diğer bakterilerin de yüzeğe tutunmasıyla ince bir tabaka oluşur. Tip 4 pilus defekti olan *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu mikrokoloni aşamasından ileri geçmemektedir (34).

Mikrokoloni oluşumu: Bu aşamada yüzeğe birinci koloni oluştuktan sonra, diğer bakteriler de bu yüzeğe koloniler oluşturmaya başlar. Mikroorganizma bir taraftan yüzeğe yapışırken diğer taraftan da EPS üretimine başlar (32). Biyofilm temel olarak mikroorganizmalar ve EPS'den oluşur. EPS'nin biyofilm içerisindeki karbon kaynağının %50-90'ını oluşturarak biyofilm yapısının temel iskeletini oluşturmasının yanında diğer bir önemi yapısında birçok moleküllü barındırabilmesi (metal iyonlar, katyonik bileşikler, DNA, protein, lipid, fibrin, eritrosit) ve buna bağlı olarak mikroorganizmalar için yaşamaya uygun çevre oluşturmasıdır (35).

Olgun biyofilm oluşumu: Bu evrede mikrokoloniler büyüyerek olgun ve kompleks yapıda büyük mantar benzeri şekilleri oluştururlar (36).

Planktonik hücrelerin biyofilmden kopması: Biyofilm yapısında yüzeğe doğru gittikçe besin ve oksijen oranında azalmayla birlikte durağan fazdaki bakterilerin oranı artmaktadır. Elverişli koşullarda biyofilm yapısı içinde bakteriler arası sinyal molekülleriyle haberleşme sağlanarak bakteriler bu yapıdan ayrılarak serbestleşir ve başka bir bölgeye yerleşerek yeni bir biyofilm oluşturmak için mikrokoloni oluşturabilir (37,38).

Biyofilm Enfeksiyonları ve Direnç Sorunu

Biyofilm enfeksiyonları, kistik fibroz, akciğer enfeksiyonları, periodontit, doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kronik yara enfeksiyonları yanında protez kapak, santral venöz kateter, üriner sonda, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonlarında da karşımıza çıkmaktadır. Hastaneden kazanılmış enfeksiyonların %60'ından fazlası biyofilm oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (39). Tıbbi gelişmelerle orantılı olarak artan yabancı cisim uygulamaları da biyofilmin önemini artırmaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerde serbest formlara oranla antibiyotiklere 100-1000 kat oranında direnç gelişebilmektedir. Dirençten sorumlu mekanizmalar sıklıkla enzimatik inaktivasyon, atım pompaları, ilaç hedefinde mutasyondur. Serbest formu antimikrobiyallere duyarlı olup biyofilm oluşturarak direnç geliştiren bir bakteri, tekrar serbest hale geçtiğinde antibiyotiklere duyarlı hale gelebilir (38,40).

Biyofilm antimikrobiyaller dışında dezenfektanlara karşı dirençte de önemlidir. Biyofilm oluşturan bakteriler planktonik formlara göre dezenfektan ajanlara karşı 10-100 kat daha direnç kazanabilir ve antiseptik solüsyonlarda uzun süre canlılıklarını koruyabilirler (41).

Biyofilmden antibiyotik direnciyle ilişkili olduğu düşünülen faktörler, antimikrobiyal ajanların biyofilm içine penetrasyonunun azalması, biyofilm gelişimine bağlı fizyolojik değişiklikler ve bakterilerin üreme hızında değişiklikler olarak sıralanabilir (42).

Antimikrobiyal Ajanların Biyofilm İçine Penetrasyonunun Azalması

Biyofilm yapısının büyük kısmını oluşturan EPS, antibiyotik ve dezenfektanların hücre içine girişini engelleyen bir fiziksel bariyer özelliği sağlar. Dezenfektan olarak yaygın kullanılan klorun *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın oluşturdukları biyofilme penetrasyonunun %20'nin üzerine çıkmadığı mikroeletrod yöntemiyle gösterilmiştir (43). *Staphylococcus epidermidis* "slime" tabakasının, *Bacillus subtilis*'in pek çok antimikrobiyal ajana karşı duyarlılığına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bariyer etkiden bütün antibiyotiklerin eşit oranda etkilenmeyip vankomisin ve teikoplaninin daha fazla etkilendiği; rifampisin, klindamisin ve makrolidlerin ise minimal olarak etkilendiği gösterilmiştir (44). β -laktam antibiyotiklerin biyofilm yapısı içine girişine engel olan mekanizmalardan birisi, biyofilm içinde çevresel faktörler sonucu oluşan ozmotik strese bağlı olarak bakterilerin porin sayısında azalmalar ve yapısal bozulmalar oluşmasıdır. Antibiyotiklerin azal-

miş penetrasyonuna enzimatik inaktivasyon da eklendiğinde direnç daha da artmaktadır (45).

Biyofilm Gelişimine Bağlı Fizyolojik Değişiklikler

Çevresel strese yanıt olarak gelişen biyofilm, sıcaklık, pH ve pek çok kimyasal değişikliğe karşı koruyucu rol oynar. Bu cevabın merkezi düzenleyicisi, durağan fazda özel bir sigma faktörü olan RpoS'a bağımlı genin ekspresyonudur (46). Biyofilm içerisindeki besin kaynakları ve oksijen miktarına göre biyofilm içindeki bakterilerin yoğunluğu değişmektedir. İç kısımdaki bakteriler daha çok durağan fazda, dış kısımdaki bakteriler oksijen ve besinlere daha kolay erişebildikleri için serbest formda bulunmaktadır. Biyofilm yapısındaki bu farklı dağılım daha çok aktif metabolizması olan bakterilere etkili olan antimikrobiyalere karşı duyarlılığın farklılık göstermesine sebep olur. Biyofilmin derin kısımlarda anaerob ortam varlığı nedeniyle, özellikle aminoglikozidlerin etkinliği azalmakta ve direnç gelişebilmektedir (40). Bahsettiğimiz tüm çevresel değişiklikler özellikle makrolidler, aminoglikozidler ve tetrasiklin gibi antibakteriyellere karşı dirençte önemli rol oynamaktadır (47).

Bakterilerin Üreme Hızında Değişiklikler

Antimikrobiyalere direncin diğer bir sebebi de biyofilm yapısı içinde bakterilerin çoğalma hızlarının yavaşlaması ve hızlı çoğalan bakterilere daha etkili olan antimikrobiyallerin etkisinin bu nedenle azalmasıdır (48). *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturan ve planktonik formlarında büyüme oranlarıyla tobramisin ve siprofloksasinin duyarlılıklarının değerlendirildiği çalışmalarda biyofilm oluşumuyla yavaşlayan üreme hızlarının antimikrobiyal etkinliği azalttığı gösterilmiştir (49-51).

Diyabetik Ayak Yaralarında Biyofilm Etkileri

Diyabetik ayak yaralarında mikroorganizmalar %60-80 oranında biyofilm üretmektedir (52). Biyofilm varlığı kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir. Olgunlaşmış biyofilm içindeki bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyon değerleri *in vitro* sonuçlarından 100-1000 kat daha yüksektir. Diyabetik ayak ülserleri sıklıkla polimikrobiyal etkenlerle kolonize olur. Polimikrobiyal biyofilimde virülans faktörleri QS molekülleri aracılığıyla birbirleriyle sinerjistik etki gösterir. *P. aeruginosa* ve *S. aureus*, kronik yaralardaki biyofilmden en sık sorumlu bulunan patojenlerdir (53). Enfekte yaralarda biyofilmi göstermek için en güvenilir yöntem, doku biyopsisidir. Biyofilm yapan bakterilerin yara epiteline sıkıca yapışması ve anaeroplara derine yerleşmesi nedeniyle sürüntü çubuğuyla yüzeysel örnek alınması yetersiz bir yöntemdir. Biyofilm formasyonu, canlı ve küçük dokularda 4-200 µm, yabancı yüzeylerde 5-1200 µm boyutlarındadır. Bu nedenle klinik örneklerde biyofilm aramak zor ve zaman alıcı bir işlemdir. Biyofilm enfeksiyonunun olduğu odağı kapsamayan örnekler yalancı negatif sonuçlara sebep olur. Alınan doku örneğinin ezilmesi ve doku homojenizasyonu sağlanması biyofilm saptanma olasılığını artırır. Klinik örneklerde ışık mikroskopisiyle incelemede Gram boyamasında inflamatuvar hücrelerin varlığı ve kendi ürettikleri matrisle çevrelenmiş mikrobiyal agregatlar görülmesi biyofilm varlığını düşündürür. Ancak mik-

roorganizma sayısı düşük olduğunda direkt mikroskopik incelemeyle göstermek zorlaşmaktadır. Konfokal lazer tarama mikroskopu, elektron mikroskopisi ve "peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH)" doku örneklerinde biyofilmi göstermek için en uygun yöntemlerdir, ancak laboratuvarlarda rutin kullanıma uygun değildir (39). Bakterilerde biyofilm oluşumu tespitinde *in vivo* ve *in vitro* (mikroplak yöntemleri, Calgary Biofilm Device, Modified Robbins Device, Plug Flow Reactor Systems, CDC Biofilm Reactor gibi) birçok yöntem mevcuttur. Yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Çalışmalardan elde edilen genel kanı, kullanım kolaylığı, ucuz olması, kısa sürede sonuç alınabilmesi ve birçok farklı bakteri ve tedavi rejiminin değerlendirilebilmesi nedeniyle mikroplak yönteminin tarama yöntemi olarak seçilmesinin uygun olacağıdır (24,54,55). Geleneksel olarak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları planktonik yani serbest çoğalan mikroorganizmaları kültürde üretmeye odaklanmıştır. Ancak biyofilm yapısı içinde bulunan bazı mikroorganizmalar canlı olmalarına rağmen kültürde üretilemeyebilir. Bu gibi durumlarda moleküler tekniklerden faydalanılmalıdır (56,57). Rutin antibiyotik duyarlılık metotlarıyla serbest çoğalan mikroorganizmaların duyarlılık sonuçları belirlenebilir. Biyofilm üreten mikroorganizmalar antibiyotiklere daha dirençlidir; ancak duyarlılık ve direnç sınır değerleri belirlenmemiştir. Bu nedenle biyofilm enfeksiyonlarında elde edilen serbest mikroorganizmalara ait duyarlılık sonuçları tedavi başarısını öngörmede yeterli olmaz. Alınan doku örneklerinde yeterli homojenizasyon sağlanarak biyofilm oluşturan bakterilerin kültürde üretilmesi sağlanıp gerçek duyarlılık sonuçlarının elde edilmesi oldukça önemlidir. Biyofilm odağı ortadan kaldırılmadığı sürece rekürans ve tedavi başarısızlığı olabilir. Kronik yaralarda biyofilme yönelik tedaviler öncelikli olarak biyofilmi uzaklaştırmaya yönelik debridman, negatif basınçlı vakum tedavisi, kompresyon gibi yöntemler olmalıdır. Sıklıkla kullanılmasına rağmen kronik yara tedavisinde tek başına sistemik antimikrobiyal tedaviyi destekleyen bir kanıt yoktur (58-60). Eğer antimikrobiyal tedavi gerekli görüldüyse iki farklı gruptan sistemik antibiyotik kullanımı, sistemik ve lokal antibiyotik birlikte kullanımı ve antibiyotikle lokal dezenfektan kombinasyonları önerilmektedir (39). Farklı mekanizmalarla biyofilme etkinliği gösterilen antimikrobiyal ve antiseptikler, rifampisin, daptomisin, azitromisin, tobramisin, oritavansin, taurolidin, N-klorotaurin gibi moleküllerdir (61). Bal, dispersin-B, laktoferrin, galyum, bizmut, iyod gibi tedavide kullanılacak biyofilme yönelik biyolojik ve kimyasal ajanlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Uygun hastalar seçilerek larva tedavisi ve lökosit yamalarının anti-biyofilm etkilerinden faydalanılmalıdır. Hiperbarik oksijen tedavisi, biyofilmlerin anaerob ve mikroaerofil ortamı nedeniyle azalan antibiyotik etkinliğini artırarak anti-biyofilm etkinliğe katkıda bulunur. Kronik yaralarda biyofilm enfeksiyonlarını önleme ve tedavi stratejilerini geliştirmek için biyofilm oluşumunu önlemeye yönelik aşı, biyofilme etkili ilaçlarla antibiyotik kombinasyonları, topik antimikrobiyal tedavi rejimleri, lökosit yamaları ve otolog trombosit zengin fibrinlerin lokal uygulamaları, selektif debridman özelliği olan larvaların antimikrobiyal ve QS inhibitörleriyle kombine kullanımı üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bakterileri enfekte ederek

replike olan virusların bakteriyi lize uğratması temeline dayanan bakteriyofaj tedavisinin de kateter ve implantla ilişkili biyofilm enfeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir (62,63). Ayrıca antimikrobialerle QS inhibisyonu özelliği olan ultrason dalgaları, elektrik ve ultraviyole ışık kombinasyonlarının kullanımı üzerine de çalışmalar ve deneyimler gerekmektedir (39). Son yıllarda biyofilm enfeksiyonları tedavisinde yapılan çalışmalar özellikle QS, ikincil mesajcı nükleotidler ve bakteriyel amiloid proteinlerini hedef alan çalışmalardır (64). QS inhibisyonu sinyal iletişim ağının farklı noktaları üzerine olup bu basamaklar şöyle sıralanabilir (65,66): [1] Al sentez inhibisyonu; [2] Al reseptör antagonizması; [3] reseptöre bağlanma inhibisyonu [4] Al antikorları; [5] laktoz gibi enzimlerle Al yıkımı; [6] Al sekresyon ve transportunun inhibisyonu; [7] Al reseptör antikorları.

QS inhibitörleri doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılır. Doğal QS inhibitörleri fitokimyasal ve bitkisel olarak iki grupta değerlendirilebilir. Farklı çalışmalarda gösterilen fitokimyasal QS inhibitörleri, halojen furanonlar, naringenin, oroidin, salisilik asid, ursolik asid, sinnamaldehid, metil eugenol, piperin, anakardik asid karışımı (AAM), pierisidin, glukopierisidin A, malabarikon C, flavonoidler, naringenin, eriodiktiyol, taksifolin, kuersetin, katesin, antosiyanin-siyanidin, biberiye özütü, turunçgiller, izolimonic asid, diterpen fitol, α -mangostin olarak sıralanabilir. Bitkisel QS inhibitörleri ise kore balı, kestane balı, ıhlamur balı, manuka (*Leptospermum scoparium*) balı, ellagik ve klorojenik asid, pinosembren flavonoidi, *Kigelia africana* bitkisi, *Psidium guajava* özütü, *Syzygium cumini* (L.), *Pimenta dioica* (L.), nane yağı, karanfil yağı, tarçın, lavanta yağı, *Trigonella foenum-graecum*, *Phyllanthus emblica*, *Terminalia bellirica*, *Terminalia chebula*, *Punica granatum*, *Syzygium cumini* ve *Mangifera indica* çiçekleri, *Cordia gillettii*, *Conocarpus erectus* (Combretaceae), *C. hypericifolia* (Euphorbiaceae), *Callistemon viminalis* (Myrtaceae), *Bucida buceras* (Combretaceae), *Theobroma bicolor* (Melastomataceae), *Quercus virginiana* (Fagaceae), sarımsak, çay ağacı, biberiye, propolis özütü, arı poleni, ahududu, yabanmersini, kekik, zerdeçal, zencefil, üzüm, havuç, domates, patatya, su zambağı, bezelye, soya fasulyesi, biber, bitki köküyle ilişkili mantarlar, *Lippia alba* gibi bitkilerin anti-QS etkinliği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (67). Sentetik QS inhibitörleri de üzerine pek çok çalışmanın yapıldığı ve farklı moleküllerin geliştirildiği önemli tedavi seçenekleridir. Sentetik furanonlar ve metabromo-tiolakton *P. aeruginosa*'da *in vivo* etkinliği gösterilmiş moleküllerdir (68,69). Pnömonokların sebep olduğu koklear implant biyofilmi yapısına etkisi gösterilen "yd 47" yeni bir sentetik inhibitördür (70). FS3, "RNAIII-inhibiting peptide", KBI-3221 gibi farklı peptid yapıda QS inhibitörlerinin anti-biyofilm etkilerinin gösterildiği farklı *in vitro* ve hayvan çalışmaları mevcuttur (71-73).

Bakteriyel adaptasyonda kilit rol oynayan moleküllerden siklik diguanozin monofosfat (c-di-GMP), siklik diadenozin monofosfat (c-di-AMP), siklik guanozin monofosfat (cGMP), siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve guanozin tetrafosfat (ppGpp) gibi ikincil mesajcı olarak görev alan nükleotidler biyofilm tedavisinde diğer bir hedefdir (74). Bir çalışmada diguanat sentaz antagonistleriyle *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter*

baumannii'de biyofilm yapısının inhibe edildiği gösterilmiştir (75). Yine farklı çalışmalarda nükleotid antagonisti olarak etki eden Çin ginsengıyla *P. aeruginosa*'da, sistein proteaz B ile A grubu streptokoklarda anti-biyofilm etkinlik gösterilmiştir (76,77). Mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeye yapışmalarında rolü olduğu belirlenen amiloid peptid yapılarının da biyofilm oluşumunda önemli rolü olduğu görülmüştür (78). Bakteriyel amiloid proteinlerini parçalayarak etki eden FN075 ve BibC6 moleküllerinin *E. coli* biyofilm formasyonu üzerine etkili olduğu (79), *B. subtilis* biyofilm yapısına ise AA-861 (bir benzokinin türevi) ve partenolidin etkili olduğu gösterilmiştir (80).

Biyofilm yapısının tespit edilmesi de tedavisi kadar önemlidir. Bu nedenle özellikle biyofilm enfeksiyonu gelişebileceği öngörülen kronik yara enfeksiyonu gibi durumlarda doku örneklerinin uygun işlenmesi ve üretilen bakterilerde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi etkin tedaviye yönlendirmesi açısından oldukça önemlidir. Biyofilm oluşumunu gösteren invazif olmayan görüntüleme yöntemlerinin geliştirilmesi de tanıda büyük katkı sağlayacaktır.

Antimikrobialer dışında biyofilme yönelik tedavilerin geliştirilmesi, klinik pratikte daha sık kullanılması ve bu konuda çalışmalar yapılması gereklidir. Kronik yara enfeksiyonlarında gerçeği yansıtan hayvan modelleri üzerinde *in vivo* biyofilm çalışmaları ve biyofilm oluşturan bakterilere yönelik aşı çalışmaları ve bakteriyofaj tedavisi çalışmaları da artırılmalıdır. Geliştirilecek insanlarda kullanımı mümkün olan QS inhibitörlerinin, etkilerini direkt olarak bakterilerin çoğaltmasını inhibe ederek göstermedikleri için, direnç sorunu oluşturmayacağı öngörülmektedir. Etkene yönelik antibiyotiklerle biyofilme etkili maddelerin bir arada kullanımıyla antibiyotiklerde direnç gelişiminin azaltılması ve etkin tedavi başarısına ulaşılması hedeflenmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Saltoğlu N, Dalkıran A, Tetiker T, et al. Piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin for severe diabetic foot infections: a prospective, randomized clinical trial in a university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(8): 1252-7. [CrossRef]
2. Hartemann-Heurtier A, Robert J, Jacqueminet S, et al. Diabetic foot ulcer and multidrug resistant microorganisms: risk factors and impact. *Diabet Med.* 2004; 21(7): 710-5. [CrossRef]
3. Saltoğlu N, Yemişen M, Ergönül Ö, et al. Predictors for limb loss among patient with diabetic foot infections: an observational retrospective multicentric study in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(7): 659-64. [CrossRef]
4. Saltoğlu N, Kılıçoğlu Ö, Baktıroğlu S, et al. Diyabetik ayak yarası ve enfeksiyonunun tanısı, tedavisi ve önlenmesi: ulusal uzlaşma raporu. *Klimik Derg.* 2015; 28(Suppl. 1): 2-34.
5. Wolcott RD, Rumbaugh K, James G, et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care.* 2010; 19(8): 320-8. [CrossRef]
6. McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012; 20(2): 125-36. [CrossRef]

7. Jeffcoate W, Price P, Harding K. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004; 20(Suppl. 1): S78-89. [\[CrossRef\]](#)
8. Mathieu D, Linke J-C, Wattel F. Non-healing wounds. In: Mathieu D, ed. *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006: 401-27. [\[CrossRef\]](#)
9. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care*. 2007; 20(2): 99-117 [\[CrossRef\]](#)
10. Abdallah DY, Jadaan MM, McCabe JP. Body mass index and risk of surgical site infection following spine surgery: a meta-analysis. *Eur Spine J*. 2013; 22(12): 2800-9. [\[CrossRef\]](#)
11. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865): 813-20. [\[CrossRef\]](#)
12. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(1): 37-44. [\[CrossRef\]](#)
13. Croes S, Deurenberg RH, Boumans ML, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 229. [\[CrossRef\]](#)
14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2): 167-93. [\[CrossRef\]](#)
15. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999; 283(5409): 1837, 1839.
16. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü S, Ertuğrul MB. Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klimik Derg*. 2008; 21(3): 79-86.
17. Jones HC, Roth IL, Sanders WM 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*. 1969; 99(1): 316-25.
18. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015; 80(1):7-12. [\[CrossRef\]](#)
19. Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair Regen*. 2014; 22(2): 174-86. [\[CrossRef\]](#)
20. Donlan R, Costerton J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2): 167-93. [\[CrossRef\]](#)
21. Hostacká A, Ciznár I, Stefkovicová M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010; 55(1): 75-8. [\[CrossRef\]](#)
22. Stoodley P, deBeer D, LappinScott H. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(9): 1876-9.
23. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998; 28(3): 449-61. [\[CrossRef\]](#)
24. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*. 2003; 46(4): 207-14. [\[CrossRef\]](#)
25. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994; 176(2): 269-75. [\[CrossRef\]](#)
26. Lynch SA, Robertson TG. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 415-28. [\[CrossRef\]](#)
27. Redfield R. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol*. 2002; 10(8): 365-70. [\[CrossRef\]](#)
28. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*. 1994; 48: 585-617. [\[CrossRef\]](#)
29. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4): 999-1007. [\[CrossRef\]](#)
30. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2(7): a000398. [\[CrossRef\]](#)
31. An YH, Dickson RB, Doyle RJ. Mechanism of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infection. In: An YH, Freidman RJ, ed. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. Totowa, NJ: Human Press, 2000: 1-27. [\[CrossRef\]](#)
32. Gün İ, Ekinçi FY. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*. 2009; 34(3): 165-73.
33. Pratt L, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*. 1999; 2(6): 598-603. [\[CrossRef\]](#)
34. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol*. 2003; 50(1): 61-8. [\[CrossRef\]](#)
35. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. 2003; 185(5): 1485-91. [\[CrossRef\]](#)
36. Romanova luM, Gintsburg AL. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2011; (3): 99-109.
37. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30(3): 236-41. [\[CrossRef\]](#)
38. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 34-40. [\[CrossRef\]](#)
39. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(Suppl. 1): S1-25. [\[CrossRef\]](#)
40. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*. 2003; 5(13): 1213-9. [\[CrossRef\]](#)
41. Uludağ Altun H, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg*. 2008; 39: 82-8.
42. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9(1): 34-9. [\[CrossRef\]](#)
43. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(12): 4339-44.
44. Souli M, Giamerallou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(4): 939-41.
45. Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis*. 1990; 161(1): 37-40. [\[CrossRef\]](#)
46. Hengge-Aronis R. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: Neidhardt, FC, Curtiss R, Ingraham JE et al., eds. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1996: 1497-512.
47. Dunne WM, Jr. Buckmire FL. Effects of divalent cations on the synthesis of alginic acid-like exopolysaccharide from mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*. 1985; 43(174-175): 193-216.
48. Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35(9): 1824-8. [\[CrossRef\]](#)
49. Evans DJ, Allison DG, Brown MR, Gilbert P. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother*. 1991; 27(2): 177-84. [\[CrossRef\]](#)
50. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother*. 1992; 30(6): 791-802. [\[CrossRef\]](#)
51. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother*. 1992; 30(6): 803-10. [\[CrossRef\]](#)

52. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes Metab Syndr*. 2013; 7(2): 101-7. [\[CrossRef\]](#)
53. Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(4): 322-32. [\[CrossRef\]](#)
54. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010; 83(2): 89-105. [\[CrossRef\]](#)
55. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; 40(2): 175-9. [\[CrossRef\]](#)
56. Penterman J, Nguyen D, Anderson E, et al. Rapid evolution of culture-impaired bacteria during adaptation to biofilm growth. *Cell Rep*. 2014; 6(2): 293-300. [\[CrossRef\]](#)
57. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(8): 1812-7. [\[CrossRef\]](#)
58. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(12): e132-73. [\[CrossRef\]](#)
59. O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess*. 2000; 4(21): 1-237.
60. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(2): 143-9. [\[CrossRef\]](#)
61. Lynch A, Abbanat D. New antibiotic agents and approaches to treat biofilm-associated infections. *Expert Opin Ther Pat*. 2010; 20(10): 1373-87. [\[CrossRef\]](#)
62. Soothill J. Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11(9):909-15. [\[CrossRef\]](#)
63. Burrowes B, Harper DR, Anderson J, McConville M, Enright MC. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9(9): 775-85. [\[CrossRef\]](#)
64. Wu H, Moser C, Wang HZ, Højby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 2015; 7(1): 1-7. [\[CrossRef\]](#)
65. d'Angelo-Picard C, Haudecoeur E, Chevrot R, Dessaux Y, Faure D. The plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*: A model to study the roles of lactonases in the quorum-sensing regulatory network. *Biol Plant Microbe Interact*. 2006; 5: 353-6.
66. De Lamo Marin S, Xu Y, Meijler MM, Janda KD. Antibody catalyzed hydrolysis of a quorum sensing signal found in Gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; 17(6):1549-52. [\[CrossRef\]](#)
67. Asfour HZ. Anti-quorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. (Baskıda).
68. Wu H, Song Z, Hentzer M, et al. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother*. 2004 ;53(6): 1054-61. [\[CrossRef\]](#)
69. O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(44): 17981-6. [\[CrossRef\]](#)
70. Cevizci R, Düzlü M, Dündar Y, et al. Preliminary results of a novel quorum sensing inhibitor against pneumococcal infection and biofilm formation with special interest to otitis media and cochlear implantation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015; 272(6): 1389-93. [\[CrossRef\]](#)
71. Cirioni O, Mocchegiani F, Cacciatore I et al. Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection 2. *Peptides*. 2013; 40: 77-81. [\[CrossRef\]](#)
72. Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(6): 2226-9. [\[CrossRef\]](#)
73. LoVetri K, Madhyastha S. Antimicrobial and antibiofilm activity of quorum sensing peptides and Peptide analogues against oral biofilm bacteria. *Methods Mol Biol*. 2010; 618: 383-92. [\[CrossRef\]](#)
74. Kalia D, Meray G, Nakayama S, et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev*. 2013; 42(1): 305-41. [\[CrossRef\]](#)
75. Sambanthamoorthy K, Luo C, Pattabiraman N, et al. Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling*. 2014; 30(1): 17-28. [\[CrossRef\]](#)
76. Song Z, Kong KF, Wu H, et al. Panax ginseng has anti-infective activity against opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, a bacterial communication process critical for establishing infection. *Phytomedicine*. 2010; 17(13): 1040-6. [\[CrossRef\]](#)
77. Connolly KL, Roberts AL, Holder RC, Reid SD. Dispersal of Group A streptococcal biofilms by the cysteine protease SpeB leads to increased disease severity in a murine model. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18984. [\[CrossRef\]](#)
78. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(5): 2230-4. [\[CrossRef\]](#)
79. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(12): 913-9. [\[CrossRef\]](#)
80. Romero D, Sanabria-Valentín E, Vlamakis H, Kolter R. Biofilm inhibitors that target amyloid proteins. *Chem Biol*. 2013; 20(1): 102-10. [\[CrossRef\]](#)