



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SOLUNUM SİSTEMİ ENFEKSİYONLARINDAN İZOLE  
EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ  
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

**DR. ONUR KARATUNA  
UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2008**



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SOLUNUM SİSTEMİ ENFEKSİYONLARINDAN İZOLE  
EDİLEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ  
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

**DR. ONUR KARATUNA  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: PROF. DR. AYŞEGÜL YAĞCI**

**İSTANBUL 2008**

## İÇİNDEKİLER:

Sayfa

<b>ÖNSÖZ</b> .....	i
<b>ÖZET</b> .....	ii
<b>İNGİLİZCE ÖZET (Abstract)</b> .....	iv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Epidemiyolojik Özellikleri.....	5
2.3. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Patogenezi.....	7
2.3.1. Konağa Ait Faktörler.....	8
2.3.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Faktörleri.....	9
2.3.2.1. Bakteri Hücre Yüzeyi İle İlişkili Virülans Faktörleri.....	9
2.3.2.2. Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri.....	12
2.4. Quorum Sensing ve <i>P. aeruginosa</i> Patogenezindeki Önemi.....	16
2.5. Quorum Sensing ve Biyofilm İlişkisi.....	19
2.6. <i>P. aeruginosa</i> ' da Antibiyotik Direnci.....	20
2.7. Solunum Yolu Enfeksiyonlarında <i>P. aeruginosa</i> 'nın Yeri.....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.1.1. Standart kökenler.....	23
3.1.2. Besiyerleri.....	23
3.1.3. Kimyasal maddeler.....	24
3.1.4. Antibiyotik diskleri.....	24
3.1.5. PCR Malzemeleri.....	25
3.1.6. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.....	25
3.2. Yöntemler.....	27
3.2.1. Çalışma Kökenleri.....	27
3.2.2. Elastaz Üretiminin Saptanması.....	28
3.2.3. Alkali Proteaz Üretiminin Saptanması.....	29

3.2.4. Biyofilm Üretiminin Saptanması.....	30
3.2.5. Piyosyanin Üretiminin Saptanması.....	31
3.2.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	32
3.2.7. Quorum Sensing Genlerinin PCR ile Saptanması.....	32
3.2.8. Kökenlerin ERIC (Enterobacterial Repetitive Consensus)-PCR ile Genotiplendirilmesi.....	33
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	33
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>

## **ÖNSÖZ**

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen değerli hocalarıma, bu süreyi beraber geçirdiğim çalışma arkadaşlarıma, tezimin planlama aşamasından basımına dek her türlü desteği gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Ayşegül Yağcı'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Onur KARATUNA

## ÖZET

*Pseudomonas aeruginosa* ağır seyirli hastane enfeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlar, kistik fibroz hastalarında kronik enfeksiyonlar oluşturan bir fırsatçı patojendir. Bakteri konağa kolonizasyon sonrasında çeşitli virülans faktörleriyle (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin, fosfolipaz, ekzotoksin A, vb) doku hasarı yapar, kan dolaşımına karışarak vücutta yayılabilir. Virülans faktörlerinin üretiminin düzenlenmesi, bakterilere çevre koşullarına uyumda ve konağın savunma mekanizmalarına karşı korunmada yardımcı olur. Quorum Sensing (QS) *P. aeruginosa* tarafından üretilen birçok virülans faktörünün düzenlenmesinden sorumlu en önemli düzenleyici sistemdir. QS bakteri hücre yoğunluğunu izler ve belirli bir eşik değere ulaşıldığında, birçoğu virülans faktörü genleri olan çok sayıda genin ifadesini başlatır.

Çalışmamızda alt solunum yolu enfeksiyonu ön tanısıyla gönderilen klinik örneklerden izole edilen toplam 100 *P. aeruginosa* kökeninde 4 farklı virülans faktörü (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin ve biyofilm) mikropakta absorbans ölçümüne dayalı yarı nicel yöntemlerle araştırılmıştır. Absorbans seviyeleri düşük seviyede saptanan kökenlerde (n: 16) bu virülans faktörlerinin üretiminde düzenleyici rolü olan QS genleri PCR yöntemiyle, kökenler arasındaki klonal ilişki ise ERIC-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kökenlerin antibiyotik duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Virülans faktörü üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelenmiştir.

Mikroplak yöntemiyle kökenlerin %76'sında elastaz, %73'ünde alkali proteaz, %75'inde piyosiyenin, %86'sında biyofilm üretimi saptanmıştır. PCR yöntemiyle QS genleri araştırılan 16 kökenin yedisinde bir ya da daha fazla

QS geni negatif bulunmuştur. ERIC-PCR yöntemiyle kökenler arasında herhangi bir klonal ilişki gözlenmemiştir.

Virülans faktörü üretimi ile antibiyotiklere duyarlılık arasındaki ilişki irdelendiğinde; elastaz üreten kökenlerin piperasilin (p: 0,041) ve seftazidime (p: 0,048), alkali proteaz üreten kökenlerin tobramisin (p: 0,003), piperasilin (p: 0,000), piperasilin/tazobaktam (p: 0,001), sefepim (p: 0,002), imipenem (p: 0,009) ve siprofloksasine (p: 0,003), piyosiyenin üreten kökenlerin ise amikasin (p: 0,011), tobramisin (p: 0,013), seftazidim (p: 0,023), siprofloksasin (p: 0,001) ve ofloksasine (p: 0,000) bu faktörleri üretmeyen kökenlere göre daha duyarlı oldukları saptanmıştır.

Sonuçlarımız *P. aeruginosa*'ya bağlı solunum yolu enfeksiyonlarında ifadesi QS sistemi ile düzenlenen virülans faktörlerinin rolünü bir kez daha ortaya koymakla birlikte QS eksik kökenlerin de enfeksiyon etkeni olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu enfeksiyonlarda QS ile düzenlenmeyen virülans faktörlerinin de rol almış olabileceğini ya da birden fazla *P. aeruginosa* kökeninin de etken olabileceği ihtimalini göz ardı etmemek gerekir.

## SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing life threatening infections in immunocompromised patients, severe nosocomial infections in hospital settings and chronic infections in cystic fibrosis patients. Following the colonization of the host, by producing several virulence factors (elastase, alkaline protease, pyocyanin, phospholipase, exotoxin A, etc.) the bacterium causes tissue damage and enters the blood stream thus disseminates in the host. Regulation of virulence factor synthesis helps the bacteria to adapt to environmental conditions and to protect themselves against host's defence mechanisms. Quorum Sensing (QS) is the most important regulatory system responsible for the regulation of many virulence factors produced by *P. aeruginosa*. QS monitors the bacterial cell density and upon reaching a certain threshold it triggers the expression of many genes, of which many are virulence factor genes.

In our study, *P. aeruginosa* isolates (n:100) isolated from clinical samples of patients with a clinical diagnosis of lower respiratory tract infection were investigated for production of four different virulence factors (elastase, alkaline protease, pyocyanin, biofilm) by semi-quantitative methods which rely on the measurement of absorbance in microtiter plates. For the isolates with low absorbance values (n: 16), the QS genes responsible for the synthesis of these virulence factors were studied with PCR and clonal relationship between the isolates were investigated with ERIC-PCR. The antimicrobial susceptibility of the isolates was determined by disc diffusion method. The relationship between virulence factor synthesis and antimicrobial susceptibility was examined statistically.

With microtiter plate method virulence factor production was detected in 76% of isolates for elastase, 73% for alkaline protease, 75% for pyocyanin and 86% for biofilm. Among the 16 strains which included in the PCR for the investigation of QS genes, seven strains were negative for one or more QS

genes. ERIC-PCR method revealed no clonal relationship between the strains.

The correlation between the virulence factor production and antimicrobial susceptibility has been examined and positive correlation has been found between the elastase production and the susceptibility to piperacillin (p: 0,041), and ceftazidime (p: 0,048), similarly between alkaline protease production and tobramycin (p: 0,003), piperacillin (p: 0,000), piperacillin/tazobactam (p: 0,001), cefepime (p: 0,002), imipenem (p: 0,009) and ciprofloxacin (p: 0,001) susceptibility, pyocyanin production and amikacin (p: 0,011), tobramycin (p: 0,013), ceftazidime (p: 0,023), ciprofloxacin (p: 0,001) and ofloxacin (p: 0,000) susceptibility.

Our results show once again the importance of the QS regulated virulence factors of *P. aeruginosa* in lower respiratory tract infections and that QS-deficient strains might be capable of causing infections. However, it should be noticed that lower respiratory tract infections could be related with virulence factors not regulated by QS or multiple *P. aeruginosa* strains with different virulence properties may take part in the infection process.

## 1. GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en önemli insan patojenidir. Aerob, nonfermentatif, gram negatif bir çomak olan *P. aeruginosa*, ilk kez 1882'de Gessard tarafından irinli materyalden izole edilmiştir. Toprakta, suda ve organik yüzeylerde yaygın olarak bulunabilen bakteri, fırsatçı tipte enfeksiyonlara yol açar (1). *P. aeruginosa* son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sağlıklı bireylerde *P. aeruginosa* kolonizasyonu nadir olarak görülür, kolonizasyon geliştiğinde ise sıklıkla cilt, barsaklar, üst ve alt solunum yolları kolonize olur. Hastanede yatan hastalarda kolonizasyon sıklığı çok daha fazladır ve çoğunlukla bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda, konak savunmasını bozan uygulamalarda (kateterizasyon, entübasyon gibi), geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreyle kullanımında ve hastanede bir enfeksiyon kaynağının olması durumunda gerçekleşir (2).

Hastanelerde salgınlara yol açabilen *P. aeruginosa*, hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen etkenlerindedir (3). Hastane içerisinde enfeksiyonların olası kaynakları olarak mekanik solunum destekleme cihazları, endoskoplar, infüzyon çözeltileri, damar içi kateterler, lavabolar, musluk başları ve hasta odasında bulunabilen çiçekler gösterilmiştir (1).

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Enfeksiyonların ilk basamağı kolonizasyondur, konak savunmasının bozulduğu ve bağışık yanıtın yetersiz kaldığı durumlarda kolonizasyonun ardından genellikle enfeksiyon gelişir.

Kolonizasyon; bakterinin pilusları ve bir mukoid ekzopolisakkarit olan aljinat sayesinde konağa tutunmasıyla başlar. Alkali proteaz, hemolizinler, elastaz gibi invazyondan sorumlu enzimler salgılayarak dokularda yayılan

bakteri, sitotoksini (eski adıyla lökosidin) ile nötrofil fonksiyonlarını inhibe eder. Piyosiyanın silyalı solunum yolu epiteli fonksiyonlarını bozarak ve toksik serbest radikaller üreterek doku hasarını arttıran bir faktördür. Lipopolisakkarit septik şok bulgularında ana rol oynar. Ekzotoksin A difteri toksinine benzer şekilde etki ederek protein sentezini inhibe eder. Ekzoenzim *S ras* gen süper ailesine ait proteinleri ribozilleyerek yerel konak savunma mekanizmalarını bozar (4, 5).

Çeşitli virülans faktörleri üreten *P. aeruginosa* bu faktörlerin sentezini gram negatif ve gram pozitif bakterilerde gen düzenlenmesinden sorumlu önemli bir mekanizma olan hücreler arası haberleşme, yeterli çoğunluk algılanması, ya da literatürde yerleşmiş ismiyle Quorum Sensing (QS) ile sağlar. Bakteri hücresi bazal seviyede, yayılabilme özelliği taşıyan sinyal molekülleri üretir, ortamdaki bakteri yoğunluğunun artmasıyla sinyal molekülü üretimi ve miktarı da artar, sinyal molekülü yoğunluğu belirli bir eşik değere ulaştığında kendi hedef proteinine bağlanır ve çoğu virülans faktörlerinin üretimiyle ilişkili bir dizi genin ifade edilmesini tetikler. Günümüzde *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin sentezinin düzenlenmesinde rolü aydınlatılmış olan iki QS sistemi vardır. Açıl homoserin lakton yapıda sinyal molekülleri kullanan bu sistemler *las* ve *rhl* sistemleridir. QS sistemi bileşenlerinden bir veya birkaçının eksikliği bakterinin virülansında belirgin azalmaya yol açar (6).

Solunum yolları *P. aeruginosa* tarafından en sık enfekte edilen vücut bölgesidir. Akciğer enfeksiyonları genellikle kronik akciğer hastalığı bulunan veya bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda gözlenir ve çoğunlukla bazı risk faktörleriyle ilişkilidir (endotrakeal entübasyon, solunum yolu tedavileri, uzamış hastanede kalış süresi, antibiyotik kullanımı ve nötropeni gibi). Çoklu ilaç direncinin tedavi seçeneklerini kısıtlaması ve yüksek mortalitesi (%70-80) nedeniyle *P. aeruginosa* pnömonileri ciddi sorun olmaktadır.

Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerinde:

1. bazı virülans faktörlerinin (elastaz, alkali proteaz, piyosiyenin, biyofilm) üretimini belirlemek
2. bu virülans faktörlerini üretmeyen ya da düşük düzeyde üreten kökenlerde, faktörlerin üretiminde düzenleyici rolü olan *las* ve *rhl* genlerini belirlemek ve kökenler arasında klonal ilişkinin varlığını araştırmak
3. kökenlerin antimikrobiyal duyarlılık paternlerini ve duyarlılıkla virülans faktör üretimi arasındaki ilişki varlığını değerlendirmek hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *P. AERUGINOSA*'NİN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Pseudomonadlar; *Pseudomonas* cinsini de kapsayan, düz veya hafif kıvrımlı gram negatif çomak morfolojisinde, zorunlu aerob, polar flajel sayesinde hareketli, glukoz ve diğer karbohidratları oksidatif olarak kullanan, genellikle sitokrom oksidaz üretimi pozitif olan bir grup bakteridir. Ribozomal RNA-DNA çalışmaları ile pseudomonadlar 5 ribozomal RNA homoloji grubuna ayrılmışlardır (7). *Pseudomonas* cinsi bu sınıflamada ribozomal RNA grup 1 içinde yer almıştır. Grup kendi içinde floresan grup, stutzeri grup, alkaligenes grup olarak üçe ayrılır. *P. aeruginosa*; *P. fluorescens* ve *P. putida* ile birlikte floresan grupta yer alır. Floresan gruptaki tüm türler uzun dalga boylu ultraviyole ışık altında beyaz mavi-yeşil floresans verirler ve suda eriyen bir pigment olan piyoverdin üretirler. Besiyerinde magnezyum bulunması floresansı artırır, bu amaçla King'in B besiyeri, Seller'in besiyeri, Mueller-Hinton agar kullanılabilir (8).

Uzunluğu 1-3 µm, genişliği 0,5-1 µm arasında değişen *P. aeruginosa*'nın tanıda yardımcı fenotipik özellikleri arasında kanlı agar veya çikolata agarda metalik parlaklık veren geniş, mukoid, kaba veya pigmentli koloniler oluşturması, genellikle beta hemolitik olması, MacConkey agarda yeşil pigmentasyon ve metalik parlaklık veren laktoz negatif koloniler oluşturması sayılabilir. Mukoid morfotip fazla miktarda polisakkarit (aljinat) üretimine bağlıdır. *P. aeruginosa* piyoverdin (sarı-yeşil) ve piyosiyenin (mavi) dışında piyorubin (kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) pigmentlerini de üretebilir. *P. aeruginosa* diğer nonfermenter türler tarafından salgılanmayan suda eriyen mavi renkli piyosiyenin üretir (8).

Tek karbon kaynağı olarak çok fazla sayıda substratı kullanabilmesi sayesinde birçok besiyerinde üreyebilir. Besiyerinde üreyince oluşturduğu üzüm benzeri koku *P. aeruginosa* için oldukça tipiktir. İdeal olarak aerob ortamda ürese de, son elektron alıcısı olarak ortamda nitrat bulunması durumunda anaerob koşullarda da üreyebilir (8).

Karbohidratları fermente etmez ama glukoz, fruktoz ve ksilozdan oksidatif metabolizma ile asit oluşturur, laktoz ve sükrozdan asit oluşturmaz. Oksidaz testi güçlü pozitifdir, 42°C'de üreyebilmesi ile *P. fluorescens* ve *P. putida*'dan ayrılır. Asetamid alkalinizasyonu pozitifdir, nitrat ve nitriti denitrifiye eder, Simmon's sitrat besiyerinde üreyerek pozitif reaksiyon verir, hidrojen sülfid üretimi negatifdir. L-arjinin dehidrolaz testi pozitif, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz testleri negatifdir. Polar yerleşimli flajeli sayesinde hareketlidir. Kırkbeş-elli derece ısıya kadar dirençlidir. Distile suda dahi üreyebilir. Düşük pH değerlerinde (pH ≤ 4,5) üreyemez.

## **2.2. P. AERUGINOSA'NIN EPİDEMİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

Modern tıbbın gelişmesinden önce de *P. aeruginosa*'nın yara ve cerrahi bölge enfeksiyonları yaptığına dair kanıtlar bulunmaktadır (9). Sédillot 1850'de cerrahi sargılarda bazen mavi-yeşil akıntı geliştiğini ve bunun enfeksiyonla ilişkili olduğunu saptamış, Luke 1862'de mavi-yeşil irin içerisinde çomak şeklinde mikroskopik yapılar gözlemlemiş, 1882'de Gessard bakteriyi ilk kez izole etmiş ve *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirmiştir. Osler bakterinin primer enfeksiyonlardan çok sekonder veya fırsatçı enfeksiyonlara yol açtığını öne sürerek, bakterinin fırsatçı patojen olma özelliğini 1925 yılında ilk kez dile getirmiştir. Bağışıklık sistemini baskılayan tedavilerin geliştirilmesi ve artan antibiyotik kullanımı ile 1960lar'dan itibaren bakteri sık rastlanır bir insan patojeni halini almış ve her geçen yıl önemi artmaya devam etmiştir.

Mikrobiyolojik olarak etkeni belirlenmiş nozokomiyal enfeksiyon olgularının %11 - 13,8'inde etken *P. aeruginosa*'dır ve esas olarak nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumludur. Hastane dışında toprakta, suda, bitkilerde de bol olarak bulunur (2). Nadiren sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda kolonize olur.

Hastane ortamında, hastaların nemli vücut bölgelerinden (aksilla, perine, dış kulak) ve nemli cansız yüzeylerden (lavabo ve musluklar, tuvaletler, duşlar) izole edilebilir. Suyla temas eden cihazlar (mekanik solunum cihazı, gıda hazırlama cihazları gibi) hastane kaynaklı salgınlardan sorumlu tutulmaktadır.

Hastanede yatan hastalarda *P. aeruginosa* enfeksiyonuna yol açan risk faktörleri; mekanik solunum cihazına bağlı olma, uzamış geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi, kemoterapi, cerrahi yara ve yanıklar olarak sıralanabilir (2).

Hastane kaynaklı enfeksiyonların değerlendirildiği geniş çaplı çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın; pnömonilerin %16'sından, idrar yolu enfeksiyonlarının %12'sinden, kan akımı enfeksiyonlarının %10'undan ve cerrahi bölge enfeksiyonlarının %8'inden sorumlu olduğu saptanmıştır (6).

Hastane kaynaklı enfeksiyonlara kıyasla daha seyrek gözlenen toplum kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonları bazı özel koşullarda gerçekleşir ve sıklıkla nemli ortamlara temas ile meydana gelir. Örnek olarak banyo, sauna, jakuzi ve yüzme havuzlarından kazanılan cilt enfeksiyonları ve dış kulak yolu enfeksiyonu (yüzücü kulağı), küçük çocuklarda spor ayakkabı giymeye bağlı gelişen ayak parmağı enfeksiyonları, travma sonrası gelişen endoftalmit veya damar içi madde bağımlılarında gözlenen endokardit sayılabilir (10-13).

Sağlıklı insanlarda *P. aeruginosa* taşıyıcılığı boğaz, nazal mukoza ve cilt göz önüne alındığında %7, dışkıda ise %24 olarak saptanmışken, risk

altındaki hastalarda bu oran %50 olarak bulunmuştur (14). Gastrointestinal kolonizasyon sıklıkla antibiyotik tedavisine bağılı olarak gelişir, bu durumun klinik önemi, aspirasyon sonrasında hastaların solunum yollarının *P. aeruginosa* ile kolonize olması ve tablonun pnömoniye dönüşebilmesidir.

### **2.3. *P. AERUGINOSA* ENFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ:**

*P. aeruginosa* enfeksiyonları genellikle konak savunma hattındaki bir bozulmaya ikincil olarak gelişir. Konağı zayıflatan bu türde bir bozulma travma, cerrahi, yanık ya da kateter uygulamaları gibi normal cilt ya da mukozal yüzeylerin bütünlüğünün kaybolduğu durumlar olabilir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının normal mukozal florayı baskılaması, savunma mekanizmalarının bozulması (kemoterapiye bağılı gelişen nötropeni, kistik fibrozda gözlenen mukozal temizlemede yetersizlik, AIDS, diabetes mellitus) durumlarında bakteri kolonizasyon için fırsat bulur (6). Sağlıklı bireylerde orofarenks kolonizasyonu sıklığı %6 civarındadır ve dışkıdan %3 - %24 oranlarında saptanabilir. Hastanede yatan risk altındaki bireylerde ise *P. aeruginosa* kolonizasyon oranı %50'lere ulaşır (1). Bakteri tip IV pili, pilus yapıda olmayan diğer bazı adezinler ve flajeli sayesinde epitel hücrelerine tutunarak kolonizasyonu başlatır (15, 16).

Kolonizasyon sonrasında üretilen birçok hücre dışı virülans faktörleri doku hasarı, kan dolaşımına karışma ve yayılıma neden olur. *In vivo* çalışmalarla ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz ve alkali proteazın *P. aeruginosa*'nın virülansının en yüksek seviyede sergilenebilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.

*P. aeruginosa* virülans faktör sentezini düzenleyerek, çevre koşullarına ve özellikle konak savunmasına karşı korunma sağlar. Bu uyum sistemleri arasında QS öne çıkar. QS bakterilerin, bakteri hücre yoğunluğunu algılamasına ve birbirleriyle iletişim kurmasına, sonuçta eşgüdümlü olarak virülans faktörü üretmesine olanak sağlar. QS'nin virülans faktörleri sentezi

aracılığıyla solunum yollarında inflamasyonun sürdürülmesinden ve kronik enfeksiyonlarda biyofilm sentezinden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Akut enfeksiyonda baskın tablo invazyon, yayılma ve aşırı doku hasarı iken, kronik enfeksiyonda, özellikle kistik fibrozda, bakteri vücuda uyum sağlar. Bunun örnekleri olarak bakterinin flajel ve pili gibi bazı immunojenik virülans faktörlerini kaybetmesi ve biyofilm oluşturarak kendini gizlemesi gösterilebilir (5).

Konak hücresi ile temas kurulduktan sonra tip 3 sekresyon sistemi aktive olur. Tip 3 sekresyon sistemi sayesinde *P. aeruginosa* toksinlerini bakteri hücresi ve konak hücresi arasında kurulan şırınga benzeri yapıdan konak hücresi sitoplazmasına aktarır (17). *P. aeruginosa*'nın efektör proteinleri, ExoY, ExoS, ExoT, ExoU tip 3 sekresyon sistemini kullanan invazyon ve yayılımdan sorumlu sitotoksik proteinlerdir. Elastaz, alkali proteaz, ekzotoksin A, fosfolipaz C gibi tip 2 sekresyon sistemini kullanarak hücre dışına salınan virülans faktörleri de, solunum yolu epitelinin koruyucu glikokaliks yapısını bozarak epitelyal ligandları açığa çıkarır ve bakterinin invazyonunda yer alırlar. Hücre dışına salınan bu faktörlerin sitotoksik etkileri de bulunmaktadır. Bir siderofor olan piyoverdin bakterinin demir metabolizması için gerekli demiri ortamdan sağlar, piyosiyenin ise oluşturduğu serbest radikaller ile doğrudan hücre hasarına yol açar (1, 5).

### **2.3.1. KONAĞA AİT FAKTÖRLER:**

*P. aeruginosa*'nın patojenik potansiyelini belirleyen başlıca unsur konağın sağlık durumudur. Konağın cilt ve mukozal yüzeyler gibi anatomik bariyerlerinde bozulma (yanık, yara, damar içi veya üriner kateter, endotrakeal tüp kullanımı) *P. aeruginosa* enfeksiyonları için risk faktörüdür.

Konağın enfeksiyonlara karşı doğal direncinde cilt ve mukozanın mekanik bariyer görevinin yanı sıra, kompleman proteinleri (opsoninler,

anafilatoksinler), akciğer sürfaktanı, sitokinler, kemokinler, kollektin ailesi proteinler (sürfaktan protein A ve D) de rol alır.

Konağın bakteriye karşı güçlü bir bağışık yanıt geliştirmesinde polimorfonüveli lökositler çok önemli rol oynar. Nötropenin *P. aeruginosa* enfeksiyonları için majör risk faktörü olduğunu belirten çok sayıda çalışma vardır (18, 19).

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının epitel hücre fonksiyonları ile ilişkisi de gösterilmiştir. Henüz patogenezi tamamıyla aydınlatılamamış otozomal geçişli kistik fibroz (KF) hastalığında, epitel hücresi membranında klorür ve bikarbonat iletiminden sorumlu kanalın düzenleyici proteini olan CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) protein üretilmez ya da işlevsel olmayan bir protein üretilir (20). CFTR üretiminde kayıp veya fonksiyonlarında bozulma bronş epiteli apikal yüzeyi ve visköz muköz tabaka arasında bulunan hava yolu yüzey sıvısının tuz konsantrasyonunun artmasına, dehidratasyonuna ve dolaylı olarak mukosilyer aktivitenin bozulmasına ve mukus tıkaçları oluşmasına neden olur ve böylelikle *P. aeruginosa* kolonizasyonuna yatkınlık sağlar. Hastaların %80'inden fazlası 15 - 20 yaşlarına dek *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonu geçirirler (1).

### **2.3.2. *P. AERUGINOSA*'NIN VİRÜLANS FAKTÖRLERİ**

#### **2.3.2.1. BAKTERİ HÜCRE YÜZEYİ İLE İLİŞKİLİ VİRÜLANS FAKTÖRLERİ**

Flajel ve pili bakterinin hareketinden, epitel hücresi yüzeyindeki asialo-GM1 reseptörlerine bağlanmasından sorumludurlar. Ek olarak, lipopolisakkarit de asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunda benzer rol oynar. Epitel hücrelerine geri dönüşümsüz adezyon, solunum yolları epitelinin kolonizasyonu için büyük öneme sahip başlangıç basamağıdır (1,5).

**FLAJEL:** *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-GM1'e bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar. Flajel Toll-benzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile etkileşerek NF $\kappa$ B bağımlı inflamatuvar yanıtı uyarır ve kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile IL-8 sentezinin başlatılmasına yol açar. Flajelin güçlü immunojen olması sebebiyle, kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında konak bağışık yanıtından kaçmak için flajelsiz mutantlar seçilmektedir (21).

**PİLİ (FİMBRİAE):** Bakterinin kısa, filamentöz yüzey yapılarıdır. Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Flajel gibi pili de kolonizasyonun adezyon fazında epitel hücre membranlarının asialo-GM1 bölgesine bağlanarak patogeneizde kritik önem taşır (1, 5).

**LİPOPOLİSAKKARİT (LPS):** Bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan LPS; fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. *P. aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında O-özgül polisakkarit zincirleri tanısal özelliktedir. LPS'nin lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder ve asialoGM1'e bağlanarak adezyonda etkin rol oynar, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanıma özellikleri ile ve CFTR'ye bağlanarak virülansta önemli etki gösterir. Kistik fibroz hastalarında *P. aeruginosa*'nın farklı lipid A mutantları bulunur ve bunlardan bazıları konağın antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gösterir ve TLR4 aktivasyonunun artmasına neden olurlar (4).

**ALJİNAT:** Aljinat mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. Her ne kadar aljinat hücre dışına salınan bir ekzopolisakkarit olsa da, hücre ile ilişkili kalması sebebiyle bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında

incelenmiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum yolu enfeksiyonlarında aljinat üretimi çok önemli rol oynar. Aljinat üretimi olmayan kökenlerin sıçan akciğerine verildiğinde hızla aljinat üreten kökenlere dönüşmesi bunun göstergesidir (4). Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır. Kümedeki ilk gen aljinat sentezi yolağındaki başlangıç basamağında görevli GDP-mannoz dehidrogenazı kodlayan *algD*'dir. Bir diğer önemli enzim olan fosfomannomutazı *algC* geni kodlar ve aljinat üretiminin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Fosfomannomutaz iki etkili enzimdir; mannoz-6-fosfatı mannoz-1-fosfata dönüştüren fosfomannomutaz etkisinin yanı sıra glukoz-6-fosfatı glukoz-1-fosfata dönüştüren fosfoglukomutaz etkisi de vardır. Enzimin fosfomannomutaz etkisi ile aljinat üretimi, fosfoglukomutaz etkisi ile ise LPS sentezi gerçekleştirilir (22). Kistik fibroz hastalarının solunum yollarından izole edilen kökenler genellikle aljinat aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipe kökenlerdir. AlgT aljinat üretim operonunun ifadesi için gerekli bir proteindir ve AlgT'nin anti-sigma faktörünü kodlayan *mucA* genindeki mutasyonların inaktive edilmesi mukoid fenotipe dönüşümde önemli rol oynar (23). Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdir. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşüm (genetik dönüşüm, faz değişimi) *algS* ve *algT* yardımıyla gerçekleşir (4). Fenotipik dönüşümün LPS yapısı üzerinde de etkileri olur; mukoid olmayan kökenlerde LPS uzun O zincirine sahiptir ve negatif yüklüdür (B form), mukoid kökenlerde ise O zinciri kısadır ve yapısındaki şekerlerin yerleşimi LPS'yi nötral hale getirir (A form). Aljinatın aşırı üretimi bakteriyi fagositozdan ve antibiyotiklerden koruduğu gibi konağın bakteriye karşı yanıtını da zayıflatır. Her ne kadar kistik fibroz hastalarındaki biyofilm yapısında yer aldığı kabul edilse de yakın tarihli çalışmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için şart olmadığı gösterilmiştir (24).

### 2.3.2.2. HÜCRE DIŞINA SALGILANAN VİRÜLANS FAKTÖRLERİ:

**ELASTAZ:** Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA bir serin metalloproteinazdır ve *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan pentaglisin-peptidoglikan köprülerini yıkar. LasA proteaz, elastini yıkamaz ancak LasB elastazın elastolitik aktivitesini artırır. LasB 33 kDa ağırlığında bir çinko metalloproteinazdır, LasA proteazın yıprattığı elastini parçalar. LasB elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır (*P. aeruginosa* alkali proteazının yaklaşık 10 katı). Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar (4). Damar duvar yapısında da bol miktarda elastin bulunduğundan, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur. IgG'yi, fibrini, kollajeni, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalar. Ayrıca solunum yolu epitellerindeki sıkı-bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar (4). Elastaz IL-8 üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki gösterir.

Elastaz sentezi *las* QS sistemi ile düzenlenmektedir; *lasR* geni LasB elastazın yapısal geni olan *lasB*'nin transkripsiyonu için düzenleyici rol oynar (6).

**ALKALİ PROTEAZ:** *P. aeruginosa*'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. 49 kDa ağırlığındaki enzim *apr* geni tarafından kodlanır, enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir (25).

Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kornea enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (26).

**PİYOSİYANİN:** *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir. Öncü molekülü olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenirken *phzABCDEFG* operonu ve *phzH*, *phzM*, *phzS* genleri görev alır (27). *P. aeruginosa* enfeksiyonları birçok virülans faktörünü içeren çok etkenli süreçler olduğu için akciğer enfeksiyonlarında tek başına piyosiyaninin etkilerinin saptanabilmesi için saflaştırılmış piyosiyanin ile *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda, piyosiyaninin hücre solunumunu inhibe ettiği, silyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır. Piyosiyanin ayrıca  $\alpha$ 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur. Piyosiyanin ve ara metaboliti fenazin-1-karboksilik asit RANTES ve IL-8 seviyelerini değiştirerek konak bağışıklık yanıtını etkiler (28). Hem doğrudan etkiyle katalaz aktivitesini engeller, hem de katalazı kodlayan genin transkripsiyonunu azaltır (29). MnSOD eklenmesiyle katalaz aktivitesinin geri kazanımı piyosiyaninin neden olduğu hasarda  $O_2^-$  radikallerinin rolünün büyük olduğunu gösterir. Piyosiyanin oksitlenmiş glutatyon seviyesini arttırır, nötrofillerde apoptozu uyarır (30).

Piyosiyanin sentezi QS tarafından düzenlenir, *lasR-lasI*, *rhlR-rhlI* mutasyonu olan kökenlerle yapılan çalışmalarda piyosiyanin üretiminin kaybolduğu gözlenmiştir (31).

**PİYOVERDİN:** Bir siderofordur. Çevredeki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynar (32, 33).

**PROTEAZ IV:** Yakın zamana kadar özellikle *P. aeruginosa* keratiti patogenezindeki rolüyle bilinirken, yakın tarihli çalışmalar proteaz IV'ün sürfaktan proteinleri A, D ve B'yi yıktığını ve akciğer enfeksiyonları patogenezinde de rol oynadığını göstermiştir (34, 35).

**FOSFOLİPAZ C:** Hemolitik aktiviteleriyle ayrılan iki tipte fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. Fosfolipaz C hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salınır. Ökaryotik hücre membranı bileşeni olan fosfolipidleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogenezinde rol oynar (36). Elastazda olduğu gibi patojenik etkisinin bir kısmını sürfaktan inaktivasyonuna borçludur. Ek olarak konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılar.

**RAMNOLİPİD:** Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (4).

**EKZOTOKSİN A (ExoA):** Enfeksiyon etkeni çoğu *P. aeruginosa* kökeni ekzotoksin A sentezler. Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan bir toksindir. ExoA *P. aeruginosa*'nın virülansında önemli rol oynar. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir (37). İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur (38). Konak yanıtını baskılayıcı özelliği de gösterilmiştir (39). ExoA üretimi olmayan mutant ile sokak tipi *P. aeruginosa* kökeninin karşılaştırıldığı bir çalışmada toksin üretmeyen kökenin 20 kat daha az virülan olduğu hayvan deneyi ile gösterilmiştir (5).

**TİP 3 SALGI SİSTEMİ:** *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Pseudomonas* türlerinde saptanmıştır. Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini ökaryot hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (5).

Ekzoenzim S (ExoS): İki aktif bölgesi [C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP) bölgesi] bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'nin patojenik etkilerinden esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozan ADP-riboziltransferaz aktivitesi sorumludur. Ek olarak C-terminal bölgesinin TLR2'ye, N-terminal bölgesinin de TLR4'e bağlandığı ve böylece konak bağışık yanıtını etkilediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. Akciğer enfeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açan ve bakterinin yayılmasında rol oynayan bir toksindir (40).

Ekzoenzim T (ExoT): ExoT de ExoS gibi ikili etki gösterir. *P. aeruginosa*'nın internalizasyonunda rol alan bir enzimdir. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiş olan bu enzim minör virülans faktörleri arasında yer alır (41).

Ekzoenzim Y (ExoY): ExoY bir adenilat siklazdır, konak sitozolüne verilince sitozolik cAMP'yi artırır. Bu artış pulmoner vasküler hücrelerde hücreler-arası boşluk oluşumunun artmasına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına neden olur (42).

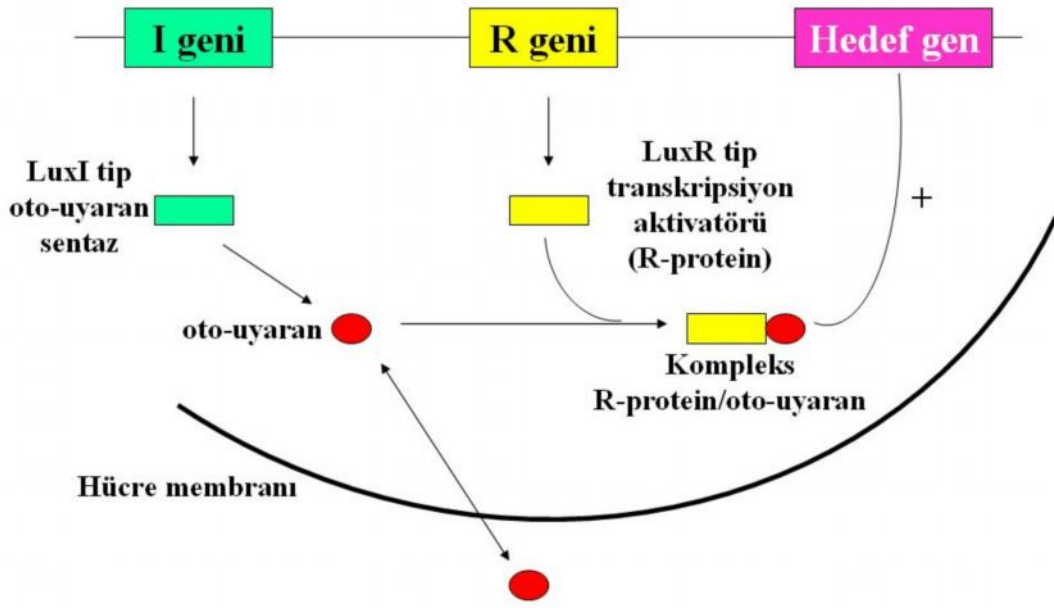
Ekzoenzim U (ExoU): ExoU tip 3 salgı sistemi ile konak hücresi içine salındığında fosfolipaz/lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar. ExoU majör virülans faktörü olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde tek başına ExoU salgılanmasının sepsise ilerleyen akciğer hasarına yol açtığı gösterilmiştir (43).

## 2.4. QUORUM SENSING VE *P. AERUGINOSA* PATOGENEZİNDEKİ ÖNEMİ

*P. aeruginosa*'da birçok hücre dışı virülans faktörünün üretiminin kontrolü, bakteri hücre yoğunluğunu izleyen ve bakteriler arasında iletişime olanak sağlayan bir mekanizma ile gerçekleştirilir. Bakteriler çevre koşullarını algılayabilir ve bu bilgiyi işleyerek uygun şekilde cevap verebilir. Hücreler arası iletişim, ya da QS olarak adlandırılan bu mekanizma birçok gram negatif ve gram pozitif bakteride tanımlanmıştır (44, 45).

Tanımlanmış ilk QS sistemi bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'nin biyoışmasını hücre yoğunluğuna bağımlı bir şekilde kontrol eden *lux* sistemidir. Gram pozitif bakterilerde QS sistemlerinin sinyal molekülleri peptid yapıda feromonlar iken, gram negatif bakterilerde oto-uyaran adı verilen küçük moleküllerdir. Oto-uyaranlar LuxI-tipinde oto-uyaran sentaz ve LuxR-tipinde transkripsiyonel aktive edici protein (R-protein) tarafından sentezlenir (46). Gram negatif bakterilerde tanımlanmış çeşitli oto-uyaranlar açıl homoserin lakton (AHL) yapıdadır ve birbirlerinden açıl yan zincir uzunlukları ve içerikleriyle ayrılırlar.

Düşük hücre yoğunluğunda oto-uyaran bazal seviyelerde sentezlenerek bakteriyi çevreleyen ortama yayılır. Hücre yoğunluğu arttıkça, hücre içi oto-uyaran yoğunluğu da belirli bir eşik değere dek artar, kritik konsantrasyona ulaşıldığında, oto-uyaran kendi özgül R-proteinine bağlanır. R-protein oto-uyaranı olmadığı sürece etkin değildir, R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül DNA dizilerine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (Şekil 1).



**Şekil 1.** *P. aeruginosa*'da Quorum Sensing sisteminin düzenlenmesi (şeklin çiziminde ve açıklamasında 6 no'lu kaynaktan yararlanılmıştır).

QS sistemi iki genden meydana gelir; I geni oto-uyaran sentaz enzimini, R geni transkripsiyonel aktive edici proteini (R-protein) kodlar. Oto-uyaran sentaz, hücre membranını iki yönlü geçebilen oto-uyaran molekülünün sentezinden sorumludur. Artan bakteri hücreleri yoğunluğu ile hücre içindeki oto-uyaran konsantrasyonu eşik değere ulaşır ve oto-uyaran transkripsiyonel aktivatöre bağlanır. R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül hedef genlerin ifadesini uyarır.

*P. aeruginosa*'da tanımlanmış iki ana QS sistemi vardır; birbirleriyle hiyerarşik ilişkileri olan bu sistemler *las* ve *rhl* sistemleridir.

**las QS Sistemi:** *P. aeruginosa*'da tanımlanan ilk QS sistemi ile LasB elastaz ifadesini düzenleyen sistem aydınlatıldığı için *las* QS sistemi olarak adlandırılmıştır. Sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentaz geni olan *lasI*, sentaz geninin ürünü N-(3-oksododekanoyl)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (47). Las sistemi *lasB* ifadesini düzenler ve diğer hücre dışı virülans faktörlerinden LasA elastaz ve ekzotoksin A sentezi için gereklidir. Las sistemi sinyal

molekölü olan 3-okso-C12-HSL'nin immunomodölatör olduğu ve konak yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (48).

***rhl* QS Sistemi:** Ramnolipid sentezini kontrol ettiği için *rhl* adını alan bu ikinci QS sisteminde oto-uyaran sentaz geni *rhlI*, sinyal molekölü olan N-bütiril-L-homoserin lakton (C4-HSL) ve transkripsiyonel aktive edici proteinini kodlayan *rhlR* geni rol alır (49). Bu sistem ramnolipid sentezi için gerekli bir enzim olan ramnoziltransferazı kodlayan *rhlAB* operonunun ifadesini düzenler. Sistem ayrıca LasB elastaz, LasA proteaz, piyosianin, siyanür ve alkali proteaz üretimleri için de gereklidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *las* ve *rhl* sistemlerinin etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Her iki sistem de hayli özgüdür; sinyal molekülleri diğer sistemin düzenleyici proteinini uyaramaz (3-okso-C12-HSL RhIR'yi aktive edemez, C4-HSL LasR'yi aktive edemez) (50). R-protein/oto-uyaran komplekslerinin belli başlatıcı (promoter) bölgeleri tercih ettiği de gösterilmiştir; LasR/3-okso-C12-HSL kompleksi *lasB*'yi *rhlA*'ya tercih ederken, RhIR/C4-HSL kompleksi *rhlA*'yı *lasB*'ye tercih eder.

Sistemler birbirinden bağımsız değildir. LasR/3-okso-C12-HSL kompleksi *rhlR* ifadesini uyardığı için *las* sistemi hiyerarşik olarak *rhl* sisteminin üzerinde yer alır (51). Ayrıca 3-okso-C12-HSL RhIR'ye bağlanabilir ve C4-HSL'nin transkripsiyonel aktive edici proteinine bağlanmasını engelleyebilir (51). Böylece *las* sistemi *rhl* sistemini hem transkripsiyonel hem de translasyon sonrası aşamalarda kontrol eder (Şekil 2).



(ekzopolisakkarit ile çevrili mikrokoloniler) içerisinde ürerler. Biyofilm bakteriyi fagositozdan ve komplemanın etkilerinden koruduğu ve biyofilm içerisindeki bakteriler antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli oldukları için, biyofilm üretimi bakterinin konaktaki sürekliliğinde kritik rol oynar. Biyofilm içindeki bakterilerin üreme hızlarının planktonik hücrelere kıyasla daha yavaş olması, biyofilmin antibiyotiklerin bakteriyeye ulaşmasını engellemesi gibi faktörler sayesinde, biyofilm içerisindeki bakteriler antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Biyofilmin sıkı yapısı yardımıyla bakteriler arasında genetik alışveriş kolaylıkla gerçekleşebildiğinden bakteriler direnç belirteçlerini kolaylıkla paylaşabilirler.

Las QS sisteminin *P. aeruginosa* biyofilminin farklılaşmasında rol oynadığı belirlenmiştir (53). Yapılan bir çalışmada 3-okso-C12-HSL üretimi olmayan mutant kökenin farklı yapıda biyofilm oluşturduğu ve oluşan biyofilmin sodyum dodesil sülfatın (SDS) düşük konsantrasyonlarına duyarlı olduğu gösterilmiş, buna karşın besiyerine 3-okso-C12-HSL eklendiğinde farklılaşmış ve SDS'ye dirençli biyofilmin oluştuğu gözlenmiştir (53).

## **2.6. *P. AERUGINOSA*'DA ANTİBİYOTİK DİRENCİ**

*P. aeruginosa*'nın tehlikeli bir patojen olarak kabul edilmesinin önemli bir sebebi doğal olarak birçok antibiyotiğe direnç göstermesidir. Sadece kısıtlı sayıda antibiyotiğin bakteriyeye etkisi vardır ama bu güçlü antibiyotiklere karşı dahi artan oranlarda direnç bildirilmektedir.

Hastanede yatan hastaların tedavisinde büyük zorluklar çekilse de, hemen hepsi tedavi edilemeyecek kadar dirençli hale gelmiş kökenlerle kolonize kistik fibroz hastalarında gelişen enfeksiyonlar durumu daha dramatik hale getirmektedir.

Antibiyotiklere direnç problemi nedeniyle *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere direnç mekanizmalarını inceleyen birçok çalışma yapılmıştır.

Bakterinin antibiyotiklere direncinden, ürettiği beta laktamazlar (GSBL enzimleri, AmpC, Oxa, Per, Imp, Vim, Ser gibi), pompa sistemleri, OprD mutasyonu, aminoglikozid modifiye edici enzimler sorumludur. Antibiyotikler ve bakteri arasında ilk etkileşim dış membranda gerçekleşir. Bazı antibiyotikler periplazmik aralığa geçebilmek için özgül porinler kullanırlar. Örneğin imipenem OprD porininden geçerek periplazmik aralığa ulaşır. OprD'nin kaybına yol açan mutasyon imipenem direncine neden olur (4).

Florokinolonlar, aminoglikozidler gibi bazı antibiyotikler ise dış membranı porin kullanmadan geçerler, her ikisi de ya negatif yüklü LPS'ye bağlanırlar, ya da dış membran üzerinde LPS'yi sabitleyen iki değerlikli katyonları bağlarlar. Her iki durumda da dış membran dayanıklılığını yitirir ve antibiyotikler sitoplazmik membrana, buradan da sitoplazma içerisindeki hedef moleküllere ulaşabilirler. Örneğin florokinolonlar için DNA giraz, aminoglikozidler için ribozom sitoplazmada bulunan hedef moleküllerdir.

Kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde bulunan kökenler mukoid fenotipe dönüşürken, LPS de negatif yüklü formdan (B form), nötral forma (A form) dönüşür. Dönüşüm bakterinin florokinolon ve aminoglikozidlere karşı duyarlılığını azaltır (4).

## **2.7. SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA *P. AERUGINOSA*'NİN YERİ**

Solunum yolları *P. aeruginosa* tarafından en sık enfekte edilen vücut bölgesidir. Ventilatör ilişkili pnömoni etkenlerinin sıralandığı listelerde de *P. aeruginosa* birinci veya ikinci sırada bulunmaktadır.

Geçmişte *P. aeruginosa* alt solunum yolu enfeksiyonları febril nötropeni hastalarında sık gözlenirken, günümüzde bu tür enfeksiyonların sıklığı oldukça azalmıştır. Son yıllarda, altta yatan herhangi bir akciğer patolojisi olmayan bireylerde dahi toplum kaynaklı *P. aeruginosa* pnömonileri bildirilmekte olup bu oran %5'e ulaşmıştır (54).

*P. aeruginosa* pnömonilerinde ateş, titreme, öksürük gibi klinik bulgular gözlenir. Akciğer grafisinde nodüler infiltrasyonlar içeren, çift taraflı diffüz bronkopnömoni görüntüsüyle *Staphylococcus aureus* pnömonisine benzerlik gösteren nekrotizan tipte pnömoniye yol açar. Olguların çoğu hastanede yatan, antibiyotik kullanan hastalardır. Tanıda bronkoalveolar lavaj veya korunmuş fırça örneği gibi invazif yöntemlerle örnekleme ve kantitatif ekim yapılması, üst solunum yoluna kolonize bakterilerle örneğin kontaminasyonunu engellemesi açısından tercih edilir (1).

*Pseudomonas aeruginosa* pnömonisinin tedavisinde antibiyotiklerin yanısıra, akciğerdeki sekresyonun uzaklaştırılması ve gerektiğinde solunum desteği yer almaktadır. Antibiyotik tedavisi genellikle birden fazla antibiyotiğin birlikte uygulanması ile gerçekleştirilir. Aminoglikozidlerin pnömoni tedavisinde tek başına kullanılması yüksek oranda başarısızlıkla sonuçlanır. Bunun sebebi olarak aminoglikozidlerin hava yollarında yüksek konsantrasyonlara ulaşamaması, akciğerin asidik pH değerlerinde aminoglikozidlerin inaktive olması, antibiyotiğin mukusa bağlanması sayılabilir (55). Sayılan bu sebeplerle aminoglikozidler (amikasin, gentamisin, tobramisin) bir başka antibiyotikle birlikte kullanılır. Seftazidim, sefoperazon, sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinler, piperasilin( +/- tazobaktam) gibi anti-psödomonal penisilinler, karbapenemler (imipenem, meropenem), aztreonam ve florokinolonlar sıklıkla tedaviye eklenen antibiyotiklerdir.

Tedavi genellikle 1 - 2 hafta sürdürülür, oral kullanımı olan florokinolonlar dışında diğer seçenekler parenteral uygulanan antibiyotiklerdir ve tedavi genellikle ilaçların yüksek dozlarının, sık aralıklarla uygulanmasını gerektirir.

Kullanılan antibiyotiklerin dirençli *P. aeruginosa* kökenlerinin seçimine yol açması sonucunda tüm dünyada çoklu dirençli kökenler gelişmiştir (56-59).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER:

##### 3.1.1. Standart kökenler:

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 (sokak tipi-wild type)

*Pseudomonas aeruginosa* PAO-JP2 ( $\Delta lasI$ ,  $\Delta rhII$  mutanı)

*Pseudomonas aeruginosa* PAO-JP3 ( $\Delta lasR$ ,  $\Delta rhIR$  mutanı)

*P. aeruginosa* PAO-1, PAO-JP2, PAO-JP3 kökenleri *Pseudomonas* Genetik Stok Merkezi'nden (<http://www.pseudomonas.med.ecu.edu>) temin edilmiş ve kontrol kökenleri olarak kullanılmıştır (50).

##### 3.1.2. Besiyerleri:

1. MacConkey Agar (bioMérieux)
2. Luria Bertani Sıvı Besiyeri (Difco)
3. Mueller-Hinton Agar (Oxoid)
4. Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri (Oxoid)
5. Stok besiyeri (Cryobank, Mast Diagnostics)
6. Gliserol Alanin Minimal Besiyeri: 1 litre distile suya 10 ml gliserol, 6 gr. L-alanin, 2 gr.  $MgSO_4$ , 0,1 gr.  $K_2HPO_4$ , 0,018 gr.  $FeSO_4$  eklenmiş, karışım otoklavlanarak sterilize edilmiştir (62).

### **3.1.3. Kimyasal maddeler:**

1. Elastin Kongo Kırmızısı (Sigma)
2. Hide Remazol Brilliant Blue (Sigma)
3. Kristal Viyole (Merck)
4. Tris-HCl (Sigma)
5. CaCl<sub>2</sub> (Merck)
6. Saf Etanol (Merck)
7. Kloroform (Merck)
8. Gliserol (Riedel-de Haën)
9. L-alanin (Merck)
10. MgSO<sub>4</sub> (Merck)
11. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
12. FeSO<sub>4</sub> (Merck)
13. HCl (Merck)

### **3.1.4. Antibiyotik diskleri:**

1. Amikasin (30 µg) (Oxoid)
2. Gentamisin (10 µg) (Oxoid)
3. Tobramisin (10 µg) (Oxoid)
4. Seftazidim (30 µg) (Oxoid)
5. Sefepim (30 µg) (Oxoid)
6. İmipenem (10 µg) (Oxoid)
7. Meropenem (10 µg) (Oxoid)
8. Siprofloksasin (5 µg) (Oxoid)
9. Ofloksasin (5 µg) (Oxoid)
10. Piperasilin (100 µg) (Oxoid)
11. Piperasilin/Tazobaktam (100/10 µg) (Oxoid)

### **3.1.5. PCR malzemeleri:**

1. DNA izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit – Roche)
2. Lizozim (Sigma)
3. Proteinaz K (Sigma)
4. Oligonükleotid primerler (Fermentas)
5. 2X PCR Master karışımı (Fermentas)
6. Agaroz (Prona)
7. Beyaz pipet ucu, DNaz ve RNaz içermeyen (USA-Scientific)
8. Sarı ve mavi pipet ucu, DNaz ve RNaz içermeyen (Axygen)
9. PCR tüpü, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen, 0.2 ml (Axygen)
10. Mikrotüp, DNaz, RNaz ve pirojen içermeyen, 1.5 ml (Axygen)
11. Lambda DNA (Fermentas)
12. Trizma Base (Sigma)
13. EDTA (Sigma)
14. Etidyum bromür (Merck)

### **3.1.6. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri:**

1. Manyetik karıştırıcı (Yellow Line)
2. Çalkalayıcılı etüv (Lab-Line Orbit Environ-Shaker)
3. Kaba terazi (Scaltec)
4. Hassas terazi (Sartorius)
5. Etüv (Memmert)
6. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal)
7. Buzdolabı (Arçelik)
8. Derin Dondurucu (Ilshin)
9. pH Metre (WTW Wissenschaftlich)
10. Otoklav (HV-85 Hirayama)
11. Pastör Fırını (Elektro-Mag)
12. Cam petri kutusu (MedLab)

13. Cam pipetler (1, 2, 5 ml ölçekli) (MedLab)
14. Cam deney tüpleri (12x75 mm ve 16x100 mm) (MedLab)
15. Otomatik pipetler (10, 20, 50, 200, 1000 µl) (Finnpipette, Pipetman)
16. Polistiren 96 kuyucuklu plak (TPP)
17. ELISA plak okuyucu (Labsystems Multiskan MS)
18. UV Lamba (Vilbert Lourmant)
19. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (Biometra)
20. Vorteks karıştırıcı (Yellow Line)
21. Termal döngü cihazı (Techne)
22. Mikrodalga Fırın (Beko)

## 3.2. YÖNTEMLER:

### 3.2.1. ÇALIŞMA KÖKENLERİ:

Çalışmamızda, 2005 ve 2006 yıllarında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na alt solunum sistemi enfeksiyonu ön tanısıyla gönderilen klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri (n: 100) kullanılmıştır. Çalışmada hasta kaynaklı kökenler kullanılması sebebiyle çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirilmiştir (MAR.YÇ.2008.0023). Kökenlerin tanımlama işlemleri Phoenix (Becton Dickinson) veya Vitek2 (bioMérieux) otomatize sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Kökenlere ait hasta bilgileri (hasta yaşı ve cinsiyeti, örneği gönderen birim, örneğin alınış tarihi, hastanın muayene notları ve epikrizi gibi bazı bilgiler hastane bilgisayar sistemi kullanılarak elde edilmiştir (CorTTex Entegre Hastane Bilgi Yönetim Sistemi, Sürüm 4.4.19, Tepe Teknolojik Servisler A.Ş.).

Kökenler cam boncuklar içeren tüpler (Cryobank) içerisinde, -20°C'de saklanmıştır. Virülans faktör üretimini (elastaz, alkali proteaz, biyofilm) saptamak için bakteri içeren cam boncuklar MacConkey agara pasajlanmış, inkübasyon sonrası tek bir koloni alınarak 5 ml Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve 35°C'de 24 saat çalkalayıcılı etüvde inkübe edilmiştir.

### 3.2.2. ELASTAZ ÜRETİMİNİN SAPTANMASI:

Yarı nicel olarak elastaz üretiminin saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonları soğutmalı santrifüjde çevrilerek, elde edilen süpernatantlardan 0,5 ml, 1 ml deney karışımı (30 mM Tris ve 10 mg elastin kongo kırmızısı, pH: 7,2) içeren tüplere eklenmiş ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Takiben tüpler 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve her bir köken için 2'şer kuyucuğa 200 µl süpernatant koyularak absorbans değerleri 495 nm'de optik okuyucu ile ölçülmüştür. Her köken için 2 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha tekrarlanmıştır (60). Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla elastaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değeri 0,219 olarak belirlenmiş, 495 nm'de absorbans değeri >0,219 saptanan kökenler elastaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanılmıştır (Şekil 3).

#### Şekil 3. Elastaz üretiminin mikropakta saptanması



A1-2: *P. aeruginosa* PAO1 kökeni (pozitif kontrol), A5-6: (negatif kontrol),  
A3-4, A7-12: klinik kökenler

### 3.2.3. ALKALİ PROTEAZ ÜRETİMİNİN SAPTANMASI:

Yarı nicel olarak alkali proteaz üretiminin saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1:100 oranında sulandırılmaları yapılmış ve bu sulandırılardan 0,5 ml alınarak tekrar 5 ml LB besiyerine ekilmiş ve çalkalayıcı etüvde 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Santrifüj (3000 x g'de 20 dakika) sonrası elde edilen süpernatantlardan 500 µl, 1,5 ml deney karışımı [20 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> tampon çözeltisinden (pH 8) 1,5 ml ve 50 mg Hide Remazol Brilliant Blue] içeren tüplere eklenip 35°C'de 1 saat çalkalayıcı etüvde inkübe edilmiştir. Takiben tüpler 4000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve her bir köken için 2'şer kuyucuğa 200 µl süpernatant koyularak absorban değerleri 595 nm'de optik okuyucu ile ölçülmüştür (26). Her köken için 2 kuyucuğun absorban değerlerinin ortalaması alınmış ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha tekrarlanmıştır. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla, alkali proteaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değeri 0,241 olarak belirlenmiş, 595 nm'de absorban değeri >0,241 saptanan kökenler alkali proteaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanılmıştır (Şekil 4).

#### Şekil 4. Alkali proteaz üretiminin mikropakta saptanması



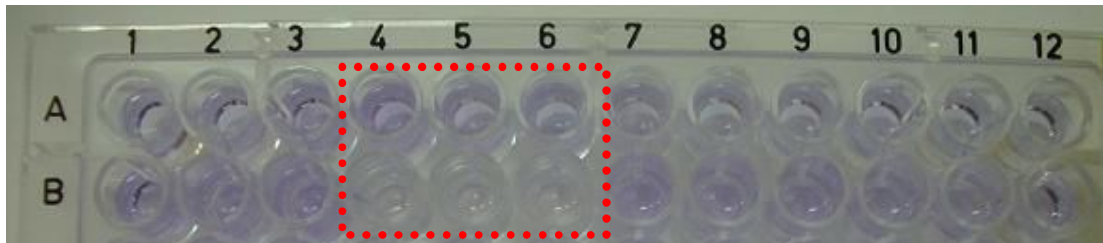
A1-2: PAO1 kökeni (pozitif kontrol), A5-6: (negatif kontrol),

A3-4, A7-12: klinik kökenler

### 3.2.4. BİYOFİLM ÜRETİMİNİN SAPTANMASI:

Yarı nicel olarak biyofilm üretiminin saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için hazırlanan bakteri süspansiyonlarının taze LB sıvı besiyeri içerisinde 1:100 oranında sulandırılmaları yapılmış ve bu sulandırmalardan 100'er µl 3 kuyucuğa dağıtılmıştır. 8 saat 35°C'de inkübasyon sonrasında plaklar üçer kez distile su ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa %0.1'lik kristal viyole çözeltisinden 10'ar µl eklenerek plaklar oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından plaklar tekrar 3'er kez distile su ile yıkanarak serbest boya çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Oluşan biyofilmin kantitasyonu amacıyla kuyucuklara 200 µl %95'lik etanol eklenerek biyofilm ile bileşik oluşturan kristal viyolenin çözülmesi gerçekleştirilmiştir. Beş dakika bekledikten sonra absorbans değerleri 550 nm'de optik okuyucu ile ölçülmüştür (61). Her köken için 3 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha tekrarlanmıştır. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla, biyofilm üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0,076 olarak belirlenmiş, 550 nm'de absorbans değeri >0,076 saptanan kökenler biyofilm üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanılmıştır (Şekil 5).

#### Şekil 5. Biyofilm üretiminin mikropakta saptanması



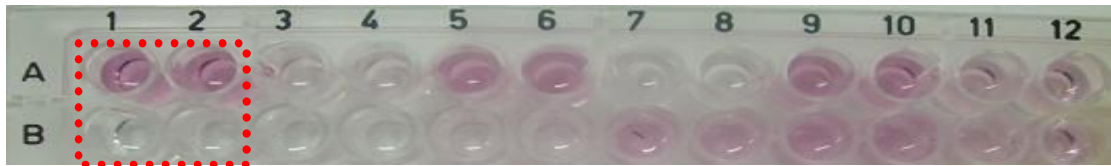
A4-6: *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni (pozitif kontrol), B4-6: (negatif kontrol)

A1-3, A7-12, B1-3, B7-12 klinik kökenler

### 3.2.5. PİYOSİYANİN ÜRETİMİNİN SAPTANMASI:

Yarı nicel olarak piyosiyanın üretimini saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni için stok besiyerinden MacConkey agara pasaj sonrası elde edilen bir izole koloni 7 ml gliserol alanin minimal besiyeri içeren tüplere ekilerek 37°C'de 24 saat çalkalayıcılı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda soğutmalı santrifüjde çevrilerek (3000 x g'de 20 dakika) elde edilen süpernatantlardan 5 ml yeni bir tübe aktarılmış ve tüplere 3 ml kloroform eklenerek süpernatant içerisindeki piyosiyanın kloroforma ayrışması sağlanmıştır. Tübün alt kısmında biriken kloroform tabaka yeni bir tüpe pipetlenmiş ve üzerine 1 ml 0.2 M HCl eklenmiştir. Kloroform tabakadan tekrar HCl içerisine ayrılan piyosiyanın kantitasyonu amacıyla tüpler santrifüj edilmiştir (3000 x g'de 10 dak). Her bir köken için tübün üst kısmında kalan HCl tabakasından 2'şer kuyucuğa 200 µl süpernatant koyularak absorbans değerleri 520 nm'de optik okuyucu ile ölçülmüştür (62). Her köken için 2 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu işlem 2 ayrı çalışmada daha tekrarlanmıştır. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla, piyosiyanın üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 kökenleri ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değer 0,040 olarak belirlenmiş, 520 nm'de absorbans değeri >0,040 saptanan kökenler piyosiyanın üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni, negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanılmıştır (Şekil 6).

#### Şekil 6. Piyosiyanın üretimini mikropakta saptanması



A1-2 *P. aeruginosa* PAO-1 kökeni (pozitif kontrol), B1-2 (negatif kontrol)  
A3-12, B3-B12 klinik kökenler

### 3.2.6. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ:

*Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin, tobramisin), sefalosporinlere (seftazidim, sefepim), florokinolonlara (siprofloksasin, ofloksasin), karbapenemlere (imipenem, meropenem) ve anti-psödomonal penisilinlere (piperasilin ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonu olan piperasilin/tazobaktam) duyarlılıkları CLSI (eski adıyla NCCLS) kriterlerine göre belirlenmiş, *P. aeruginosa* ATCC 27853 kökeni kontrol olarak kullanılmıştır (63, 64).

### 3.2.7. QUORUM SENSING GENLERİNİN PCR İLE SAPTANMASI:

Fenotipik testlerle araştırılan her dört virülans faktörü için de absorbans değerleri ortalama absorbans değerlerinin altında kalan kökenlerde (n:16) QS genlerinin varlığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bakteri DNA'sı ticari bir kit ile ayrıştırılmıştır (High Pure PCR Template Kit, ROCHE). PCR, içinde 25 µl PCR master karışım (Fermentas), 1.5 µl forward primer (100 pmol ), 1.5 µl reverse primer (100 pmol ), 3 µl bakteri DNA' sı ve 19 µl steril distile su bulunan 50 µl reaksiyon karışımı içinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 94°C'de 7 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından, 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye, 72°C'de 2 dakikadan oluşan 34 döngü ve son uzama için 72°C'de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin incelenmesi için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Aşağıda çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerinin nükleotid dizilimleri verilmiştir (62).

*las* QS sisteminin araştırılmasında kullanılan primerler.;

*lasI* forward: 5'-ATGATCGTACAAATTGGTCGGC-3'

reverse: 5'-GTCATGAAACCGCCAGTCG-3'

*lasR* forward: 5'-ATGGCCTTGGTTGACGGTT-3'.

reverse: 5'-GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA-3'

*rhl* QS sisteminin araştırılmasında kullanılan primerler:

*rhlI* forward: 5'-CTTGGTCATGATCGAATTGCTC-3'

reverse: 5'-ACGGCTGACGACCTCACAC-3'

*rhlR* forward: 5'-CAATGAGGAATGACGGAGGC-3'

reverse: 5'-GCTTCAGATGAGGCCAGC-3'

### **3.2.8. KÖKENLERİN ERIC (ENTEROBACTERIAL REPETITIVE INTERGENIC CONSENSUS) PCR İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ:**

Fenotipik testlerle araştırılan her dört virülans faktörü için de absorbans değerleri ortalama absorbans değerlerinin altında kalan kökenler (n:16) arasındaki klonal ilişki ERIC PCR yöntemiyle araştırılmıştır. PCR reaksiyonları, 3 µl (50 ng) bakteri DNA'sı, 2 µl ERIC2 primeri (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), 25 µl PCR master karışımı (Fermentas) ve 20 µl steril su içeren reaksiyon karışımları içinde; 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından, 94°C'de 1 dakika, 40°C'de 1 dakika, 74°C'de 4 dakikadan oluşan 35 döngü ve son uzama için 74°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin incelenmesi için %0,5'lik agaroz jel kullanılmıştır (65).

### **3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Çalışmanın veri analizinde SPSS (Statistical Package for Social Science) istatistiksel yazılım programı kullanılmıştır. Virülans faktörü üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Pearson ki-kare ve Fischer exact test kullanılmış,  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Alt solunum yolu enfeksiyonu ön tanısıyla gönderilen klinik örneklerden izole edilen toplam 100 *P. aeruginosa* kökeninin örnek türlerine ve örneği gönderen birime göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1. Örnek türlerine ve örneği gönderen birime göre *P. aeruginosa* kökenlerinin dağılımı**

Örnek türü	Servis	Poliklinik	Toplam
Balgam	22	31	53
Derin Trakeal Aspirasyon	35	2	37
Bronkoalveolar Lavaj	8	2	10
Toplam	65*	35	100

\* 65 servis hastasının 29'unu (%44,6) yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar oluşturmaktadır.

Klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve kontrol kökenlerinin her bir virülans faktörü için absorbans değerleri ile ilgili veriler Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2. Klinik *P. aeruginosa* kökenleri (n: 100) ve kontrol kökenlerine ait absorbans değerleri**

Virülans Faktörü	Absorbans değerleri				
	Klinik kökenler (n: 100)			Kontrol kökenleri	
	En düşük	En yüksek	Ortalama $\pm$ SD	PAO-1	PAO JP2-JP3
Elastaz	0,119	3,240	1,162 $\pm$ 1,045	2,557	0,195
Alkali Proteaz	0,141	2,919	1,473 $\pm$ 1,081	2,671	0,217
Biyofilm	0,051	0,194	0,119 $\pm$ 0,033	0,124	0,065
Piyosyanin	0,032	0,446	0,118 $\pm$ 0,094	0,185	0,035

SD: Standart sapma,

PAO-1: Pozitif kontrol kökeni

PAO JP2-JP3: Negatif kontrol kökenleri

Negatif kontrol kökenleri (*P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3) ile gerçekleştirilen testler sonucunda eşik değerler (cut-off) belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak klinik *P. aeruginosa* kökenlerinin (n: 100) virülans faktör üretimleri belirlenmiştir (Tablo 3). Klinik *P. aeruginosa* kökenlerinde incelenen virülans faktörlerinin yüksek oranda (%73-86) pozitif olduğu görülmektedir.

**Tablo 3. *P. aeruginosa* kökenlerinin (n: 100) virülans faktör üretimlerinin değerlendirilmesi**

Virülans faktörü	Eşik değerler	Klinik izolatlar (n: 100)	
		Negatif	Pozitif
Elastaz	0,219	24	76
Alkali Proteaz	0,241	27	73
Biyofilm	0,076	14	86
Piyosiyanin	0,040	25	75

*P. aeruginosa* kökenlerinin (n: 100) örnek cinsi, örneğin gönderildiği bölüm ve ürettikleri virülans faktörleri için belirlenen absorbans değerleri Tablo 4'de görülmektedir.

**Tablo 4. Klinik *P. aeruginosa* kökenlerinin (n: 100) ve kontrol kökenlerinin virülans faktörleri için absorbands değerleri ortalamaları**

Köken no	Materyal	Bölüm	Elastaz	Alkali Proteaz	Biyofilm	Piyosiyanın
1	BALGAM	PED GÖĞ HAST	1,640	2,716	0,102	0,304
2	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,294	0,448	0,162	0,082
3	BALGAM	GÖĞÜS HAST	0,244	1,675	0,158	0,272
4	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,161</b>	0,619	0,093	0,050
5	DTA	CERRAHİ YBÜ	2,783	1,716	0,115	0,294
6	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,168</b>	2,434	0,112	0,153
7	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,219</b>	0,325	0,156	<b>0,036</b>
8	BALGAM	DAHİLİ YBÜ	0,800	1,249	0,099	0,056
9	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,243	<b>0,199</b>	0,125	0,069
10	DTA	DAHİLİ YBÜ	0,250	<b>0,195</b>	0,139	0,191
11	DTA	DAHİLİ YBÜ	0,989	2,352	0,194	0,233
12	BALGAM	GÖĞÜS HAST	2,400	2,593	0,133	0,155
13	BALGAM	PED GÖĞ HAST	0,517	2,258	0,147	<b>0,039</b>
14	BAL	CERRAHİ YBÜ	<b>0,193</b>	<b>0,199</b>	0,176	<b>0,032</b>
15	ETA	PED GÖĞ HAST	2,202	2,604	0,113	0,122
16	DTA	DAHİLİ YBÜ	2,133	2,630	0,157	0,340
17	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,281	0,256	0,140	0,042
18	DTA	DAHİLİYE	1,479	2,207	0,094	<b>0,035</b>
19	BALGAM	DAHİLİ YBÜ	0,306	<b>0,203</b>	0,138	0,117
20	BALGAM	PEDİYATRİ	<b>0,196</b>	<b>0,207</b>	0,136	<b>0,033</b>
21	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,261	<b>0,210</b>	<b>0,075</b>	0,079
22	BAL	DAHİLİYE	2,211	2,527	0,161	0,242
23	BALGAM	PED GÖĞ HAST	2,343	2,223	0,127	0,249
24	DTA	CERRAHİ YBÜ	<b>0,192</b>	0,274	0,138	0,095
25	ETA	PEDİYATRİ	<b>0,182</b>	1,310	0,173	0,247
26	BALGAM	DAHİLİ YBÜ	2,062	1,414	0,150	0,199
27	BALGAM	GÖĞÜS HAST P	<b>0,162</b>	<b>0,148</b>	0,100	0,063
28	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,299	<b>0,206</b>	0,118	<b>0,035</b>
29	BALGAM	PEDİYATRİ	2,561	2,514	0,181	0,194
30	BALGAM	PED GÖĞ HAST	1,315	2,049	0,129	0,049
31	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,217</b>	0,280	<b>0,071</b>	<b>0,037</b>
32	BALGAM	DAHİLİYE	1,398	1,464	0,128	<b>0,037</b>
33	BALGAM	GÖĞÜS HAST	2,589	2,495	0,113	0,182
34	BALGAM	DAHİLİYE	2,739	2,555	0,116	0,140
35	BALGAM	GÖĞ CERRAHİSİ	0,337	<b>0,163</b>	0,113	<b>0,033</b>
36	DTA	PEDİYATRİ	0,291	0,445	0,136	0,121
37	DTA	ORTOPEDİ	2,017	2,639	0,123	0,176
38	BALGAM	PED GÖĞ HAST	1,122	2,076	0,109	<b>0,032</b>
39	BALGAM	PED GÖĞ HAST	<b>0,172</b>	0,286	<b>0,076</b>	<b>0,032</b>
40	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,142</b>	2,335	<b>0,053</b>	0,108
41	DTA	NÖROLOJİ	1,839	2,697	0,158	0,052
42	BALGAM	GÖĞÜS HAST	<b>0,146</b>	<b>0,152</b>	0,125	0,052
43	BALGAM	PEDİYATRİ	2,469	2,716	0,119	0,230
44	BALGAM	PED GÖĞ HAST	2,530	2,691	0,122	0,446
45	BALGAM	DAHİLİ YBÜ	0,707	0,281	<b>0,058</b>	<b>0,035</b>
46	BALGAM	PEDİYATRİ ACİL	3,181	2,778	0,133	0,381
47	BALGAM	GÖĞÜS HAST	0,290	0,993	<b>0,055</b>	0,050
48	BALGAM	PED GÖĞ HAST	2,116	2,627	<b>0,051</b>	<b>0,033</b>
49	BAL	GÖĞ CERRAHİSİ	2,323	2,581	0,133	0,069
50	BALGAM	DAHİLİYE	<b>0,188</b>	2,347	0,106	0,058

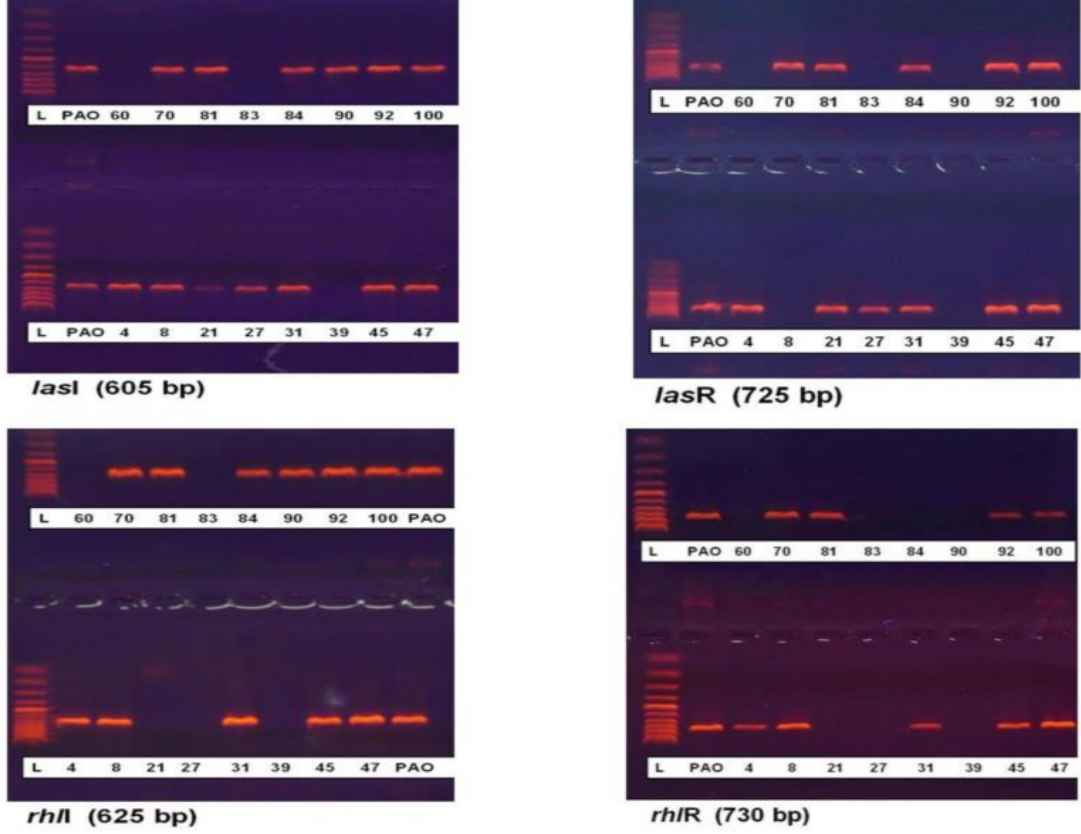
Tablo 4 (devam).

Köken no	Materyal	Bölüm	Elastaz	Alkali Proteaz	Biyofilm	Piyosiyenin
51	BALGAM	<i>PEDİYATRİ ACİL</i>	2,095	0,265	0,110	0,062
52	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	2,780	2,577	0,094	0,086
53	BALGAM	DAHİLİYE	2,806	2,661	0,104	0,086
54	DTA	DAHİLİ YBÜ	<b>0,160</b>	<b>0,238</b>	0,117	0,085
55	DTA	DAHİLİYE	1,087	1,963	0,100	0,066
56	ETA	<i>PED GÖĞ HAST</i>	1,118	2,147	0,141	0,152
57	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	2,841	2,382	0,135	0,193
58	BALGAM	ÜROLOJİ	1,471	2,919	0,111	<b>0,037</b>
59	ETA	PEDİYATRİ	0,355	0,360	0,084	0,389
60	BAL	<i>GÖĞÜS HAST</i>	<b>0,166</b>	<b>0,214</b>	<b>0,058</b>	<b>0,035</b>
61	BALGAM	<i>PED GÖĞ HAST</i>	0,567	2,532	0,113	0,106
62	BALGAM	PEDİYATRİ	2,027	2,844	0,150	0,085
63	ETA	PED CERRAHİ	2,745	2,790	0,100	0,149
64	BALGAM	DAHİLİYE	2,884	2,773	0,110	0,343
65	DTA	DAHİLİ YBÜ	1,966	2,268	0,132	0,119
66	BALGAM	ORTOPEDİ	2,386	2,648	0,156	0,065
67	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	<b>0,124</b>	2,470	0,095	0,129
68	DTA	DAHİLİYE	2,249	2,500	0,112	0,231
69	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	<b>0,213</b>	<b>0,148</b>	0,152	0,073
70	BALGAM	DAHİLİ YBÜ	0,242	<b>0,178</b>	<b>0,060</b>	<b>0,033</b>
71	BALGAM	<i>PED GÖĞ HAST</i>	2,112	2,158	0,099	0,161
72	ETA	PEDİYATRİ	2,768	1,995	0,129	0,046
73	BAL	<i>PED GÖĞ HAST</i>	3,240	2,578	0,133	0,066
74	DTA	DAHİLİ YBÜ	<b>0,183</b>	<b>0,141</b>	0,151	<b>0,037</b>
75	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	2,770	2,338	0,119	0,152
76	ETA	PEDİYATRİ	0,827	2,342	0,139	0,049
77	DTA	CERRAHİ YBÜ	0,229	<b>0,241</b>	0,165	0,065
78	DTA	CERRAHİ YBÜ	1,399	2,711	0,135	0,113
79	BAL	PEDİYATRİ ACİL	2,367	2,570	0,112	0,129
80	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	1,204	2,603	0,077	0,061
81	DTA	DAHİLİ YBÜ	<b>0,167</b>	<b>0,183</b>	<b>0,060</b>	<b>0,033</b>
82	DTA	NÖROLOJİ	<b>0,171</b>	<b>0,194</b>	0,138	0,100
83	BAL	CERRAHİ YBÜ	<b>0,155</b>	<b>0,205</b>	<b>0,054</b>	<b>0,032</b>
84	DTA	DAHİLİ YBÜ	0,314	<b>0,153</b>	0,101	<b>0,033</b>
85	BAL	GÖĞÜS CERRAHİ	0,298	0,366	0,146	0,171
86	DTA	DAHİLİ YBÜ	0,280	<b>0,217</b>	0,130	<b>0,033</b>
87	BALGAM	<i>PED GÖĞ HAST</i>	3,004	2,729	0,115	0,231
88	BALGAM	PEDİYATRİ	1,261	0,567	0,159	0,167
89	BALGAM	NÖROLOJİ	0,304	<b>0,184</b>	0,136	<b>0,032</b>
90	BALGAM	<i>PED GÖĞ HAST</i>	0,226	<b>0,158</b>	<b>0,061</b>	<b>0,034</b>
91	DTA	CERRAHİ YBÜ	<b>0,199</b>	<b>0,171</b>	0,134	0,239
92	BALGAM	DAHİLİYE	0,280	<b>0,209</b>	<b>0,055</b>	0,067
93	DTA	GENEL CERRAHİ	0,231	0,495	0,159	0,159
94	BAL	PEDİYATRİ	0,603	2,257	0,181	0,054
95	DTA	DAHİLİ YBÜ	0,526	1,835	<b>0,061</b>	0,041
96	DTA	CERRAHİ YBÜ	1,144	2,347	0,124	0,158
97	BALGAM	<i>GÖĞÜS HAST</i>	3,176	2,372	0,114	0,106
98	DTA	DAHİLİ YBÜ	<b>0,206</b>	<b>0,192</b>	0,124	<b>0,034</b>
99	BAL	PEDİYATRİ	<b>0,119</b>	1,148	0,104	0,178
100	BALGAM	DAHİLİYE	0,288	<b>0,235</b>	0,093	<b>0,034</b>
PAO-1	Pozitif kontrol kökeni		2,557	2,671	0,124	0,185
PAO-JP2	Negatif kontrol kökeni		0,201	0,222	0,066	0,036
PAO-JP3	Negatif kontrol kökeni		0,188	0,212	0,064	0,033

Poliklinik örnekleri italik, eşik değer altında bulunan absorbans değerleri koyu belirtilmiştir.

Göğüs Hast: Göğüs Hastalıkları, Ped Cer: Pediyatrik Cerrahi,  
Ped Göğ Hast: Pediyatrik Göğüs Hastalıkları, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

Her 4 virülans faktörü için absorbans değerleri ortalamasının altında kalan *P. aeruginosa* kökenlerinin (n:16) QS genleri PCR yöntemiyle araştırılmış (Şekil 7) ve sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir.



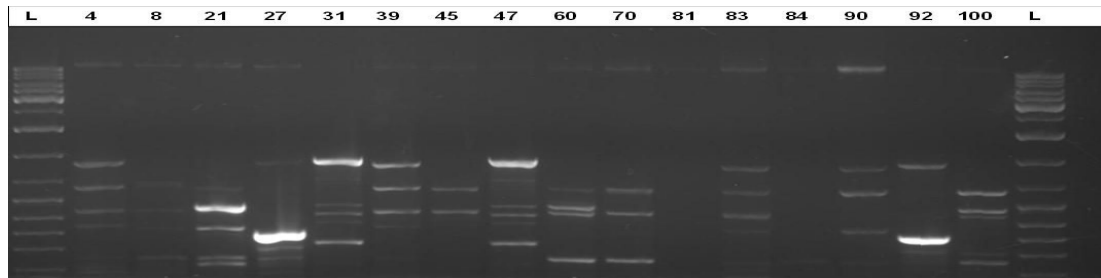
**Şekil 7. Kökenlerde *lasI* (sol-üst), *lasR* (sağ-üst), *rhlI* (sol-alt) ve *rhlR* (sağ-alt) genlerinin elektroforez (PCR) görüntüleri**  
L: DNA markörü, PAO: *P. aeruginosa* PAO-1 pozitif kontrol kökeni  
4-100: Klinik *P. aeruginosa* köken no'ları

**Tablo 5. PCR yöntemiyle QS genleri araştırılan kökenlere (n: 16) ait sonuçlar**

Köken No	Virülans Faktör Absorbans Değerleri				Quorum Sensing Genleri			
	Biyofilm	Elastaz	Alkali Proteaz	Piyosiyenin	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>
4	0,093	0,161	0,619	0,050	POZ	POZ	POZ	POZ
8	0,099	0,800	1,249	0,056	POZ	POZ	POZ	POZ
21	0,075	0,261	0,210	0,079	POZ	POZ	NEG	NEG
27	0,100	0,162	0,148	0,063	POZ	POZ	NEG	NEG
31	0,071	0,217	0,280	0,037	POZ	POZ	POZ	POZ
39	0,076	0,172	0,286	0,032	NEG	NEG	NEG	NEG
45	0,058	0,707	0,281	0,035	POZ	POZ	POZ	POZ
47	0,055	0,290	0,993	0,050	POZ	POZ	POZ	POZ
60	0,058	0,166	0,214	0,035	NEG	NEG	NEG	NEG
70	0,060	0,242	0,178	0,033	POZ	POZ	POZ	POZ
81	0,060	0,167	0,183	0,033	POZ	POZ	POZ	POZ
83	0,054	0,155	0,205	0,032	NEG	NEG	NEG	NEG
84	0,101	0,314	0,153	0,033	POZ	POZ	POZ	NEG
90	0,061	0,226	0,158	0,034	POZ	NEG	POZ	NEG
92	0,055	0,280	0,209	0,067	POZ	POZ	POZ	POZ
100	0,093	0,288	0,235	0,034	POZ	POZ	POZ	POZ
PAO-1	0,124	2,557	2,671	0,185	POZ	POZ	POZ	POZ
LB	0,054	0,183	0,191	0,036				

Bir veya daha fazla QS geni negatif bulunan kökenler kırmızı renkle belirtilmiştir.

Her 4 virülans faktörü için absorbans değerleri ortalamasının altında kalan *P. aeruginosa* kökenlerinin (n:16) arasında klonal ilişki ERIC-PCR yöntemiyle araştırılmış ancak bu yöntemle kökenler arasında klonal bir ilişki gösterilememiştir (Şekil 7).



**Şekil 8. ERIC PCR sonuçları**

L: DNA markörü, 4-100: Klinik *P. aeruginosa* köken no'ları

*P. aeruginosa* kökenlerinin aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin, tobramisin), sefalosporinlere (seftazidim, sefepim), florokinolonlara (siprofloksasin, ofloksasin), karbapenemlere (imipenem, meropenem) ve anti-psödomonal penisilinlere (piperasilin ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonu olan piperasilin/tazobaktam) duyarlılıkları ve servislere göre dağılımı Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6.** Antibiyotiklere duyarlı *P. aeruginosa* kökenlerinin servislere göre dağılımı

Antibiyotik	Poliklinik (n= 35) Sayı (%)	Diğer Servisler (n= 36) Sayı (%)	Yoğun Bakım (n= 29) Sayı (%)	Tüm Kökenler (n= 100) Sayı (%)
AK	26 (74,3)	26 (72,2)	18 (62,1)	70 (70)
GM	28 (80,0)	21 (58,3)	11 (37,9)	60 (60)
TOB	32 (91,4)	25 (69,4)	12 (41,4)	69 (69)
PRL	30 (85,7)	25 (69,4)	14 (48,3)	69 (69)
TZP	34 (97,1)	28 (77,8)	18 (62,1)	80 (80)
CAZ	31 (88,6)	26 (72,2)	21 (72,4)	78 (78)
FEP	30 (85,7)	24 (66,7)	18 (62,1)	72 (72)
IPM	32 (91,4)	24 (66,7)	10 (34,5)	66 (66)
MEM	32 (91,4)	27 (75,0)	18 (62,1)	77 (77)
CIP	31 (88,6)	24 (66,7)	13 (44,8)	68 (68)
OFL	25 (71,4)	19 (52,8)	11 (37,9)	55 (55)

AK : Amikasin, GM: Gentamisin, TOB: Tobramisin, PRL: Piperasilin, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, CAZ: Seftazidim, FEP : Sefepim, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, CIP: Siprofloksasin, OFL: Ofloksasin

Virülans faktörü üretimi ile antibiyotiklere duyarlılık arasındaki ilişki irdelendiğinde; elastaz üreten kökenlerin piperasilin ve seftazidime daha duyarlı oldukları; alkali proteaz üreten kökenlerin tobramisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, sefepim, imipenem ve siprofloksasine daha duyarlı oldukları, piyosiyenin üreten kökenlerin ise amikasin, tobramisin, seftazidim, siprofloksasin ve ofloksasine daha duyarlı oldukları saptanmıştır. Biyofilm üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. (Tablo 7).

**Tablo 7.** *P. aeruginosa* kökenlerinde virülans faktörü üretiminin antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisi

<b>Antibiyotik</b>	<b>Virülans Faktörleri (p değeri)*</b>		
	<b>Elastaz</b>	<b>Alkali proteaz</b>	<b>Piyosiyanin</b>
<b>Amikasin</b>			0,011
<b>Gentamisin</b>			
<b>Tobramisin</b>		0,003	0,013
<b>Piperasilin</b>	0,041	0,000	
<b>Piperasilin-tazobaktam</b>		0,001	
<b>Seftazidim</b>	0,048		0,023
<b>Sefepim</b>		0,002	
<b>İmipenem</b>		0,009	
<b>Meropenem</b>			
<b>Siprofloksasin</b>		0,003	0,001
<b>Ofloksasin</b>			0,000

\* Virülans faktörü üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasında anlamlı ilişki ( $p < 0.05$ ) saptanan durumlar için p değeri belirtilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Gram negatif bakterilere bağlı hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık rastlanan etkenlerinden biri olan *P. aeruginosa* özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış ya da kolaylaştırıcı bir faktörün bulunduğu hastalarda fırsatçı enfeksiyonlar oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* AIDS hastalarında bakteriyemi ile seyrettiğinde olguların yarısı kaybedilmektedir (66). Yanık hastaları *P. aeruginosa* enfeksiyonları için özellikle risk altındadır, yanık servislerinde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranları %60'a dek çıkabilmektedir (67). Solunum yolları *P. aeruginosa* tarafından en sık enfekte edilen vücut bölgesidir. *P. aeruginosa*'ya bağlı akut pnömoniler %30, mekanik solunum cihazı ilişkili pnömoniler ise %38 oranında ölümcül tablolara neden olabilir (68, 69). Kistik fibroz hastaları *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına çok yatkın olup, gelişen enfeksiyonlar hastanın yaşam kalitesini azalttığı gibi, sağkalım oranlarını da düşürmektedir (52).

*P. aeruginosa*'nın farklı vücut bölgelerinde ve bazen hayatı tehdit edebilen enfeksiyonlardan sorumlu olmasının temelinde çok fazla sayıda virülans faktörü üretmesi yatmaktadır (1). Hücre dışına salınan virülans faktörlerinin birçoğunun sentezi, bakteriler arasında haberleşmeye olanak veren, ortamdaki bakteri yoğunluğunun tetikleyici rol üstlendiği hücreler-arası iletişim (Quorum Sensing) sistemi aracılığıyla denetlenmektedir (70).

Bazı virülans faktörlerinin belirli vücut bölgelerinde gelişen enfeksiyonlarda daha belirgin rol oynadığını ortaya koyan çalışmalar *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezinin aydınlatılmasına önemli katkıda bulunmuştur. Woods ve ark. farklı klinik örneklerden (yanık bölgesi, yara, idrar, kan, KF hastası balgamı, akut pnömonili hasta balgam örneği) izole edilmiş *P. aeruginosa* kökenlerinin virülans faktörü üretimi açısından farklılıklarını araştırmışlardır. KF hastalarının balgamlarından izole edilen kökenlerde toplam proteaz üretim miktarının diğer klinik örneklere göre oldukça düşük, akut pnömonili hasta izolatlarının elastaz üretiminin ise diğer

izolatlara göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir (71). Aynı çalışmada kan ve idrar izolatlarında oldukça yüksek fosfolipaz C değerleri tespit edilmiştir. Kan izolatlarında saptanan yüksek toplam proteaz, fosfolipaz C ve ekzotoksin A seviyeleri, bu faktörlerin bakteriyemiden sorumlu faktörler olabileceği lehinde yorumlanmıştır. Rumbaugh ve ark. 3 farklı vücut bölgesinden (trakea, üriner sistem ve yara) izole edilen *P. aeruginosa* kökenlerindeki virülans faktörü seviyesinin (ekzotoksin A, ekzoenzim S ve elastaz) enfeksiyon türü ile olan ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında farklı bölgelerden izole edilen kökenlerin elastaz üretimi açısından fark göstermediklerini, buna karşın üriner sistem ve yara enfeksiyonu etkenlerinde ekzoenzim S üretiminin, yara enfeksiyonlarından izole edilen kökenlerde ekzotoksin A aktivitesinin belirgin olarak yüksek olduğunu saptamışlardır (72).

Elastaz üretiminin *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonları patogeneziindeki yeri açıkça ortaya konmuş olup solunum yolu örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının %73-95 oranında bu enzimi ürettiği gösterilmiştir (73-75). Çalışmamızda elastaz pozitifliği %76 olarak belirlenmiştir.

Alkali proteaz akut akciğer enfeksiyonlarının erken döneminde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin eritilmesinden ve enfeksiyonun ilerlemesinden sorumludur (25). Ayrıca alkali proteazın elastaz gibi silyalı solunum yolu epiteli üzerine yıkıcı özelliği olduğu gösterilmiştir (76). Buna rağmen solunum yolu enfeksiyonları patogeneziinde alkali proteazın rolü kısıtlıdır. Çalışmamızda alkali proteaz üretimi kökenlerin %73'ünde saptanmıştır. Çıragil ve ark. bu oranı KF hasta izolatlarında %52, KF dışı hasta izolatlarında %61 olarak saptamışlardır (75).

*P. aeruginosa*'ya bağlı akut ve kronik akciğer enfeksiyonlarında piyosiyanın solunum yolu epitel hücrelerinde glutasyonu okside edip, katalazı inaktive ederek oksidatif hasara yol açmaktadır (27,77). Çalışmamızda kökenlerin %75'inde piyosiyanın üretimi saptanmıştır.

KF hastalarındaki akciğer enfeksiyonları gibi kronik enfeksiyonlarda ve kateter enfeksiyonlarında bakteri biyofilm oluşturarak belirli vücut bölgelerinde sınırlı kalmakta ve enfeksiyon süregenleşmektedir. Biyofilm gelişim aşamaları; başlangıç tutunması, olgun biyofilmin gelişmesi ve biyofilmden kopma olarak özetlenebilir (78). Olgun biyofilm, sıvı dolu kanallarla birbirinden ayrılan büyük mikrokoloniler yapısındadır. Biyofilm içerisinde *P. aeruginosa* polisakkaridlerden, nükleik asit ve proteinlerden meydana gelen EPS (extracellular polymeric substance - hücre dışı polimerik madde) ile çevrili mikrokoloniler oluşturur. Son basamakta olgun biyofilmden ayrılan bakteri topluluğu bir başka bölgede tutunarak biyofilm gelişim evrelerinin tümünü tekrar eder. Kirisits ve ark. iki farklı biyofilm türü tarif etmişler, yüzey üzerinde yükseklik göstermeden yayılan biyofilmi “yassı”, hücre kümelerinden meydana gelen ve kanal veya boşluklarla birbirinden ayrılan şapkalı mantar benzeri biyofilmleri ise “yapısal” olarak adlandırmışlardır (78). Çalışmamızda kökenlerin %86’sında mikroplak yöntemiyle biyofilm üretimi saptanmış ancak teknik olanaksızlıklar nedeniyle biyofilm yapısı araştırılamamıştır.

*P. aeruginosa*’nın hücre dışına salınan virülans faktörlerinin düzenlenmesinde büyük rol üstlenen Quorum Sensing sisteminin biyofilm oluşumuyla ilişkisi Davies ve ark. tarafından ortaya konmuştur (79). Araştırmacılar sokak tipi *P. aeruginosa* kökeni ve *rhlI* mutant kökenin yapısal biyofilmler oluşturduğunu, buna karşın *lasI* ve *lasI-rhlI* mutantlarının yassı, farklılaşamayan biyofilmler oluşturduklarını gözlemlemişler ve biyofilm gelişimi ve farklılaşmasından *las* sisteminin sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir. Kronik enfeksiyonlarda QS’nin rolünü inceleyen Smith ve ark. KF sürecinde *lasR* mutantlarının seçildiğini belirlemişler (80), bunu destekler şekilde Singh ve ark. KF hastalarının balgamlarında belirgin olan sinyalin *rhl* sistemine ait AHL sinyal moleküllerinin olduğunu tespit etmişlerdir (81). Bu sonuçlar ışığında ise, *las* sistemi ile düzenlenen akut dönem virülans faktörlerinin üretimini durdurarak konak bağışık yanıtından kaçan bakteri,

kronik enfeksiyon gelişimi için gerekli ve *rhl* ile düzenlenen biyofilm oluşumuna geçebilir.

Bakterinin patogeneğinde çok önemli görev üstlenen QS sisteminde bir eksikliğin bakterinin virülansında önemli azalmaya neden olacağı açıktır. Bu hipotezi destekleyen hayvan çalışmalarında; Iglewski ve Howe alkali proteaz üretimi belirgin olarak azalmış mutant kökenlerin, farelerde geliştirilen travmatize göz modelinde korneayı kolonize edemediklerini ve kornea hasarına yol açamadıklarını, alkali proteazın dışarıdan eklenmesiyle ise alkali proteaz üreten kökenlerin oluşturduğu enfeksiyondan ayırt edilemeyecek bir tablo geliştiğini gözlemlemiştir (26). Wu ve ark. *P. aeruginosa* kökenlerini ve ancak ekzojen AHL varlığında yeşil floresan protein (YFP) üreten *E. coli* kökenlerini aljinat boncuklar içerisinde farelere intratrakeal yoldan uygulayarak bir pnömoni modeli geliştirmişlerdir. Fareler farklı günlerde öldürülerek, akciğer dokularındaki YFP ifade eden *E. coli* kökenleri konfokal taramalı lazer mikroskopisi yöntemiyle araştırılmış ve bu kökenlerin ciddi derecede hasar görmüş akciğer dokusunda yoğunlaşmaları enfeksiyon sırasında *P. aeruginosa* tarafından AHL moleküllerinin üretilip ortama salındığını, ve AHL üretiminin, dolayısıyla QS'nin, *P. aeruginosa*'nın akciğer enfeksiyonları patogeneğinde önemli rol oynadığını düşündürmüştür (82). Tang ve ark. *lasR* geni mutasyona uğratılmış *P. aeruginosa* kökeninin fare akut pnömoni modelinde daha az virülan olduğunu göstermişlerdir (83). Wu ve ark. sokak tipi *P. aeruginosa* kökeni PAO-1 ile, QS sisteminin sinyal molekülü üreten genleri (*lasI* ve *rhlI*) mutasyona uğratılmış *P. aeruginosa* PAO-JP2 kökenleriyle sıçanda *P. aeruginosa*'ya bağlı pnömoni geliştirmiş, enfeksiyonun erken evrelerinde mutant PAO-JP2 kökenine karşı daha hızlı ve güçlü bağışık yanıt sağlandığını, daha fazla pulmoner INF- $\gamma$  üretildiğini ve daha güçlü polimorfonüveli lökosit cevabı ortaya çıktığını, ve antikor yanıtının daha hızlı geliştiğini saptamışlar ve fonksiyonel *lasI* ve *rhlI* genlerinin *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonlarının şiddetinde belirgin rol oynadığı sonucuna varmışlardır (84). Rumbaugh ve ark. farelerde geliştirdikleri yanık modelinde QS sistemi mutant kökenler kullanarak *P. aeruginosa*'nın vücutta

yayımlı göstermesi, cilt üzerinde yayılması ve sağkalım oranı kriterlerine göre kıyaslamalar yapmışlardır. PAO-1'e kıyasla, *lasI*, *lasR*, *rhlI* mutant kökenlerin virülansının belirgin olarak azaldığını belirlemişler ve en göze çarpan azalmanın *lasI*-*rhlI* çifte mutantında gözlemlendiğini saptamışlardır. QS'nin yanık ciltte horizontal yayılıma ve yanık yaraları oluşturulmuş farede bakterinin uzak organlara yayılmasından sorumlu olduğunu belirtmişlerdir (85).

QS sisteminin *P. aeruginosa* patogeneziindeki önemi ortaya konduktan sonra çalışmalar özellikle kistik fibroz hastaları üzerinde yoğunlaşmıştır. KF hastalarının solunum yolları hemen her zaman *P. aeruginosa* ile kolonizedir ve dönem dönem gözlenen akut alevlenmeler morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır. KF hastalarındaki akciğer enfeksiyonları *P. aeruginosa* QS sistemini incelemek için oldukça uygun bir alandır. Akciğerlerin kapalı ve sınırlı bir hacime sahip olması, *P. aeruginosa*'nın çok yüksek yoğunluklara dek üreyebilmesi (balgamda  $10^7$  -  $10^8$  kob/ml) KF hastası akciğerlerinde QS ile düzenlenen genlerin uyarılması için yeterlidir (86). Erickson ve ark. KF hastalarının akciğerlerindeki *P. aeruginosa* kökenlerinin ürettiği AHL molekül seviyesini ve transkript birikimini ölçmüşler, balgamda yüksek AHL molekül düzeylerini saptamışlar ve bu moleküllerle ifadesi düzenlenen virülans genlerinin KF hastaları akciğerinde aktif olduğunu ve virülansın düzenlenmesinde rol oynadığını savunmuşlardır (87).

QS sisteminde eksiklik olan *P. aeruginosa* kökenlerinin insanlarda enfeksiyon etkeni olup olmayacağını araştıran kısıtlı sayıdaki çalışmada; Zhu ve ark. oküler örneklerden izole edilmiş 8 kökenin düşük proteaz ve AHL aktivitesi gösterdiğini belirlemiş ve 2 kökende *lasI* ve *lasR*, 2 kökende ise *rhlI* ve *rhlAB* genlerini negatif bulmuşlar, diğer 4 kökende ise tüm QS genlerini saptamışlardır. İlginç olarak QS genlerinde eksiklik saptanan 4 kökenin 3'ü asemptomatik kontakt lens kullanıcısından, 1'i de enfeksiyöz olmayan, korneanın iltihabi yanıtı olan kontakt lensin yol açtığı kırmızı göz tablosundan izole edilmiştir. Buna karşın düşük proteaz ve AHL üretimi olmasına rağmen incelenen tüm genleri pozitif saptanan 4 köken de enfeksiyöz keratit

olgularından izole edilmiştir. Araştırmacılar klinik izolatları hayvan deneyi kapsamında kornealarında çizik geliştirilen farelere uygulamışlar ve *lasI* ve *lasR* mutantı olan 2 kökenin farede avirulan olduğunu gözlemleyerek, *las* QS sisteminin kornea enfeksiyonları için gerekli olduğu fikrine varmışlardır (90). Déneraud ve ark. yoğun bakım ünitesinde izlenen mekanik solunum cihazına bağlı 13 hastanın pulmoner aspirat örneklerinden izole edilen toplam 442 *P. aeruginosa* kökeninin (34 köken/hasta) %81'inde QS sistemiyle düzenlenen elastaz, proteaz ve ramnolipid üretimini saptamıştır. Üç hastada QS sisteminde mutasyon olan kökenler saptanmış ve bu hastaların ikisinde psödomonas bakteriyemisi ve pulmoner enfeksiyonu gelişmiştir (89). Bu beklenmedik bulgu bu hastaların eş zamanlı olarak virülans faktör üretimi çok yüksek olan bir başka genotiple daha kolonize olmaları ve enfeksiyondan bu kökenlerin sorumlu tutulabileceği olasılığıyla açıklanabilir. Schaber ve ark. farklı enfeksiyonlardan izole edilen (alt solunum yolu, üriner sistem ve yara enfeksiyonları) 200 *P. aeruginosa* kökeninde elastaz üretimini elastinli besiyeri içeren agar plağı kullanarak araştırmışlar ve beş kökende elastaz üretiminin olmadığını göstermişlerdir. Bu kökenlerin süpernatantlarında elastin-kongo kırmızısı varlığında absorbans ölçümü ve LasB-özgül poliklonal antikolar kullanarak immunoblot yöntemiyle bant araştırılması uygulanmış ve bu doğrulama yöntemleriyle de elastaz saptanamamıştır. QS sinyal molekülleri olan 3-okso-C12-HSL ve C4-HSL molekülleri "cross biofeeding assay" (çapraz-biyobesleme testi) ile araştırıldığında kökenlerin 4'ünde negatif, 1'inde pozitif bulunmuş, kökenlerin LasA elastaz, piosiyanın ve biyofilm üretimleri incelendiğinde ise benzer şekilde HSL üretimi olmayan 4 köken negatif, HSL üreten köken ise pozitif bulunmuştur. QS'in düzenleyici genleri olan *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, *lasR* genleri PCR yöntemiyle araştırılmış, HSL üretimi negatif olan 4 kökende bir ya da daha fazla QS geni PCR ile saptanamamıştır. Araştırmacılar QS-mutant kökenleri irdelerken; QS sisteminin *P. aeruginosa* patogenezinde önemli rolü olmasına rağmen enfeksiyonun gelişimi için mutlak gerekli olmadığını, diğer QS-bağımsız virülans faktörlerinin QS-ile kontrol edilen virülans faktörlerinin kaybının yerini telafi edebileceği yorumlarında bulunmuşlardır (62).

Çalışmamızda araştırdığımız her dört virülans faktörü için absorbans değerleri ortalama absorbans değerlerinin altında kalan 16 kökenin QS genleri PCR yöntemiyle araştırılmış ve 9 kökende her 4 QS geni de pozitif bulunmuştur. Bu 9 köken virülans faktörleri için eşik değerler kullanılarak irdelendiğinde kökenlerin 8'inde tamamen QS ile kontrol edilen en az bir faktörün (elastaz, alkali proteaz ve piyosyanin) eşik değer üzerinde bulunduğu ve aslında bu kökenlerde QS sisteminin fonksiyonel olduğu görülmektedir. İlginç olarak 81 no'lu kökende incelenen dört faktör de eşik değerinin altında bulunduğu halde her dört QS geni de pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda saptadığımız QS gen veya genleri eksik yedi kökenin izole edildiği hastalardan üçünün yoğun bakım hastası olup (köken no: 2, 83, 84) aspirasyon pnömonisi tanısıyla antibiyotik tedavisi aldığı belirlenmiştir. Diğer dört köken (köken no: 27, 39, 60, 90) ise poliklinik hastalarından izole edilmiş olup kültür sonuçlarının klinisyen tarafından nasıl yorumlandığı bilgisine ulaşamamıştır.

Virülans faktörlerinin üretiminde QS sisteminin rolü büyük olsa da henüz aydınlatılamamış diğer bazı yolların bu faktörler üzerine etkili olabileceği, QS genleri intakt olmasına rağmen virülans faktörlerini üretemeyen kökenlerde QS sistemi üzerine etkili global düzenleyici sistemlerin (Vfr, GacA, RsaL, RpoS, RpoN) aktivitesinde bozukluk ya da QS üzerine inhibitör etkisi söz konusu olabilir (62, 88). Çalışmamızda kullandığımız fenotipik virülans faktörü saptama testleri yarı-nicel testlerdir, diğer çalışmalarda da başlangıç aşamasında benzer yöntemler kullanılmış ve şüpheli kökenlerde PCR yöntemine yönelmeden önce virülans faktörü üretimini incelemek için daha güvenilir yöntemlere (ince-tabaka kromatografisi, çapraz-biyobesleme testi gibi) başvurulmuştur.

Virülans faktör değerleri ortalamanın altında kalan 16 köken ERIC-PCR yöntemiyle genotipik benzerlik açısından araştırılmış ancak bir klonal ilişki kurulamamıştır. Tingpej ve ark. erişkin KF hastalarının akciğerlerinden

izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında klonal ilişki gösterenlerin total proteaz üretimini daha yüksek bulmuşlar ve kronik enfeksiyonlardaki proteaz aktivitesinin klonal ilişkili suşların geçişine katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir (90).

Diğer birçok bakterinin aksine *P. aeruginosa*'da antibiyotiklere direnç bir virülans faktörü sayılmaktadır. Bunun sebebi bakterinin ürettiği enzimler veya çoklu ilaç pompaları sayesinde doğal olarak birçok antibiyotiğe doğal direnç göstermesi, mutasyonlar yardımıyla her tür tedavi seçeneğine karşı hızla direnç kazanmasıdır (4, 62). Sıklıkla ciddi enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkan *P. aeruginosa*'da antibiyotik direnci tedaviyi iyice güçleştirmektedir. Günümüzde az sayıda da olsa bazı *P. aeruginosa* kökenleri tüm güvenilir antibiyotiklere karşı dirençlidir (91).

Çalışmamızda 5 farklı antibiyotik grubu için kökenlerin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir ve antibiyotik duyarlılık yüzdeleri Tablo 6'da verilmiştir. Beklenildiği üzere poliklinik hastalarının izolatları yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servis izolatlarına göre daha duyarlı bulunmuş, en yüksek direnç oranları YBÜ'de saptanmıştır.

Çalışma kökenlerimizde virülans faktör üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki incelendiğinde; elastaz üreten kökenlerin piperasilin ve seftazidime, alkali proteaz üreten kökenlerin tobramisin, piperasilin, piperasillin/tazobaktam, sefepim, imipenem ve siprofloksasine, piyosiyanın üreten kökenlerin ise amikasin, tobramisin, seftazidim, siprofloksasin ve ofloksasine daha duyarlı olduklarını gözlemlenmiştir.

Antibiyotiklerin *P. aeruginosa* kökenlerinin virülans faktörü üretimi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar irdelendiğinde; eritromisinin elastaz ve lökosidinin üretimini azalttığı (92), azitromisinin biyofilm oluşumunu yavaşlattığı (93), seftazidim, siprofloksasin ve tobramisinin ekzoenzim A, ekzotoksin S, fosfolipaz C ve elastaz üretimini azalttığı

görülmektedir (94). Ancak kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları ile virülans faktörü üretimlerini inceleyen fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Çıragil ve ark. elastaz üreten kökenlerin tobramisine, alkali proteaz üreten kökenlerin ise meropenem, sefepim ve piperasiline daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir (75). Kong ve ark. *Enterobacteriaceae* ailesinde ampC enziminin düzenleyicisi olan *ampR* geni mutantı *P. aeruginosa* PAO*ampR* kökeninin mutant olmayan kökene göre daha fazla piyosiyenin ve LasA proteaz, daha az LasB elastaz ürettiğini gözlemlemişler ve AmpR'nin *ampC*, *lasB*, *rhIR* için pozitif düzenleyici, *poxB*, *lasA*, *lasI* ve *lasR* için negatif düzenleyici etkileri olan bir global düzenleyici olduğunu belirlemişlerdir (95). Antibiyotik duyarlılığı ile virülans faktörü üretimi arasındaki ilişkiyi somut bir şekilde ortaya koyan bu çalışma, aynı zamanda virülans faktörü üretiminin ne kadar karışık mekanizmalarla düzenlendiğini ve ayrıca QS sistemi üzerine global düzenleyici sistemlerin etkisini vurgulayan güzel bir örnek oluşturmaktadır.

*P. aeruginosa*'da antibiyotik direncinden sorumlu önemli bir mekanizma genellikle çoklu ilaç direncine yol açan ilaç dışı atım (eflüks) pompa sistemleridir. Bakterinin doğal direncinde rol oynayan eflüks pompalarının tanımlanması *P. aeruginosa*'da dış membran geçirgenliğinin az olmasına bağlanan doğal direncin aslında büyük oranda eflüks pompalarına bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır (96, 97). Evans ve ark. 3-okso-C12-HSL'nin MexAB-OprM pompa sistemi için substrat olduğunu göstermişler, bu pompayla ilişkili operonun aşırı ifadesine neden olan bir mutasyonun AHL sinyal molekülünün hücre içinde birikmesini engelleyerek *las* sistemi ile düzenlenen virülans faktörlerinin ifadesinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (98).

Biyofilm içinde üreyen bakterilerin planktonik hücrelere kıyasla antibiyotiklere daha dirençli olmasında, biyofilm içindeki bakterileri çevreleyen EPS'nin mekanik bariyer fonksiyonuyla antibiyotiklerin bakteriye ulaşmasını engellemesi önemli rol oynamaktadır. Biyofilm içindeki bakteriler yüksek

sıklıkta mutasyon özelliği gösterip, hızla çoklu-ilaç direnci kazanabilirler (99). Çalışmamızda antibiyotik duyarlılık testi, planktonik hücrelerin duyarlılığın test edildiği disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildiğinden, biyofilm üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki incelenmemiştir. Delissalde ve ark. disk difüzyon yöntemiyle biyofilm üreten kökenlerin duyarlılığında üretmeyen kökenlere göre hafif bir azalma bildirmiştir ancak, planktonik hücrelerin test edilmesinin biyofilm duyarlılığını yansıtmadığı daha yaygın bir kanıdır (98).

Sonuçlarımız *P. aeruginosa*ya bağlı solunum yolu enfeksiyonlarında ifadesi QS ile düzenlenen virülans faktörlerinin rolünü bir kez daha ortaya koymakta ve QS eksik (mutant?) kökenlerin de enfeksiyon etkeni olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu enfeksiyonlarda QS ile düzenlenmeyen virülans faktörlerinin de rol almış olabileceğini ya da birden fazla *P. aeruginosa* kökeninin de etken olabileceği olasılığını göz ardı etmemek gerekir.

## KAYNAKLAR

1. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, pp. 2587-2615 Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2005.
2. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* 2007;67(3):351-368.
3. Surveillance NNI: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J Infect Control* 2002;30:458-475.
4. Salyers AA, and D. D. Whitt. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. pp. 260-268, ASM Press, Washington, D.C., USA, 1994.
5. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006;36:78-91.
6. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Dis* 1998;4(4):551-560.
7. Palleroni NJ, Family I. *Pseudomonadaceae*. Ed: Krieg NR, Holt JG, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 141-219 Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1984.
8. Winn Jr. W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. pp 303-391 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 2006.
9. Doggett RG. Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Doggett RG, *Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy*. pp. 1-8, Academic Pres, New York, USA, 1979.

10. *Pseudomonas* dermatitis/folliculitis associated with pools and hot tubs --- Colorado and Maine, 1999--2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49:1087-1091.
11. Niall DM, Murphy PG, Fogarty EE, Dowling FE, Moore DP. Puncture Wound Related *Pseudomonas* Infections of the Foot in Children. Irish Journal of Medical Science 1997;166(2):98-101.
12. Eifrig CWG, Scott IU, Flynn Jr HW, Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Ophthalmol. 2003;110(9):1714-1717.
13. Rajashekaraiah KR, Dhawan VK, Rice TW, McCulley D, Kallick CA. Increasing incidence of *Pseudomonas* endocarditis among parenteral drug abusers. Drug and Alcohol Dependence 1980;6(4):227-230.
14. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 1984;6:S627-S640.
15. de Bentzmann S, Roger P, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, Plotkowski MC, Puchell E. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. Infect Immun 1996;64:1582-1588.
16. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infect Immun 1998;66(1):43-51.
17. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med 2002;30(3):521-528.
18. Gransden WR, Leibovici L, Eykyn SJ, Pitlik SD, Sarma Z, Konisberger H, Drucker M, Phillips I. Risk factors and a clinical index for diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Clin Microbiol Infect 1995;1(2):119-123.
19. Bodey GP. *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients: Have they gone away?. Curr Opin Infect Dis 2001;14(4):403-407.
20. Pitt BR. CFTR trafficking and signaling in respiratory epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281(1):L13-L15.

21. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1994;62:596–605.
22. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(3):860-867.
23. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *J Bacteriol* 2001;183(18):5395-5401.
24. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7907-7912.
25. Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, Leroy X, Robriquet L, Fialdes P, Nevriere R, Fourrier F. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* - induced acute lung injury. *Shock* 2004;21(5):444–451.
26. Howe TR, Iglewski BH. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* 1984;43:1058-1063.
27. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The Role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004;10(12):599-606.
28. Denning, G.M, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L584–L592.

29. O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(3):L1077–L1086.
30. Usher, LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, Taylor GW, Whyte MK. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 2002;168(4):1861–1868.
31. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001;35:439–468.
32. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1996;64:518–523.
33. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7072–7077.
34. Matsumoto K. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratal keratitis. *Biol Chem* 2004;385(11):1007–1016.
35. Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L409–L418.
36. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1661–1669.
37. Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* 1990;4(4):527-535.

38. Woods DE, Iglewski BH. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. Rev Infect Dis 1983;5(Suppl 4):S715-722.
39. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. Toxicol 1993;31:27-34.
40. Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. Eur J Clin Microbiol 1985;4(2):175-179.
41. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect Immun 2004;72(12):6969–6977.
42. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. Circ Res 2004;95(2):196-203.
43. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. Infect Immun 2000;68:3998–4004.
44. Greenberg EP. Quorum sensing in gram-negative bacteria. ASM News 1997;63:371-377.
45. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos VM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria Mol Microbiol 1997;24:895-904.
46. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol 1996;50:727-751.
47. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. J Bacteriol 1991;173:3000-3009.

48. Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby O, Sewell H, Stewart GS, Bycroft BW, Pritchard DI. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 1998;66(1):36-42.
49. Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1490-1494.
50. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Role of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in the control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997;179:5756-5767.
51. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997;179:3127-3132.
52. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996;60(3):539-574.
53. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* 1998;280:295-298.
54. Hachette TF, Gupta R, Marrie TJ. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: Case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;31(6):1349-1356.
55. Ramphal R, Lhermitte M, Filliat M, Roussel P. The binding of anti-pseudomonal antibiotics to macromolecules from cystic fibrosis sputum. *J Antimicrob Chemother* 1988;22(4):483-490.
56. Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ. Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. European SENTRY Participants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(5):370-374.

57. Jones RN, Kirby JT, Beach ML, Biedenbach DJ, Pfaller MA. Geographic variations in activity of broad-spectrum beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: Summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43(3):239-243.
58. Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: Results from the European MYSTIC study group. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(9):980-983.
59. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):140-141.
60. Iglewski BH. Elastase Assays. *Methods Enzymol* 1994;235:554-62.
61. O'Toole GA. Genetic Approaches to Study Biofilms. *Methods Enzymol* 1999;310:91-109.
62. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of Quorum Sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004;53:841-853.
63. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M2-A9-Antimikrobik Disk Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onaylanmış Standart-Dokuzuncu Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2007.
64. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M100-S17-Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onyedinci Bilgi Eki Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2007.
65. Yang W, Shi L, Jia W, Yin X, Su J, Kou Y, Yi X, Shinoda S, Miyoshi S. Evaluation of the Biofilm-Forming Ability and Genetic Typing for Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based PCR. *Microbiol Immunol* 2005;49(12):1057-1061.

66. Mendelson MH, Gurtman A, Szabo S, Neibart E, Meyers BR, Policar M, Cheung TW, Lillienfeld D, Hammer G, Reddy S. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with AIDS. Clin Infect Dis 1994;18(6):886-95.
67. Richard P, Le FR, Chamoux C, Pannier M, Espaze E, Richet H. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. J Infect Dis 1994;170:377-83.
68. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R, Patrick CC. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. Clin Infect Dis 1994;18(3):390-394.
69. Dunn M, Wunderink RG. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas* infection. Clin Chest Med 1995;16:95-109.
70. Passador L, Iglewski BH. Quorum sensing and virulence gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Roth JA, Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2nd Edition, pp, 65-78 American Society for Microbiology, Washington, USA, 1995.
71. Woods DE, Schaffer MS, Rabin HR, Campbell GD, Sokol PA. Phenotypic Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Variety of Clinical Sites. J Clin Microbiol 1986;24(2):260-264.
72. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. J Hosp Infect 1999;43:211-218.
73. Hedberg M, Millet JK, Tompkins N. Elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital patients. Am J Clin Pathol 1969;52:631
74. Janda JM, Atangnomo S, Bottone EJ, Desmond EP. Correlation of proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* with site of isolation. J Clin Microbiol 1980;4:626-628.

75. Çıragil P. Kistik Fibroziste Ve Diğer Alt Solunum Yolu İnfeksiyonlarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virulans Faktörleri. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 1998.
76. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML. Disruption of Respiratory Cilia by Proteases Including Those of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1986;54(2):379-385.
77. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. Infect Immun 2004;72:4275–4278.
78. Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? Cell Microbiol 2006;8(12):1841-1849.
79. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. Science 1998;280:295-298.
80. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(22):8487-8492.
81. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh, MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000;407: 762–764.
82. Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Heydorn A, Mathee K, Moser C, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Givskov M. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 2000;146:2481-2493.
83. Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A. Contribution of Specific *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection. Infect Immun 1996;64(1):37-43.

84. Wu H, Song Z, Givskov M, Doring G, Worlitzsch D, Mathee K, Rygaard J, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhII quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiol* 2001;147:1105-1113.
85. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of Quorum Sensing to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Wound Infections. *Infect Immun* 1999;67(11):5854-5862.
86. Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1998;66:2521–2528.
87. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, Mitchell I, Storey DG. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Systems May Control Virulence Factor Expression in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis. *Infect Immun* 2002;70(4):1783-1790.
88. Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thuruthyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, Givskov M, Willcox MDP. *Pseudomonas aeruginosa* with LasI Quorum-Sensing Deficiency during Corneal Infection *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1897-1903.
89. Dénervaud V, TuQuoc P, Blanc D, Favre-Bonté S, Krishnapillai V, Reimmann C, Haas D, van Delden C. Characterization of Cell-to-Cell Signaling-Deficient *Pseudomonas aeruginosa* Strains Colonizing Intubated Patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):554-562.
90. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Nassafi KA, Manos J, Elkins M, Bye P, Willcox M, Bell S, Wainwright C, Harbour C. Phenotypic Characterization of Clonal and Nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Lungs of Adults with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007;45(6):1697-1704.
91. Livermore DM. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634-640.

92. Kita E, Sawaki M, Oku D, Hamuro A, Mikasa K, Konishi M, Emoto M, Takeuchi S, Narita N, Kashiba S. Suppression of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by erythromycin. J Antimicrob Chemother 1991;27:273-284.
93. Gillis RJ, Iglewski BH. Azithromycin Retards *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. J Clin Microbiol 2004;42(12):5842-5845.
94. Cristallo A, Passi A, Bruseghini L, Cereda PM. *Pseudomonas aeruginosa* proteases: Purification procedures for enzymatic standard. New Microbiol 1996;19(3):221-226.
95. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, Hoiby N, Mathee K. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB  $\beta$ -Lactamases, Proteases, Quorum Sensing, and Other Virulence Factors. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(11):4567-4575.
96. Ma D, Cook DN, Hearst JE, Nikaido H. 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. Trends Microbiol 1994;2(12):489–493.
97. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:1831–1836.
98. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Pooloe K. Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1998;180(20):5443-5447.
99. Delissalde F, Amábile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents 2004;24:405-408.