

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARINDA
BİYOFİLM YAPIMININ VE QUORUM SENSİNG'DE ROL
ALAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. EBRU ÇEVİK TEPELİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. MELEK DEMİR

DENİZLİ-2009

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince sunduğu bilimsel ve destekleyici ortam ile mikrobiyolojiye bağlılığımı arttıran, deneyimleri ile yol gösteren saygı değer hocam Prof. Dr. İlknur KALELİ'ye,

Tez çalışmam boyunca benden sabrını, desteğini, emeğini hiç esirgemeyen; mesleki gelişimime büyük katkıları yanı sıra dostluğuyla da her zaman özel bir yeri olan değerli tez hocam Doç. Dr. Melek DEMİR'e; nezaketi, saygı, sevgi ve desteğini hep hatırlayacağım sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Nural CEVAHİR'e; değerli hocalarım Doç. Dr. Çağrı ERGİN, Yard. Doç. Dr. Mustafa ŞENGÜL ve Yard. Doç. Dr. Ergun METE'ye; çalışma ortamındaki uyum, özveri ve saygıları yanı sıra en kötü günlerimde yardımlarını ve sevgilerini hiç esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Melahat GÜRBÜZ, Dr. Habibe ÖVET ve Dr. Soner TİKVEŞLİ'ye; kendileriyle çalışmaktan mutlu olduğum tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma her şey için çok teşekkür ediyorum.

En zor anlarımda varlığından güç aldığım, hep yanımda ve destek olan değerli eşim Dr. Emre TEPELİ'ye; tüm yaşantım boyunca manevi desteğini ve sabrını hiç esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
Görünüm ve Boyanma Özellikleri.....	3
Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	4
Virülans Faktörleri.....	4
Bakteriyel Hücre Yüzey Virulans Faktörleri.....	4
Kirpik (Flagella).....	4
Pilus (<i>Fimbriae</i>).....	5
Lipopolisakkaritler.....	5
Alginat.....	5
Salgılanan Virulans Faktörleri.....	6
Piyosiyanin.....	6
Piyoverdin.....	6
Alkali Proteaz.....	6
Proteaz IV.....	6
Elastaz.....	7
Fosfolipaz C.....	7
Ekzotoksin A.....	7
Ramnolipid.....	7
BİYOFİLM.....	8
Biyofilmin Tanımı.....	8
Biyofilmin Yapısı.....	8
Biyofilmin Oluşum Aşamaları.....	9
Biyofilm Oluşumunun Önemi.....	10
Biyofilm Oluşumu ve Hastalıklarla İlişkisi.....	12
<i>QUORUM SENSİNG</i>	13
QS Moleküllerindeki Çeşitlilik.....	14
Açıl Homoserin Lakton (LuxI/LuxR)	
Tipi QS İletişimi.....	14
<i>Autoinducer-2</i> Tipi QS İletişimi.....	15
<i>Autoinducer</i> Peptidler.....	15
<i>P.aeruginosa</i> ve <i>Quorum Sensing</i>	16
<i>P.aeruginosa</i> 'da Biyofilm Yapımı ve <i>Quorum Sensing</i>	18
<i>P.aeruginosa</i> Patogeneğinde QS Genlerinin Rolü.....	20
GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
BULGULAR.....	28
TARTIŞMA.....	42
SONUÇLAR.....	62
ÖZET.....	64
YABANCI DİL ÖZETİ.....	65
KAYNAKLAR.....	66

TABLOLAR ÇİZELGESİ

		Sayfa No
Tablo -1	<i>Quorum sensing</i> gen ampikonları için kullanılan primerler...	25
Tablo -2	<i>Quorum sensing</i> genleri için amplifikasyon sonrası beklenen gen büyüklükleri.....	27
Tablo -3	Sisteme göre örneklerin dağılımı.....	28
Tablo -4	Alt solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen suşların biyofilm yapım şiddeti.....	29
Tablo -5	Suşların örnek gruplarına göre antibiyotik direnç oranları.....	29
Tablo -6	<i>Quorum sensing</i> genleri çalışılan suşların biyofilm düzeylerine göre dağılımı.....	30
Tablo -7	<i>Quorum sensing</i> gen amplifikasyon sonuçları.....	39
Tablo -8	Örnek türlerine göre <i>quorum sensing</i> total gen kaybı bulunan suşlar.....	39
Tablo -9	Örnek gruplarına göre <i>quorum sensing</i> total gen kaybı olan suşların dağılımı.....	40
Tablo -10	Biyofilm oranlarına göre <i>quorum sensing</i> total gen kaybı olan suşların dağılımı.....	40
Tablo -11	Total gen kaybı saptanan suşların <i>quorum sensing</i> genlerinin biyofilm düzeylerine göre dağılımı.....	41

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil-1 <i>lasI</i> internal geni jel görüntüsü.....	31
Şekil-2 <i>lasI</i> intakt geni jel görüntüsü.....	32
Şekil-3 <i>lasR</i> internal geni jel görüntüsü.....	33
Şekil-4 <i>lasR</i> intakt geni jel görüntüsü.....	34
Şekil-5 <i>rhII</i> internal geni jel görüntüsü.....	35
Şekil-6 <i>rhII</i> intakt geni jel görüntüsü.....	36
Şekil-7 <i>rhIR</i> internal geni jel görüntüsü.....	37
Şekil-8 <i>rhIR</i> intakt geni jel görüntüsü.....	38

KISATMALAR DİZİNİ

AHL:	Açıl homoserin lakton
QS:	<i>Quorum sensing</i>
LPS:	Lipopolisakkarit
Ekzo A:	Ekzotoksin A
AI:	<i>Autoinducer</i>
AIP:	<i>Autoinducer</i> peptidler
AI-2:	<i>Autoinducer 2</i>
LB:	Luria-Bertani
TBE:	<i>Tris buffer edta</i>
ELİSA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polimeraz Zincirleme Tepkimesi)
dNTP:	Deoksinükleotid Trifosfat
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni, sepsis, kronik akciğer hastalığı ve pek çok akut enfeksiyona neden olan ve çoklu antibiyotik direnci gösteren bir mikroorganizmadır.

P.aeruginosa'nın virülansında hem hücresel hem de hücre dışı faktörler rol oynamaktadır. Özellikle pili, flagella ve lipopolisakkarit gibi yüzey komponentleri ile konak hücre yüzeyine yapışır ve konak immün yanıtına neden olur. Yapılan pek çok hayvan modelli çalışmada proteazlar (elastaz, alkali proteaz, lasA proteaz ve proteaz 4), toksinler (ekzotoksin A ve ekzoenzim S) ve hemolizinlerin (fosfolipaz ve ramnolipid) *P.aeruginosa* virülansında rol aldığı gösterilmiştir. *P.aeruginosa*'nın hücre dışı virülans faktörlerinin salınımı *Quorum Sensing* olarak adlandırılan hücre yoğunluğuna bağımlı ve “açıl homoserin lakton” sinyal moleküllerinin kullanıldığı bir mekanizma ile kontrol edilip düzenlenmektedir (1, 2).

Quorum Sensing sisteminin aynı zamanda pek çok mikroorganizmada önemli bir virülans faktörü olan biyofilm yapısını da etkilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarla özellikle biyofilmin yapılanma, olgunlaşma ve dağılma aşamalarında *quorum sensing* sisteminin rolü açıkça belirtilmektedir (3). Biyofilm yapısı *P.aeruginosa*'nın özellikle kronik akciğer enfeksiyonları başta olmak üzere pek çok enfeksiyonun gelişiminde önemli bir role sahiptir (4).

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde patojenin virulansının azaltılarak etken-konak arasındaki etkileşimin ortadan kaldırılması umut veren tedavi yaklaşımlarından birisini oluşturmaktadır. Bu amaçla örneğin *P.aeruginosa*'da açıl homoserin lakton sinyal moleküllerinin tahrip edilmesi veya sentezlerinin inhibisyonu ile “*quorum sensing* inhibisyonu” yeni bir tedavi şekli olarak tartışılmaktadır (4 -6).

Bu alışmada; Pamukkale Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerden soyutlanmış *P.aeruginosa* suşlarında biyofilm yapımı ile QS'de rol alan genlerin varlığının araştırılması ve biyofilm yapım şiddeti ile QS genleri arasında ilişki olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Pseudomonadaceae ailesindeki *Pseudomonas* cinsinde, suda ve toprakta yaşayan, gram negatif, non-fermentatif, aerobik basillerin bulunduğu çeşitli türler yer almaktadır. Çoğu türler bitki ve hayvan için patojendir. *Pseudomonas* cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni, *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *P.aeruginosa*, özellikle immün sistemi baskılanmış bireyler için önemli bir fırsatçı patojendir (7).

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

P.aeruginosa, immün yetmezliği olan, uzun süre kemoterapi veya radyoterapi alan, metabolik veya malign hastalığı olan bireylerde, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde meydana gelen enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerdendir. Özellikle hastane enfeksiyonlarına yol açan patojenlerin başında yer almakta ve sepsis, peritonit, postoperatif enfeksiyonlar, kemik ve eklem enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları gibi yüksek mortalite ile seyreden klinik tablolara neden olmaktadır ve tedavi sırasında antibiyotiklere direnç geliştirmesi büyük problem oluşturmaktadır (8, 9, 10, 11). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P.aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (12).

Görünüm ve Boyanma Özellikleri:

P.aeruginosa gram negatif, 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, sporsuz, kapsülsüz basildir. Pseudomonaslar bir uçta tek kirpik (flagella) veya daha az oranda birden fazla kirpik bulunduran hareketli mikroorganizmalardır. Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri hareketsizdir. Pigmentsiz olanları, R tipinde üreyenleri tanımlanmıştır. G+C oranı %67,2'dir (13, 14).

Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri:

Her besiyerinde kolaylıkla ürerler ve organik üreme faktörlerine ihtiyaçları yoktur. Zorunlu aerobdurlar. En iyi 37 °C’de, aynı zamanda oda ısısında ve 41 °C’de üreyebilirler; fakat 4 °C’de üremezler. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitiktir ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur (13, 14).

P.aeruginosa suşları temelde 2 çeşit pigment yaparlar: Piyosiyanin ve piyoverdin (veya *fluorescein*). Piyosiyanin bir *phenazin* boyası olup suda ve özellikle kloroformda erir. Bu pigment alkali pH’da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için “*aeruginosa*” adı verilmiştir. Piyosiyanin sadece *P.aeruginosa* tarafından meydana getirilir. Bu pigmentin oluşması üreme ortamına sıkı sıkıya bağlıdır. Ortamda MgSO₄, K₃PO₄ ve demir bulunması pigment için gereklidir. Piyosiyanin varlığı *P.aeruginosa* için özgün ayırıcı bir özelliktir (13, 14). Piyoverdin kloroformda erimemesi ve sadece suda erimesiyle piyosiyaninden ayrılır. UV ışınları ile yeşilimsi floresan verir. Bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin gibi (kahverengi-siyah) pigmentler yapabilirler (13, 14).

Virülans Faktörleri:

P.aeruginosa hücre yüzey komponentleri, ekstraselüler enzimler ve toksinleri içeren çeşitli virülans faktörlerine sahiptir (15).

Bakteriyel Hücre Yüzey Virülans Faktörleri:

Kirpik (flagella):

Kirpik, *P.aeruginosa*’nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve *P.aeruginosa*’nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Kirpik patogeneizde kritik role sahiptir, asiolaGM1 gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar. Kirpik *P.aeruginosa*’nın kolonizasyonunun başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (16, 17).

Pilus (*fimbriae*):

Pilus veya *fimbriae* *P.aeruginosa*'nın kısa, filamantöz yüzey uzantılarıdır. Çoğunlukla çoklu pilus mevcuttur ve piluslar *P.aeruginosa*'da seğirme (*twitching*) şeklinde hareketten sorumludur. *P.aeruginosa*'nın pilusları bakteriyel harekette rol alan nadir prokaryotik piluslardandır. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Kirpik gibi piluslar da epitel hücre yüzeyinde asialoGM1 yapılarına bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar (18).

Lipopolisakkaritler:

P.aeruginosa'da dış membranın iç yüzü tipik çift katlı fosfolipid tabakaya benzese de, dış membranın dış yüzü başlıca lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmaktadır. LPS tabaka, fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-spesifik polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Farklı O-spesifik polisakkarit zincirleri, esas olarak *P.aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır. LipidA komponenti ise pek çok pro-inflamatuvar yolakta aktiftir (19). LPS tabaka, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerinin tanınması ve asialoGM1 veya CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reseptörlerine bağlanması aracılığıyla adezyonda rol alan önemli bir virülans faktörüdür (20, 21).

Alginat:

Alginat, *P.aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır, tekrarlayan mannuronik asit ve glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Alginat, LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P.aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar. Alginatın aşırı üretimi *P.aeruginosa*'yı fagositozdan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (22).

Salgılanan Virölans Faktörleri:

Piyosiyanin:

P.aeruginosa'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyanin, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patogeneze rol alır (23, 24).

Piyoverdin:

Piyoverdin bir siderofordur ve *P.aeruginosa* metabolizmasında kullanım için çevreden demir bağlayan küçük bir moleküldür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda piyoverdinin *P.aeruginosa*'nın ekzotoksin A (ekzoA) ve endoproteaz gibi diğer virölans faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol aldığı ve önemli bir virölans faktörü olduğu gösterilmiştir (25, 26).

Alkali Proteaz:

Alkali proteaz, *P.aeruginosa*'nın tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan, fibrini parçalayıcı bir proteazdır. *P.aeruginosa* proteazlarının çoğu gibi yalnızca korneal enfeksiyonların patogenezinde rolü açıkça bilinmektedir. Ayrıca akut akciğer hasarına neden olabilmektedir (27).

Proteaz IV:

Proteaz IV, *P.aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patogeneze rol alır. Proteaz IV'ün özellikle *P.aeruginosa* keratitinin patogenezinde katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda sürfaktan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı aracılığıyla akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de etkili olduğu gösterilmiştir (28).

Elastaz:

Elastaz veya lasB, *P.aeruginosa*'da tip II sekresyon sistemi ile salgılanan bir metalloproteinazdır. Elastaz, hücreler arası sıkı bağlantıların (*tight-junction*) yıkımı aracılığıyla solunum yolu epitellerinin parçalanması sonucu oluşmuş *P.aeruginosa* solunum yolu enfeksiyonlarının patogeneğinde rol alır, bu yüzden epitelyal geçirgenlik artar ve nötrofil göçü kolaylaşır. Ayrıca pro-inflamatuar sitokinlerden IL-8 artışına da neden olmaktadır. Elastaz, solunum yolu epitelinde sürfaktan proteinleri A ve D'nin parçalanması ve proteaz aktive edici reseptörün inaktivasyonu ile konak hücre immün yanıtını azaltır (25).

Fosfolipaz C:

Fosfolipaz C, özellikle hemolitik fosfolipaz C, *P.aeruginosa* tarafından tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. *P.aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir. Patojenik etkilerinin bir kısmı elastaz gibi, sürfaktan inaktivasyonu ile olmaktadır. Konak nötrofil oksidatif patlama yanıtını baskılar (29).

Ekzotoksin A:

Tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan ekzotoksin A (ekzo A), elangasyon faktör-2 (EF-2) inhibisyonu ile protein sentezi inhibisyonu ve hücre ölümüne yol açan bir ADP-ribozil transferazdır. Ekzo A'nın enfeksiyonda konak yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (21, 30).

Ramnlipid:

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 mukosiliyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (31).

BIYOFİLM

Biyofilmin Tanımı:

Bakteri tarafından üretilen ve bakterinin canlı veya cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarid tabiatında "glikokaliks" olarak da adlandırılan biyofilm; mikroplar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş matriks olarak tanımlanır (32, 33).

Biyofilmin Yapısı:

Biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit tabiatındaki bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Tüm biyofilmlerin büyük bölümü (%73-98) hidrate şekildedir (32, 34). Mikroskopik olarak incelendiğinde, arasından kanalların geçtiği mercan kayalıklar üzerindeki, piramit veya mantar şekilli uzantılardan oluşan bir oluşum görünümündedir. Biyofilmin gelişme potansiyeli yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alınımı, atıklarının uzaklaştırılması ile yakın ilişkilidir. Ortamda besin kısıtlanması sonucu eksprese olan *quorum sensing* moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O₂ perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite gibi çevresel faktörler biyofilm gelişiminde çok etkilidir (32).

Son yıllarda bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller (açıl homoserin lakton vs.) aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini daha çok arttırmıştır (32, 34).

Biyofilmin Oluşum Aşamaları:

Yapılan çalışmalar sonucu yapısal olarak planktonik hücreden köken alan biyofilmin oluşum aşamaları aşağıda bildirilmiştir (35).

1. Tutunma
2. Yapışma
3. Muköz yapı (*slime*) oluşumu
4. Olgun biyofilm
5. Kopma ve ayrılma

Katı-sıvı etkileşim yüzeyi ve sıvı besi ortamı, bakterilerin tutunması için ideal ortamı hazırlamaktadır. Tutunma olayında yüzey, yüzeyde hazırlayıcı film oluşumu, sıvı besi ortamının hidrodinamiği, sıvı ortamın özellikleri ve hücre yüzeyinin çeşitli özellikleri etkilidir (36).

Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, ekzopolisakkarit üretimi, kirpik ve pilus varlığı tutunmayı etkileyen faktörlerdendir. Hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı ve non-polar özelliği tutunmayı kolaylaştırır. Fimbria ya da pilus gibi yapıların hücrelerin hidrofobik özellikte kalmasına yardımcı olduğu, çoğu fimbria yapısının hidrofobik aminoasit kalıntılarına sahip olduğu bilinmektedir. Fimbria, yüzeyle arada bulunan akıma karşı gelerek tutunmayı sağlamaktadır (36).

Hücre yüzeyinin biyokimyasal yapısının da tutunmada etkili olduğu ortaya konmuştur (37). Beech ve Gaylarde, lesitinlerin tutunmayı inhibe etmelerine rağmen önleyemediklerini, glukozidaz ve N-asetil glukozaminidazın ise tutunmayı azalttığını bildirmişler, ancak mekanizmasını net olarak ortaya koyamamışlardır (38).

Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “*Quorum Sensing* Sistemi” denilen bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün

konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (39).

Biyofilm oluşumunda ikinci basamak bakterilerin yüzeye kuvvetli bir şekilde tutunma, yapışma işlemidir. Üçüncü evrede ise bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Dördüncü evrede mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (39).

Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle veya biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur (39).

Biyofilm Oluşumunun Önemi:

Biyofilm içerisindeki bakterilerin büyüme hızlarının planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olmasına karşın, bakterinin biyofilm oluşturmaya gerektiren durumlar vardır. Bunlar:

- 1-Savunma
- 2-Adezyon ve Kolonizasyon
- 3-Yaşanabilir çevre geliştirme
- 4-Komünite oluşturmak.

1- Savunma: Strese cevap olarak gelişir. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm kronik seyirli enfeksiyonlarda strese yanıt olarak gelişebilmektedir (40).

2- Adezyon ve Kolonizasyon: Vücudun en azından bir bölümü bakterinin yaşama ve gelişmesi için besinden zengin ve su içeriği, O₂ olanağı ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan birtakım (besin, su, O₂ vs) faktörlerle sabit bir yapı oluşturmaktadır. Bakteri yaşam için gerekli ortamda kalabilmek için biyofilm oluşturur (32).

Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar (32). Adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. İlginç olarak biyofilm, bakterinin adheransını arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakterinin adezyon ve motilite faktörlerinin ekspresyonunda da bir baskılama olmaktadır (41, 42).

3- Yaşanabilir çevre geliştirme: Ortamdaki glukozun bakteriler tarafından kullanılabilir olması bakterilerin ekzopolisakkarit ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırmaktadır. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen düzenlenmesini indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm oluşturduğunu düşündürmektedir (43, 44).

4- Komünite oluşturmak: Kazançların ortak paylaşımıdır. Bakterilerin ortama uyumundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdıkları gibi ortamdan aldıkları uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Bu değişim, ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Biyofilmdeki tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri kominal yaşamlarının en önemli göstergesidir (32).

Biyofilm Oluşumu ve Hastalıklarla İlişkisi

Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında protez kapak, santral venöz katater, üriner katater, ortopedik protez, kontakt lens ve rahim içi araç (RİA) cihazları gibi yabancı cisim enfeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağlantı kanıtlanmıştır (45). Hastaneden kazanılmış enfeksiyonların %60'ından fazlası biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (46).

Biyofilm, fagositoza ve antibiyotiklere karşı koruyucu bir yapı oluşturup bakterinin direnç kazanmasını sağlamaktadır. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında artan sıklık, şiddetli ve dirençli enfeksiyonun seyri biyofilm oluşumuna bağlanmaktadır (46). Bakteride bulunan direnç genleri plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu ile türler arasında aktarılabilir (47). Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumundan sonra *P.aeruginosa*'nın 73 geninin ekspresyonunda farklılıklar ve protein profilinin %50'sinde değişiklik olduğu ortaya konmuştur. Biyofilm oluşumu sonrası meydana gelen bu değişiklikler *P.aeruginosa*'nın direnç artışı ile sonuçlanmaktadır (48).

QUORUM SENSİNG

Biyofilm, bakterilerin bir araya gelerek oluşturdıkları, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bakterilerin biyofilm oluşturmak için çeşitli kimyasal sinyal mekanizmaları kullandıkları gösterilmiştir (45). Kimyasal sinyalin, lokal ekstraselüler konsantrasyonunun belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelir. Kimyasal olarak popülasyon yoğunluğunun hissedilmesi işlemine “*Quorum Sensing*” (QS) adı verilir (49).

QS, hücre yoğunluğuna bağımlı gen ekspresyonunun kontrolü olarak açıklanabilir (50). Bu tür iletişimin temeli, bakteri hücresinin otoindükleyici olarak işlev gören bazı sinyal molekülleri sentezleyerek çevresinde bulunan aynı türden diğer bakterilerin sayısını/yoğunluğunu izlemesine dayanmaktadır (51). Belli bir ortamdaki otoindükleyici yoğunluğu, o ortamda bulunan bakteri sayısı ile doğru orantılıdır. Bu nedenle bir bakterinin ortamdaki otoindükleyici miktarını “hissetmesi” ortamdaki diğer bakterilerin sayısı hakkında fikir sahibi olmasını sağlamaktadır. Otoindükleyicilere karşı bakterinin gen ekspresyonunu değiştirerek yanıt vermesi, bir bakteri topluluğu içinde her bir hücrenin bir diğeri ile koordine bir biçimde davranması sonucunu doğurmaktadır (6). QS moleküllerinin “otoindükleyici” (*auto-inducer*) (AI) olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (52).

QS aracılığı ile kontrol edilen davranış biçimleri, ancak bir grup bakteri tarafından gerçekleştirildiğinde fonksiyonel olabilmektedir. Bu davranış biçimleri arasında bazı *Vibrio* türlerinde ışık oluşturulması, *P.aeruginosa*’da biyofilm yapımı, *Photorhabdus luminescences*’de antibiyotik üretimi, ayrıca değişik tür bakterilerde çeşitli virülans faktörlerinin sekresyonu, sporülasyon, konjugasyon ve pigment üretimi sayılabilir (6, 49).

QS sistemine ilişkin ilk gözlemler *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* isimli iki deniz bakterisinde yapılmıştır. Bu bakteriler etraflarındaki bakteri yoğunluğunu ortamdaki besin maddelerinin azalmasını saptayarak değil, aksine ortamdaki bir molekülün yüksek yoğunlukta bulunması aracılığıyla fark etmektedirler (6). QS deniz vibriolarına özgü bir davranış biçimi değildir. Bazıları insan patojeni olan 20’den fazla bakterinin farklı moleküller aracılığıyla bu özelliği sergilediği gösterilmiştir. Bu bakteriler arasında gram negatif bakterilerden *P.aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* ve *Brucella melitensis*; gram pozitif bakterilerden ise *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* ve *Enterococcus faecalis* sayılabilir. Gram pozitif bakterilerdeki QS sinyal molekülleri gram negatiflerdeki açıl homoserin lakton (AHL) moleküllerinden farklı olarak genellikle küçük modifiye peptidlerdir (6, 52).

QS Moleküllerindeki Çeşitlilik:

Farklı mikroorganizma türlerinin genellikle farklı QS molekülleri kullandıkları bilinmektedir. Bu nedenle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar da birbirleri ile anlaşamamaktadır. Sinyal molekülleri “AHL”, “autoinducer peptidler” ve “autoinducer 2” bileşikler başta olmak üzere birkaç farklı sınıfta incelenmektedir. Her bir sınıf içerisinde yan zincir uzunluk farklılığı gibi küçük değişiklikler söz konusudur. Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülünü kullanmaktadır (53, 54).

Açıl Homoserin Lakton (LuxI/LuxR) Tipi QS İletişimi:

AHL tipi QS iletişimi daha çok gram negatif bakterilerde gösterilmiştir. Biyoluminesanstan sorumlu genler karakterize edilmiş ve iki operonda organize olmuş yedi gen (*luxR*, *luxI*, *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* ve *luxE*) tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu genlerden *luxA* ve *luxB* genleri lusiferaz enziminin alfa ve beta alt birimlerini kodlar. *luxC*, *D* ve *E* genleri ise lusiferaz enzimi sentezinde gerekli olan aldehid substratların sentezi ve geri kazanılmasında görev alır. *luxI*, AHL sentezinde gerekli olan bir gen iken, *luxR* AHL transkripsiyonunu kontrol eden

bir regülatörü kodlar. LuxR proteini ile AHL'un birleşmesi LuxR'nin üç boyutlu yapısında değişikliğe, DNA'ya bağlanabilmesine ve *lux* operonunun (*luxCDABE*) ve *luxI*'nin transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlayarak lusiferaz üretimine neden olur. *Lux* operonunun ve *luxI* geninin aktive olması daha fazla AHL üretimini doğurur ve üretilen AHL'un *LuxR* ile birleşmesinin tetiklediği bir pozitif geri besleme sağlayarak da ışımda hızlı bir artışa neden olur (53, 55).

Autoinducer-2 Tipi QS İletişimi:

Gram negatif ve pozitif birçok bakteri tarafından üretilen ve *luxS* geni tarafından kodlanan *autoinducer-2* (AI-2) tipi QS sinyal molekülleri ilk kez *V.harveyi*'de, daha sonra *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri* ve *Salmonella typhimurium* gibi birçok mikroorganizmanın kültür süpernatantlarında gösterilmiştir (55). Winzer ve ark, AI-2'nin "3(2H)-furanone" yapısında olduğunu ve yapıca "4-hydroxy-5-methyl-3 (2H)-furanone"a çok benzediğini, ancak onun bir yıkım ürünü olmadığını gözlemlemişlerdir (56).

Autoinducer Peptidler:

Özellikle gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve "*autoinducer* peptidler" (AIP) olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. AIP, gram negatif bakterilerin aksine hücre içinden dışarıya difüzyonla değil genellikle hücre zarında bulunan "ATP-binding cassette" (ABC transporter) sistemince aktif olarak salgılanır (57).

S.aureus virülans genleri, *B.subtilis* ve *S.pneumoniae*'nin kompetans (DNA alım) genleri, *B.subtilis*'de sporulasyon, *E.faecalis*'de konjugatif plazmid transferi ve laktik asid bakterilerinde bakteriosin üretimi QS molekülleri aracılığı ile kontrol edilmektedir (58).

S.aureus'da QS moleküllerinin miktarının azlığı biyofilm oluşumunu tetiklemekte, miktarının artması ise bakterilerin biyofilmden ayrılarak invazyon yapmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, QS inhibitörü varlığında üretilen biyofilmlerin de antibiyotik ve dezenfektanlara daha duyarlı oldukları bilinmektedir (53, 59). Gram pozitif bakterilerde QS sinyali olarak kullanılan bir diğer molekül ise “butyrolactone”dur (57, 60).

P.aeruginosa ve Quorum Sensing:

Gram negatif nozokomiyal enfeksiyonlar ve kistik fibrozis başta olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonlarında etken olan *P.aeruginosa*'nın pek çok virülans faktörü tanımlanmıştır. *P.aeruginosa*'da tanımlanmış bu virülans faktörlerinin QS mekanizması tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. *P.aeruginosa*'da ve çoğu gram negatif bakteride QS sinyal molekülleri açıl homoserin laktondur (61, 62). Ortamdaki bakteri sayısının artışı nedeniyle AHL konsantrasyonu çevresel ortamda arttığı zaman, intrasellüler AHL konsantrasyonunun yeterli düzeye ulaşması, transkripsiyonel düzenleyicilerin maksimum aktivasyonuna neden olur. Bu mekanizma bakterilerin koordine edilmiş gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, topluluk gibi hareket edebilmesi için iletişimini sağlar (61).

P.aeruginosa'da Lux sisteminin benzeri olan iki QS sistemi mevcuttur. Bu sistemler Las ve Rhl sistemleridir. Las sistemi LasI sentez proteini ve LasR transkripsiyonel düzenleyici proteini içerir. LasI sistemi AHL sinyal moleküllerinden “N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone” (3-O-C₁₂-HSL)'un üretiminde gereklidir. LasR, transkripsiyonel faktör aktivasyonunun başlama emrini veren “3-O-C₁₂-HSL” için gereklidir. Son zamanlarda, LasR proteininin sadece multimer formlarından “3-O-C₁₂-HSL”un varlığında özgül DNA dizilerine bağlanabildiği ve hedef genlerin transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (62 -66).

P.aeruginosa'da ikinci QS sistemi RhII ve RhIR proteinlerini içerir. RhII sentez proteini AHL sinyal moleküllerinden “*N*-butyryl-L-homoserine lactone” (C₄-HSL)'u üretirken, RhIR proteini de transkripsiyonel düzenlenmeyi sağlar. RhIR, “C₄-HSL” ile kompleks oluşturduğunda birçok genin ekspresyonu düzenlenir (62 -66).

3-O-C₁₂-HSL ve C₄-HSL'un her ikisinin bakteri dışına serbest olarak diffüze olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte 3-O-C₁₂-HSL'un diffüzyonu, C₄-HSL'un diffüzyonuna göre önemli düzeyde yavaş olmaktadır. 3-O-C₁₂-HSL'un bakteriden taşınması, MexAB-OprM pompa sistemi ile oldukça başarılı bir şekilde gerçekleşmektedir (61).

P.aeruginosa'nın patogenezinde rolü olan virulans faktörleri elastaz, alkali proteaz, LasA proteaz, fosfolipaz C, ekzotoksin A, ramnolipid ve piyosyaninin üretimi ve biyofilm oluşumu QS ile bağlantılıdır (67). QS sisteminin *P.aeruginosa* virulansındaki fonksiyonel önemi in vivo hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda açıkça gösterilmiştir (68).

Son yıllarda *QscR* olarak isimlendirilen üçüncü LuxR homologu saptanmıştır. Bu sistemin LasI ve RhII'nın transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. *QscR*, çeşitli virulans faktörlerinin üretiminin düzenlenmesinde oldukça önemlidir fakat; bu düzenlenme Las ve Rhl sistemlerinin her ikisinin ekspresyonunun kontrolüyle meydana gelmektedir (61). QS moleküllerinin saptanmasında AHL varlığını inceleyen fenotipik (enzimatik) metodların yanı sıra *las* ve *rhl* genlerinin saptanmasında *Polimerase Chain Reaction* (PCR) temelli moleküler yöntemler kullanılmaktadır (69 -73).

***P.aeruginosa*'da Biyofilm Yapımı ve Quorum Sensing:**

P.aeruginosa'da biyofilm oluşumu flagella ve *twitching* (seğirme) hareketi ile başlamaktadır (74). Biyofilm oluşumu için gerekli pH, pCO₂, divalan katyonik konsantrasyonun hidrasyon seviyesi, primidin konsantrasyonu gibi mikroçevre değişkenleri biyofilm oluşumu üzerine çok etkilidir (32).

Olgunlaşmış biyofilmi olan bakteriler, antibiyotik içeren mikrobisidal ajanlara fenotipik olarak dirençlidir. Biyofilm kronik bakteriyel enfeksiyonların farklı tiplerine neden olur (32). *P.aeruginosa*'da hastaneden kazanılmış enfeksiyonların %60'ından fazlası biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlarda biyofilm oluşumu, hastalığın şiddeti, sıklığında ve tedaviye dirençte artışa neden olmaktadır (46). Yapılan çalışmalarda normal biyofilm olgunlaşması için QS sisteminin gerekli olduğu gösterilmiştir. *P.aeruginosa*'da QS fonksiyonları gen ekspresyonu ile kontrol edilmektedir ve bu yolla bakteri, biyofilm yapısı şeklinde organize olabilmektedir (75).

P.aeruginosa'nın yüzeye bağlanmasından sonra, bakteri hücreleri katı yüzey üzerinde tabaka şeklinde çoğalmaya başlarlar. Tabaka içindeki bakteri hücreleri, tabakanın yüzeyinde *twitching* hareketi sergilerler. *P.aeruginosa*'da bu hareket Tip IV piliye bağlıdır. *Twitching* hareketi sonucunda *P.aeruginosa*'nın mikrokoloni formları olarak adlandırılan küçük grupları oluşur. Mikrokoloniler daha sonra olgun biyofilm oluşturmak üzere farklılaşırlar. Olgun biyofilmdeki mikrokoloniler mantar şekline benzer yapılara sahiptirler. Bu yapı içindeki hücreler, ekstrasellüler polisakkarit matriks içinde örtülü halde bulunurlar. Biyofilmdeki su kanalları, içeriye besin akımını ve dışarıya atık ürünleri atarak bu yapıyı canlandırırlar. Tip IV pili mutasyonunda biyofilmin tipik mantar şeklindeki yapıları meydana gelemez. Pilus yapısında yer alan tip I (LecA) ve tip II lektin (LecB) yokluğunda olgunlaşmamış, ince biyofilm oluşur. LecA ve LecB üretimi QS sistemi tarafından düzenlenmektedir (76, 77, 78).

Yapılan çeşitli çalışmalarda ramnolipid sentezi için gerekli olan *rhIA* geninin, *P.aeruginosa*'da biyofilm başlangıç, gelişim, olgunlaşma ve dağılım aşamalarında önemli rol aldığı kanıtlanmıştır. Ramnolipid üretimi QS tarafından düzenlenir ve RhlR-C₄-HSL kompleks aktivasyonu ile *rhIA* gen transkripsiyonu gerçekleşmektedir (79). Ramnolipid, olgun biyofilmin mantarimsı yapısının oluşumunda ana faktörlerden biridir ve *rhIA* mutasyonunda ince, yassı biyofilm oluşumu meydana gelir (80).

QS genlerinden özellikle *lasI* geninin *P.aeruginosa* PAO-1 türünde olgun biyofilm oluşumu için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (81, 45). *lasI* geninde mutasyon, biyofilm olgunlaşmasında belirgin bir etki oluşturur. *lasI* mutantları 3-O-C₁₂-HSL sentezinde yeteneksizdir. *lasI* mutant *P.aeruginosa*'da biyofilm gelişimi mikrokoloni formasyonundan sonra durmaktadır ve bu duraklama kalın biyofilm yapısı içinde bir araya toplanmış mikrokolonilerin olgunlaşmasından öncedir. Bu yüzden *lasI* mutant biyofilmler, düz ve farklılaşmamış gibi görülmektedir. Normal biyofilm yapısı *lasI* tarafından yönetilen QS sinyali olan 3-O-C₁₂-HSL'un ilavesiyle yeniden yapılandırılabilir (82). *lasI* mutant biyofilmler, sodyum dodesil sülfat (SDS) benzeri deterjanlara duyarlı iken, vahşi tip biyofilmler dirençlidirler. *lasR* mutantların biyofilm fenotipleri *lasI* mutantların biyofilm yapısına benzerdir. *rhII* mutantları normal biyofilm gelişimi ve mimarisi gösterirler (82).

Biyofilm ve QS araştırmaları *P.aeruginosa*'nın bir topluluk olarak davranabildiğini desteklemektedir. Hem biyofilm hem de QS, *P.aeruginosa*'nın patogeneğinde rol oynar (82). QS sistemi hem biyofilm oluşumunda hem de biyofilmin korunmasında önemli role sahiptir. QS sistemi tarafından düzenlenen katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri biyofilmin hidrojen peroksit direncini sağlar. Yapılan çalışmalarda QS mutant biyofilmlerin polimorfonükleer hücrelerin fagositozuna ve antimikrobiyal tedaviye duyarlı olduğu gösterilmiştir. Antimikrobiyal tedavilerde *P.aeruginosa*'nın QS mekanizmaları hedeflenirse anormal biyofilm formasyonu oluşumu aracılığı ile tedaviye yardımcı olunabilir (83, 84, 85).

***P.aeruginosa* Patogenezinde QS Genlerinin Rolü:**

Bakterinin kolonize olduğu bölge ve konağın durumu *Pseudomonas* cinsi bakterilerin patojenitesine etki eden en önemli faktörlerdir. Hastalığın oluşabilmesi için ilk kriter patojenin uygun bölgeye yerleşebilmesidir. Deri ve mukozaların yapısının bozulduğu veya immun sistemin baskılandığı durumlarda kolonize olur ve yerel yayılımla sistemik hastalığa neden olur. Hücresel hasar *Pseudomonas* cinsi bakterilerin epitel hücrelerine yerleşmesinde belirleyici rol oynar. Epitel hücrelerinin virüsle enfeksiyonu ya da endotrakeal entübasyon sonucu oluşan hasar benzer sonuçlara yol açar. Bu fenomene “oportunistik aderans” denir ki *Pseudomonas* cinsi bakteri enfeksiyonlarının patogenezinde önemli bir başlatıcı adımdır (7, 86).

QS aracılığı ile kontrol edilen genler, bakteri-konak ilişkisinde rol alan virülans faktörlerinin ve genlerin üretiminin düzenlenmesini sağlar. QS sisteminin tip IV pili sentezi ve tip III sekresyon sistemindeki düzenleyici rolü *P.aeruginosa* patogenezinde oldukça önemlidir (45). İmmünolojik yöntemlerle in vitro koşullarda insan lökositlerinde QS sinyal molekülleri gösterilmiştir (84). QS etkisi ile immün sistem aktivasyonu yanı sıra lenfosit proliferasyonunun baskılanması, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve IL-12 üretiminin azalması meydana gelmektedir. İn vivo koşullarda QS sinyal molekülleri T hücre aktivasyonu ile gama interferon benzeri inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırmaktadır. Bunun sonucu olarak Th-2’ nin (T helper cell-2) aktifleşmesinin öncü olduğu doku hasarı ve inflamasyon meydana gelmektedir (87).

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Suşlar:

Çalışmaya 2006-2007 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *P.aeruginosa* olarak tanımlanan 100 tane suş alındı.

Çalışmaya alınan örneklerin 50 tanesi alt solunum yolu örneklerinden (trakeal aspirat ve balgam), 50 tanesi solunum yolu dışı örneklerden (idrar, kan, yara ve diğer) izole edilmiş suşlardı. Suşlar çalışma anına kadar uygun koşullar altında saklandı. Çalışmada kontrol suş olarak *P.aeruginosa* PAO-1 suşu kullanıldı (PAO-1 suşu Prof. Dr. J. Colmer Hamood ve Abdul N. Hamood aracılığı ile Texas Tech University Health Sciences Center'dan temin edilmiştir).

Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Duyarlılık zon çapları CLSI-2008 standartlarına göre yorumlandı (88).

Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi:

Biyofilm yapımının değerlendirilmesinde daha önce tanımlanan mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanıldı (89, 90).

Deney öncesi tüm suşların %5 kanlı agarda 37°C’ de bir gece inkübasyonla taze pasajları yapıldı. Deney için cam tüplere dağıtılan 2 ml’lik *Luria-Bertani* (LB) *broth* besiyerlerine her bakterinin 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı ve 37°C’de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yoğunlaşan bakteri süspansiyonlarından LB *broth* besiyerleri içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında yeni süspansiyonları hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonlarından 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının her kuyucuğuna 100’er µl dağıtıldı ve 37°C’de 1 gece inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra sıvı besiyerleri dökülüp, her kuyucuk distile su ile 3 kez yıkandı. Yıkama sonrası kuyucukların içindeki sıvı iyice aspire edildi. Daha sonra her kuyucuğa %0,1’lik kristal viyole solüsyonundan 125 µl dağıtıldı ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası her kuyucuk bir önceki şekilde olduğu gibi 3 kez iyice yıkandı ve kurutuldu. Daha sonra kuyucuklara %95 konsantrasyonda etanol solüsyonundan 200 µl kondu. 10 dakika sonra yeni bir mikrotitrasyon plağına bu kuyucuklardan 100 µl aktarıldı ve kuyucukların absorbansları ELiSA okuyucu ile 550 nm. dalga boyunda ölçüldü. Her bir suş için test 3 kez tekrarlandı (89).

Test sonuçları PAO-1 suşunun absorbans değerleri %100 kabul edilerek karşılaştırmalı olarak yorumlandı ve sonuçlar “PAO-1 biyofilm yüzdesi” şeklinde değerlendirildi (91).

***Quorum Sensing* Genlerinin Saptanması:**

Çalışmada biyofilm özellikleri belirlenmiş olan suşlardan PAO-1'e göre zayıf biyofilm oluşturan 30 suş (%25 ve altı 17 suş, %25-50 arası 13 suş) ve kuvvetli biyofilm oluşturan 10 suşun QS genleri araştırıldı. Çalışmaya alınan suşların QS genleri daha önce tanımlanmış primerler kullanılarak kromozomal DNA'nın PCR yöntemi ile amplifikasyonu ile saptandı (91).

Bakteri DNA'sının Elde Edilmesi:

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde 2 ayrı yöntem kullanıldı. QS genleri çalışılan 40 suşun hepsinden ilk olarak kaynatma yöntemi ile DNA elde edildi ve PCR çalışmasına alındı. PCR çalışması sonucunda herhangi bir gende amplifikasyon ürünü elde edilemeyen suşlardan ikinci kez hazır ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yeniden DNA elde edildi ve bu elde edilen yeni DNA'lar ikinci kez doğrulamak amacıyla bir kez daha PCR çalışmasına alındı.

1.Kaynatma yöntemi:

Bakterilerin LB *broth* besiyerinde 1 gecelik inkübasyonları sonucu oluşan süspansiyonlarından 1'er ml alınarak ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra ependorf tüpler 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Dipte kalan çökelti üzerine 200 µl distile su ilave edilerek kaynatıldı ve tekrar 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst sıvıdan 150 µl alındı ve çözelti kalıp DNA olarak kullanıldı (92).

2.DNA ekstraksiyon cihazı ile DNA elde edilmesi:

Bu yöntemde DNA eldesi için FUJIFILM marka (QuickGene-Mini80, Life Science) DNA ekstraksiyon cihazı ve ekstraksiyon kiti (QuickGene DNA tissue kit, Life Science) ile üretici firmanın önerdiği *P.aeruginosa* için tasarlanmış DNA ekstraksiyon protokolü kullanıldı.

%5 kanlı agar besiyerinde 1 gecelik inkübasyonla taze pasajları yapılan *P.aeruginosa* kolonilerinden 2 ml’lik LB *broth* besiyeri içerisine 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı ve bu süspansiyonlar 1 gece 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra elde edilen bu süspansiyonlardan 1’er ml ependorf tüplere aktarıldı. Ependorf tüpler öncelikle 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım mikropipetle alındı ve atıldı. Oluşan bakteri pelleti üzerine 180 µl *tissue lysis buffer*, 20 µl *proteinase K* ilave edildi ve pipetleme ile solüsyonlar ve pellet iyice karıştırıldı.

Daha sonra ısı bloğu aracılığı ile 55°C’de 15 dakika inkübe edilen bakteri süspansiyonuna 180 µl *lysis buffer* eklendi ve ependorf tüpü 15 saniye spin santrifüj yapıldı ve 70°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 240 µl %99’luk etanol eklendi ve 15 saniye spin santrifüj yapıldı ve üstteki süpernatant kısmı DNA eldesi için kullanıldı.

Elde edilen süpernatant, DNA ekstraksiyon cihazının kartuşlarına aktarıldı. Kartuşlar öncelikle cihazın “wash” konumuna yerleştirildi. Süpernatantlara 3’er kez 750 µl *wash buffer* eklenerek 3 ayrı yıkama yapıldı. Her bir yıkamada cihaz 1 dakika süre ile çalıştırıldı.

Son yıkamanın ardından kartuşlar cihazın “elution” konumuna yerleştirildi. Süpernatantlar üzerine 200 µl *elution buffer* eklendi. Oluşan süspansiyon 90 saniye oda ısısında tutulduktan sonra cihaz tekrar 1 dakika süre ile çalıştırıldı. Elde edilen süspansiyon kalıp DNA olarak kullanıldı. Her iki yöntemle de elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

QS Genlerinin Amplifikasyonu:

Çalışmada QS’de rol alan *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genleri içinde değişik bölgelere uyan, daha önce tasarlanmış olan oligonükleotid primerlerden oluşan 2 farklı set (intakt gen ampikonları için 1 set ve internal fragment ampikonları için 1 set) kullanıldı (91). Kullanılan primerler Tablo – 1’ de gösterilmiştir.

Tablo - 1: *Quorum sensing* gen ampikonları için kullanılan primerler

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
İntakt QS gen ampikonları için		
<i>lasI</i>	5’-ATGATCGTACAAATTGGTCGGC-3’	5’-GTCATGAAACCGCCAGTCG-3’
<i>lasR</i>	5’- ATGGCCTTGGTTGACGGTT-3’	5’-GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA-3’
<i>rhlI</i>	5’-CTTGGTCATGATCGAATTGCTC-3’	5’-ACGGCTGACGACCTCACAC-3’
<i>rhlR</i>	5’-CAATGAGGAATGACGGAGGC-3’	5’-GCTTCAGATGAGGCCAGC-3’
İnternal QS gen ampikonları için		
<i>lasI</i>	5’-TCGACGAGATGGAAATCGATG-3’	5’- GCTCGATGCCGATCTTCAG-3’
<i>lasR</i>	5’-TGCCGATTTTCTGGGAACC-3’	5’-CCGCCGAATATTTCCCATATG-3’
<i>rhlI</i>	5’-CGAATTGCTCTCTGAATCGCT-3’	5’-GGCTCATGGCGACGATGTA-3’
<i>rhlR</i>	5’-TCGATTACTACGCCTATGGCG-3’	5’-TTCCAGAGCATCCGGCTCT-3’

PCR amplifikasyon karışımı toplam 50 µl olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi düzenlendi. Gen amplifikasyonunda her bir örnek için;

10X “Amplifikasyon Buffer”	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTP miks (2 mM)	1.25 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl
Primer Forward (50 pmol)	1 µl
Primer Reverse (50 pmol)	1 µl
Distile Su	34.25 µl
DNA	2 µl
TOPLAM	50 µl PCR karışımı

kullanıldı.

PCR koşulları daha önceden tanımlandığı gibi aşağıdaki şekilde uygulandı
(90) :

a)İnternal fragmentler için PCR koşulları:

Ön Denatürasyon	95 °C' de	5 dk.	32 döngü
Denatürasyon	95 °C' de	30 sn.	
Primer bağlanması	59 °C' de	60 sn.	
Primer uzaması	72 °C' de	90 sn.	
Ek uzama	72 °C' de	10dk.	

b)İntakt gen amplikonları için PCR koşulları:

Denatürasyon	94 °C' de	30 sn.	34 döngü
Primer bağlanması	50 °C' de	30 sn.	
Primer uzaması	72 °C' de	2 dk.	
Ek uzama	72 °C' de	10 dk.	

Yukarıda belirtilen şekilde PCR koşulları düzenlendi ve örneklerin amplifikasyonları yapıldı. DNA amplifikasyonu için “termal cycler”(Mycycler, BIO-RAD, USA) kullanıldı.

Agaroz jel hazırlanışı (%1) :

Agaroz	0.5 gr
1XTBE	50 ml
Etidyum bromür	1,25 µl

1XTBE solüsyonu hazırlanışı:

5XTBE solüsyonu 1/5 sulandırılarak dilüe edildi ve tampon solüsyon olarak kullanıldı.

5XTBE solüsyonu	50 ml
Distile su	200 ml.

Amplifikasyon ürünleri 100 volt akımda 45 dakika, *ethidium bromide* ile boyanmış %1'lik agaroz jelde yürütüldü (91). Elektroforez sonrası jeller UV ışığı altında ve CCD kamera (Gel Logic 2200, KODAK, USA) ile görüntülenerek fotoğraflandı.

Tablo - 2’de belirtilen amplifikasyon ürünleri *P.aeruginosa* PAO-1 kontrol suşu ve “Heliosis 100 bp DNA Q-Ladder” marker kullanılarak değerlendirildi.

Tablo - 2: *Quorum sensing* genleri için amplifikasyon sonrası beklenen gen büyüklükleri

QS Genleri	İntakt Genler	İnternal Fragmentler
<i>lasI</i>	605 bç	363 bç
<i>lasR</i>	725 bç	362 bç
<i>rhlI</i>	625 bç	143 bç
<i>rhlR</i>	730 bç	207 bç

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Araştırma verilerinin analizinde “SPSS for Windows Ver. 13.0” paket programı kullanıldı. Biyofilm yapımı ile antibiyotik direnç oranları ve QS genlerinin karşılaştırılmasında Pearson ve Fisher’in kesin ki kare testi uygulandı. p değerinin <0.05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2006–2007 yılları arasında farklı klinik servislerden gönderilen hasta örneklerinden izole edilen 100 tane *P.aeruginosa* suşu çalışmaya alındı.

Çalışmaya alınan toplam 100 suşun 50 tanesi alt solunum yolu örneklerinden, 50 tanesi solunum yolu dışı örneklerden oluştu. Suşların %37'si trakeal aspirat, %13'ü balgam, %21'i idrar, %7'si kan, %11'i yara ve %11'i diğer örneklerle aitti. Çalışmaya alınan suşların örneklere göre dağılımı Tablo - 3'de verilmiştir.

Tablo - 3: Sistemlere göre örneklerin dağılımı

Örneklerin Alındığı Sistemler	Örnek türü	Örnek Sayısı (%)
Alt Solunum Yolu (n:50)	Trakeal aspirat	37 (37)
	Balgam	13 (13)
Solunum Yolu Dışı (n:50)	İdrar	21 (21)
	Kan	7 (7)
	Yara	11 (11)
	Diğer	11 (11)
TOPLAM		100 (100)

Biyofilm yapımı yönünden çalışmaya alınan suşlar incelendiğinde PAO-1'in biyofilm absorbans değerlerine göre, çalışmaya alınan suşlardan 38 tanesinin %50 ve altında (zayıf), 46 tanesinin %50-%100 arasında (orta kuvvetli), 16 tanesinin %100'ün üzerinde (kuvvetli) biyofilm yaptıkları saptandı.

Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşların yaptığı biyofilm düzeyleri ile diğer sistem örneklerinden izole edilen suşların yapmış oldukları biyofilm düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Örnek gruplarına göre biyofilm yapım şiddeti Tablo - 4'de verilmiştir.

Tablo - 4: Alt solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen suşların biyofilm yapım şiddeti

	Alt Solunum Yolu	Solunum Yolu Dışı	TOPLAM
Biyofilm şiddeti	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Zayıf Biyofilm	20 (40)	18 (36)	38 (38)
Orta Kuvvetli Biyofilm	21 (42)	25 (50)	46 (46)
Kuvvetli Biyofilm	9 (18)	7 (14)	16 (16)
TOPLAM	50 (100)	50 (100)	100 (100)

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde en yüksek direncin %84 oranında sefotaksime karşı olduğu görüldü. İkinci en yüksek direnç %67 oranında aztreonamda ve %63 oranında gentamisinde görülürken, diğer antibiyotiklerin direnç oranları %45 ve altında bulundu. Örnek türlerine (trakeal aspirat, balgam, kan, idrar vs.) göre antibiyotik direnci incelendiğinde, örnek türleri arasında antibiyotik dirençleri yönünden istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Çalışmaya alınan suşlarda elde edildikleri örnek gruplarına göre antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında alt solunum yolu örneklerinin aztreonam, meropenem ve imipenem, solunum yolu dışı örneklerle göre daha dirençli olduğu saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Tablo – 5).

Tablo - 5: Suşların örnek gruplarına göre antibiyotik direnç oranları

	Alt Solunum Yolu Örnekleri (n:50)	Solunum Yolu Dışı Örnekler (n:50)	TOPLAM (n:100)
Antibiyotikler	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Sefotaksim	44 (88)	40 (80)	84 (84)
Seftazidim	39 (78)	34 (68)	73 (73)
Gentamisin	33 (66)	30 (60)	63 (63)
Aztreonam*	39 (78)	28 (56)	67 (67)
Piperasilin	17 (34)	11 (22)	28 (28)
Siprofkoksasin	20 (40)	16 (32)	36 (36)
Tobramisin	13 (26)	11 (22)	24 (24)
Amikasin	14 (28)	9 (18)	23 (23)
Meropenem*	24 (48)	14 (28)	38 (38)
İmipenem*	29 (58)	16 (32)	45 (45)

* $p<0.05$

Zayıf biyofilm ve kuvvetli biyofilm yapan suşlar antibiyotik direnci yönünden karşılaştırıldığında kuvvetli biyofilm yapan grubun antibiyotiklere daha dirençli olduğu saptandı ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Bunun yanı sıra zayıf biyofilm yapan grubun kuvvetli biyofilm yapan gruba göre sadece sefotaksim ve amikasinine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha dirençli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Biyofilm yapımı araştırılan ve PAO-1 suşuna göre %50'den daha düşük, zayıf biyofilm yapan 30 suş ile %100'ün üzerinde, kuvvetli biyofilm yapan 10 suşun QS genleri PCR yöntemi ile araştırıldı (Tablo - 6).

QS gen çalışmasına alınan toplam 40 suşdan 21 tanesi (%52.5) alt solunum yolu örneklerinden, 19 tanesi (%47.5) solunum yolu dışı sistemlere ait örneklerden izole edilmişti.

QS gen çalışmasına alınan suşlarda, PAO-1'e göre zayıf biyofilm yapan suşlardan 16'sı alt solunum yolu örneklerinden, 14'ü ise solunum yolu dışı örneklerden izole edilen suşlardan oluşmuştu. Kuvvetli biyofilm yapan 10 suştan 5'i alt solunum yolu örneklerinden; 5'i de solunum yolu dışı sistemlerden izole edilen suşlardı (Tablo - 6).

Tablo - 6: *Quorum sensing* genleri çalışılan suşların biyofilm düzeylerine göre dağılımı

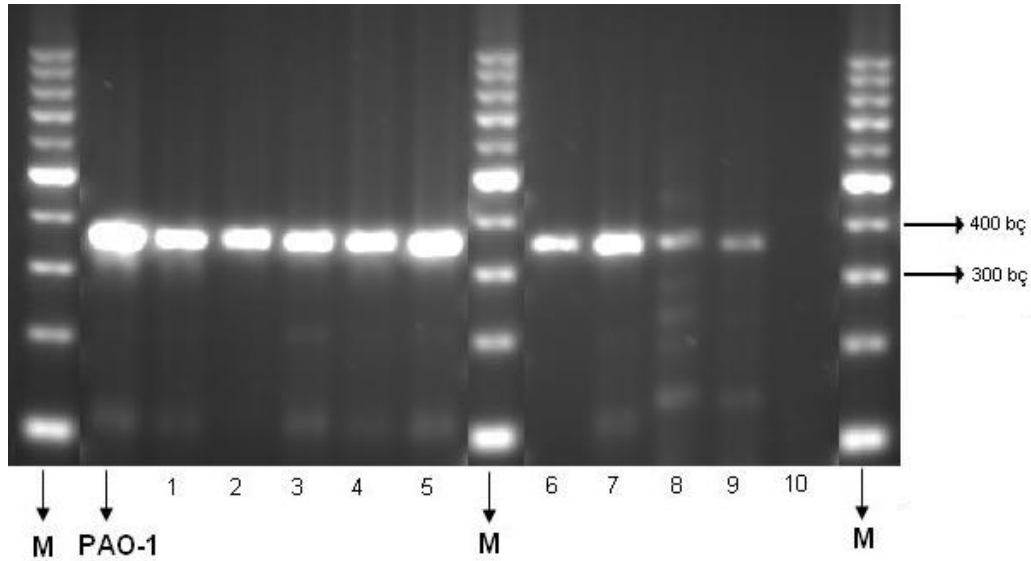
Suşların İzole Edildiği Sistemler	Zayıf Biyofilm	Kuvvetli Biyofilm
	Sayı (%)	Sayı (%)
Alt Solunum Yolu	16 (53.3)	5 (50)
Solunum Yolu Dışı	14 (46.7)	5 (50)
TOPLAM	30 (100)	10 (100)

QS genlerine ait bant büyüklükleri her deneyde PAO-1 suşu kullanılarak doğrulandı ve amplifikasyon sonrası jel görüntüleri PAO-1'e göre değerlendirildi.

lasI Geninin Amplifikasyon Sonuçları

QS genlerinden olan *lasI* geninin varlığı 40 suş üzerinde araştırılmıştır. Çalışmada *lasI* geninin varlığı internal ve intakt genlere spesifik primer dizileri kullanılarak incelendi. Kontrol suş PAO-1 kullanılarak yapılan çalışmada öngörüldüğü şekilde *lasI* geni internal bölgeye ait bant 363 bp'de, intakt bölgeye ait bant 605 bp'de saptanmıştır (Şekil – 1, Şekil – 2).

Çalışılan suşların *lasI* internal genlerinin varlığı Şekil - 1'de verilmiştir.



Şekil - 1: *lasI* internal geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker),

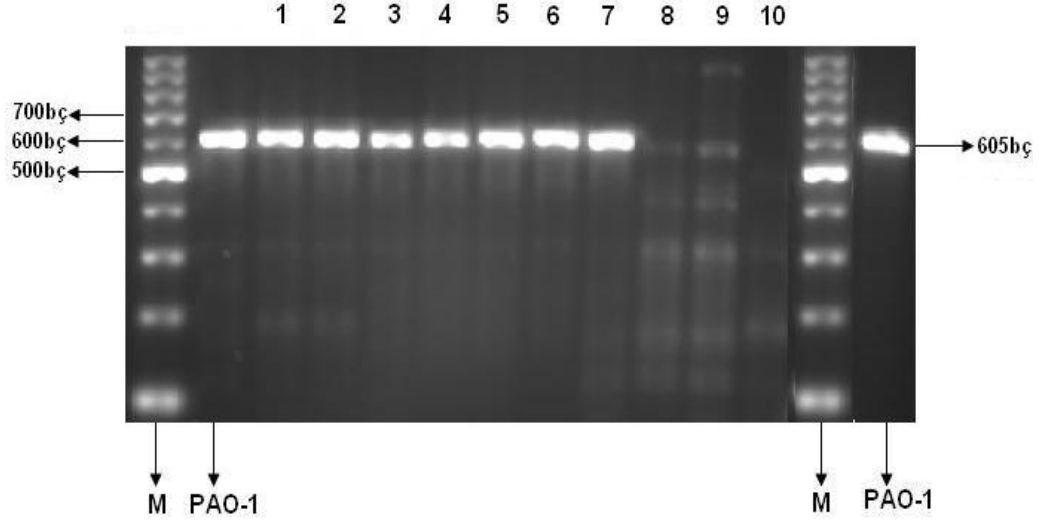
PAO-1: pozitif kontrol (363 bp. seviyesinde bant),

1-9 nolu kuyucuklar pozitif suşlar,

10 nolu kuyucuk negatif suş (bant yokluğu mevcut).

Çalışmada *lasI* internal geninin varlığının incelendiği 40 suştan 3'ünde 363 bp seviyesinde amplifikasyon saptanmamıştır.

Çalışılan suşların *lasI* intakt genlerine ait jel görüntüleri de Şekil - 2'de verilmiştir.



Şekil - 2: *lasI* intakt geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker),

PAO-1: pozitif kontrol (605 bç. seviyesinde pozitif bant),

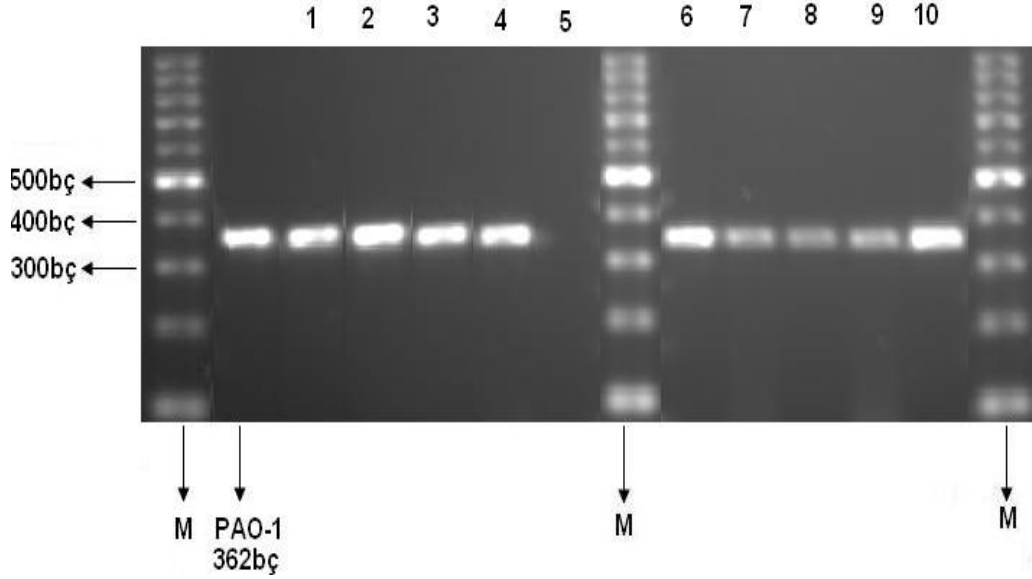
1-9 nolu kuyucuklar pozitif suşlar,

10 nolu kuyucuk negatif suş

Çalışmada incelenen 40 suştan 2'sinde *lasI* intakt genini belirten 605 bç seviyesinde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Aynı zamanda *lasI* internal genlerinde de amplifikasyon saptanmayan bu iki suş, kan ve trakeal aspirat örneklerinden elde edilen suşlardır.

lasR Geninin Amplifikasyon Sonuçları

Çalışmada beklendiği şekilde *lasR* geni internal bölgeye ait bant 362 bç'de, intakt bölgeye ait bant 725 bç'de saptanmıştır. *lasR* internal genine ait jel görüntüsü Şekil – 3'de verilmiştir.



Şekil - 3: *lasR* internal geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

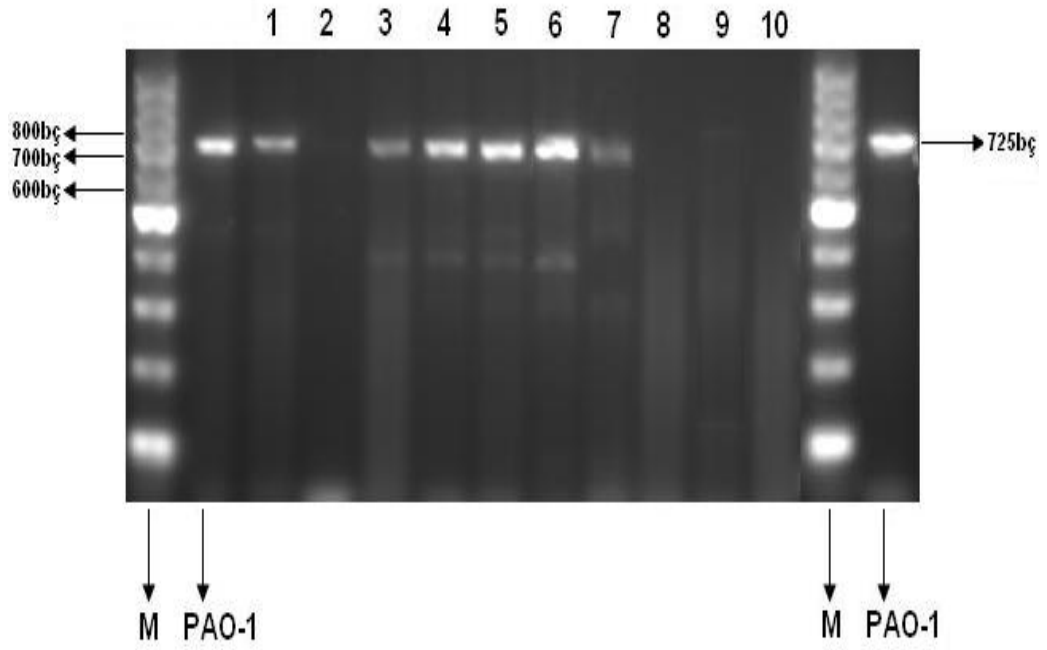
PAO-1: pozitif kontrol (362 bç. seviyesinde pozitif bant)

1-4 ve 6-10 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

5 nolu kuyucuk negatif suş

Çalışmada incelenen 40 örnekten sadece 1'inde *lasR* internal genine uyan bölgede amplifikasyon saptanmamıştır. Amplifikasyonun saptanmadığı bu suş bir balgam örneğinden izole edilmiştir.

lasR intakt genine ait jel görüntüsü Şekil – 4’de verilmiştir.



Şekil - 4: *lasR* intakt geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

PAO-1: pozitif kontrol (725 bç. seviyesinde pozitif bant)

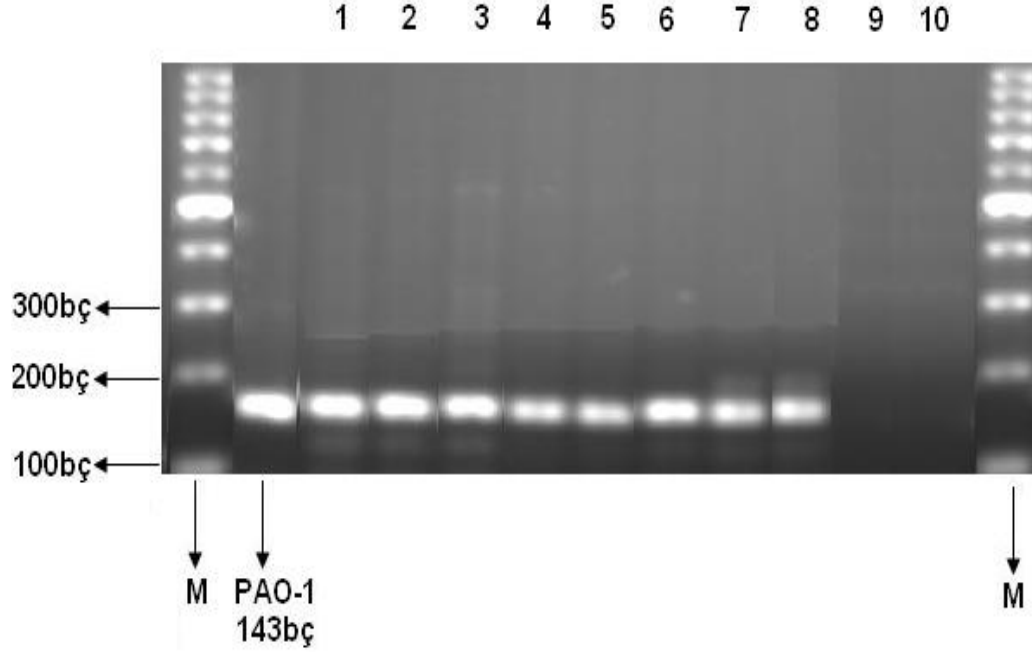
1, 3-7 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

2, 8, 9, 10 nolu kuyucuklar negatif suşlar

Çalışmada QS genlerinin varlığının incelendiği toplam 40 örnekten 11’inde *lasR* intakt gen bölgesinde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır.

***rhII* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

Öngörüldüğü gibi *rhII* geni internal bölgeye ait bant 143 bç seviyesinde, intakt bölgeye ait bant 625 bç seviyesinde saptanmıştır (Şekil – 5, Şekil - 6).



Şekil - 5: *rhII* internal geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

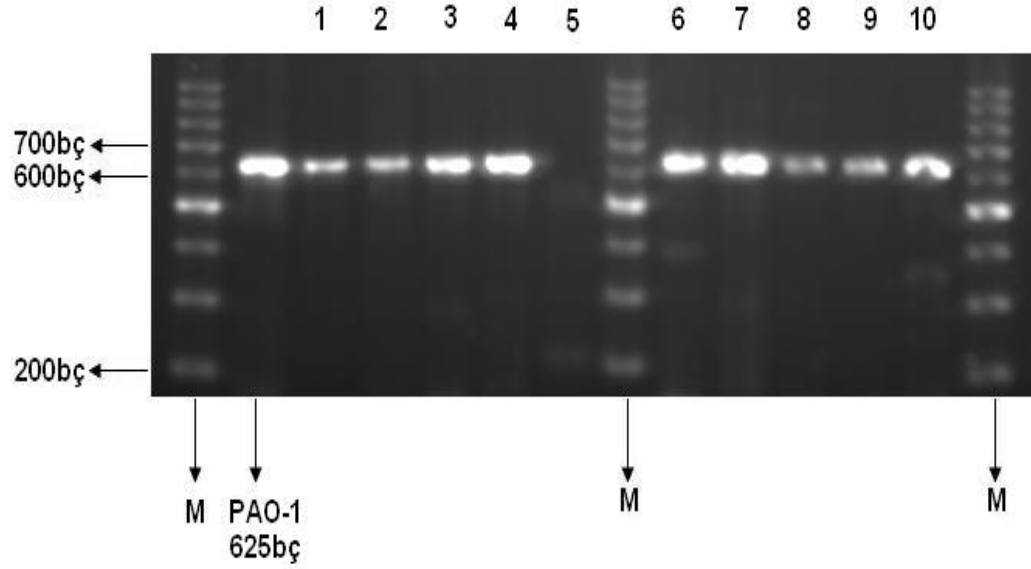
PAO-1: pozitif kontrol (143 bç. seviyesinde pozitif bant)

1-8 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

9 ve 10 nolu kuyucuklar negatif suşlar

Çalışmada *rhII* internal geni açısından incelenen 40 örnekten 3'ünde 143 bç. büyüklüğünde amplifikasyon saptanmamıştır. Bu suşların 3'ü de balgam örneklerinden izole edilen suşlardır.

Çalışılan suşlara ait *rhII* intakt genine ait jel görüntüsü Şekil – 6’da verilmiştir.



Şekil - 6: *rhII* intakt geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

PAO-1: pozitif kontrol (625 bç. seviyesinde bant varlığı)

1-4 ve 6-10 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

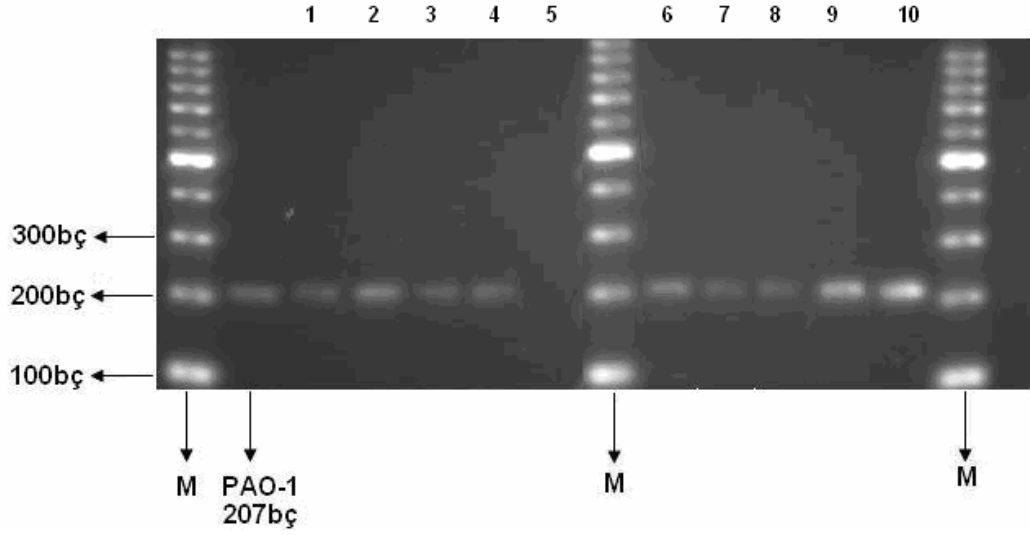
5 nolu kuyucuk negatif suş

Çalışmada *rhII* intakt gen varlığı açısından incelenen 40 suştan 5’inde amplifikasyon saptanmamıştır. Bu suşların 2’si balgam örneklerinden, 1’i idrar, 1’i trakeal aspirat ve 1’i kan örneğinden izole edilmiştir.

rhIR Geninin Amplifikasyon Sonuçları

rhIR geni internal bölgeye ait bant 207 bç büyüklüğünde, intakt bölgeye ait bant 730 bç büyüklüğünde saptanmıştır (Şekil – 7, Şekil – 8).

Çalışılan suşların *rhIR* internal genine ait jel görüntüsü Şekil – 7’de verilmiştir.



Şekil - 7: *rhIR* internal geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

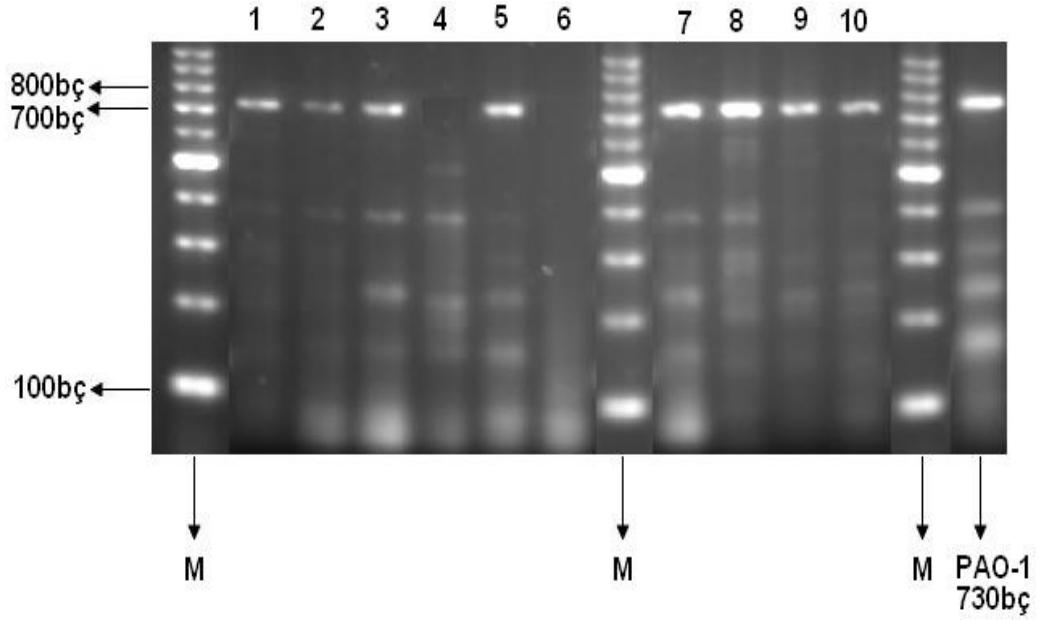
PAO-1: pozitif kontrol (207 bç. seviyesinde pozitif bant)

1-4, 6-10 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

5 nolu kuyucuk negatif suş

Çalışmada incelenen toplam 40 suşun 3’ünde *rhIR* internal geninde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Bu 3 suşun 1’i trakeal aspirat, 1’i balgam ve 1’i idrar örneğinden izole edilmiştir.

Çalışılan suşların *rhIR* intakt genine ait jel görüntüsü Şekil – 8’de verilmiştir.



Şekil - 8: *rhIR* intakt geni jel görüntüsü

M: moleküler ağırlık standardı (DNA Q ladder marker)

PAO-1: pozitif kontrol (730 bç. seviyesinde pozitif bant)

1-3, 5, 7-10 nolu kuyucuklar pozitif suşlar

4 ve 6 nolu kuyucuklar negatif suşlar

rhIR intakt geninin varlığı açısından incelenen bütün örneklerle baktığımızda 40 suştan 14 tanesinde amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. Bu 14 suşun 5'i trakeal aspirat, 3'ü kan, 3'ü balgam, 2'si idrar ve 1'i de boğaz örneğinden izole edilen suşlardır.

QS genlerinin araştırıldığı suşlardan herhangi bir amplifikasyon ürünü saptanmayan suşlarda hazır ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yeniden DNA elde edildi ve yeni elde edilen DNA'lar ile PCR çalışması tekrarlandı. İkinci PCR çalışmasında da ilk çalışma ile aynı sonuçlar alındı.

Çalışmaya alınan suşların QS gen amplifikasyon sonuçları toplu olarak Tablo - 7’de verilmiştir.

Tablo - 7: *Quorum sensing* gen amplifikasyon sonuçları

QS Genleri	Amplifikasyon Pozitif	Amplifikasyon Negatif	TOPLAM
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
<i>lasI</i> İnternal	37 (92.5)	3 (7.5)	40 (100)
<i>lasI</i> İntakt	38 (95.0)	2 (5.0)	40 (100)
<i>lasR</i> İnternal	39 (97.5)	1 (2.5)	40 (100)
<i>lasR</i> İntakt	29 (72.5)	11 (27.5)	40 (100)
<i>rhII</i> İnternal	37 (92.5)	3 (7.5)	40 (100)
<i>rhII</i> İntakt	35 (87.5)	5 (12.5)	40 (100)
<i>rhIR</i> İnternal	37 (92.5)	3 (7.5)	40 (100)
<i>rhIR</i> İntakt	26 (65.0)	14 (35.0)	40 (100)

QS gen sonuçlarına göre aynı gene ait hem internal hem de intakt gen bölgesine ait amplifikasyon ürünü yokluğu saptanan suşlarda gene ait total kayıp olduğu kabul edildi. QS genleri çalışılan 40 suş içerisinde total gen kaybı olduğu görülen 5 suşun 2’sinde sadece *lasI*, 1’inde sadece *rhII*, 1’inde sadece *rhIR* geninde internal ve intakt fragmentler saptanmazken, 1 suшта hem *lasR*, hem *rhII* ve hem de *rhIR* geninin total kaybı saptandı. Bu 5 suşun 4’ü zayıf biyofilm, 1’i kuvvetli biyofilm yapan suşlardı. Birden fazla total gen kaybı sadece zayıf biyofilm yaptığı saptanan ve balgam örneğinden izole edilen 1 suşda görüldü. QS total gen kaybı saptanan 5 suşun örnek türleri ve gen sonuçları tabloda verilmiştir (Tablo - 8).

Tablo - 8: Örnek türlerine göre *quorum sensing* total gen kaybı bulunan suşlar

Örnek türü	<i>lasI</i> internal	<i>lasI</i> intakt	<i>lasR</i> internal	<i>lasR</i> intakt	<i>rhII</i> internal	<i>rhII</i> intakt	<i>rhIR</i> internal	<i>rhIR</i> intakt
Trakeal aspirat	-	-	+	+	+	+	+	+
Kan	-	-	+	-	+	+	+	-
Balgam	+	+	-	-	-	-	-	-
Balgam	+	+	+	+	-	-	+	-
İdrar	+	+	+	-	+	-	-	-

Örneklerin alındığı gruplara göre incelendiğinde, QS total gen kaybı olan 3 suşun alt solunum yolundan, 2 suşun ise solunum yolu dışı örneklerden izole edildiği görüldü. Gen defekti ile örneklerin alındığı sistemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo – 9).

Tablo - 9: Örnek gruplarına göre *quorum sensing* total gen kaybı olan suşların dağılımı

Örnek Grupları	Gen(-)suş sayısı	Gen(+) suş sayısı	TOPLAM
Alt solunum yolu	3	18	21
Solunum yolu dışı	2	17	19
TOPLAM	5	35	40

Total gen kaybı saptanan suşların biyofilm özellikleri değerlendirildiğinde zayıf biyofilm yapan 4 örnekte en az 1 QS geninde total kayıp görülürken, kuvvetli biyofilm yapan örneklerden sadece 1 tanesinde, 1 gende total gen kaybı saptandı (Tablo - 10). Zayıf biyofilm yapan suşlar ile kuvvetli biyofilm yapan suşlar arasında total QS gen kaybı açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo - 10: Biyofilm oranlarına göre *quorum sensing* total gen kaybı olan suşların dağılımı

Biyofilm düzeyi	QS Gen (-) suş sayısı	QS Gen (+) suş sayısı	TOPLAM
Zayıf Biyofilm	4	26	30
Kuvvetli Biyofilm	1	9	10
TOPLAM	5	35	40

Biyofilm düzeylerine göre gen kayıplarını ayrıntılı incelediğimizde zayıf biyofilm yapan grupta *lasI*, *lasR* ve *rhII* genlerindeki kaybın, kuvvetli biyofilm yapan gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür (Tablo - 11).

Tablo – 11: Total gen kaybı saptanan suşların *quorum sensing* genlerinin biyofilm düzeylerine göre dağılımı

Biyofilm oranları	<i>lasI</i> (-)	<i>lasR</i> (-)	<i>rhII</i> (-)	<i>rhIR</i> (-)
Zayıf biyofilm	2	1	2	1
Kuvvetli biyofilm	0	0	0	1

TARTIŞMA

P.aeruginosa, immün yetmezliği olan, uzun süre antibiyotik kullanan ya da radyoterapi alan, malign yada metabolik hastalığı bulunan, yaşı, HIV ile enfekte, kistik fibrozisli, geniş ağır yanıklı kişilerde en önemli fırsatçı enfeksiyon etkenlerinden biridir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (93).

Değişik çalışmalarda hastane kaynaklı enfeksiyonların %8-25'inde *P.aeruginosa* sorumlu tutulmuştur. Bu bakteri hastanelerde nemli ortamlardan ve hasta tedavisinde kullanılan alet ve sıvılardan sıklıkla izole edilir ve özellikle yoğun bakım  nitesi ve n tropenik hastaların izlendiği birimler için daha da önem kazanmaktadır (94, 95).

P.aeruginosa, yüksek mortalite ile seyreden klinik tablolara neden olur (10, 11). *P.aeruginosa*'nın neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisi, günümüzde yaygın olan çoklu antibiyotik direnci nedeni ile sorun yaratmaktadır. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında antimikrobiyal ajanlara direncin çabuk gelişmesi ve yüksek oranda bulunması önemli bir sorundur (94, 95).

P.aeruginosa insanda farklı anatomik bölgelerde farklı koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Enfeksiyon gelişiminde konak hücre yanıtı yanında bakteriye ait çeşitli vir lans faktörlerinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Bu vir lans faktörleri arasında kirpik, pilus, LPS, alginat, piyosiyanin, piyoverdin, proteaz, elastaz, fosfolipaz C, ekzoA, ramnolipid ve biyofilm yer almaktadır (16 -31, 46).

Fırsatçı bir patojen olan *P.aeruginosa* entübe edilmiş hastalarda ventilatörle ilişkili ağır pnömonilerden sorumlu tutulmuştur. Bu hastalarda *P.aeruginosa*'nın üst solunum yolundaki kolonizasyonu ve endotrakeal entübasyonun süresi pnömoni oluşumuyla ilişkilidir. Hareketsiz veya cansız yüzeylerin *P.aeruginosa* tarafından kolonize edilebilmesi için, bakterilerin geniş bir yüzeyde büyümeleri gerekmektedir. Bu durum biyofilm oluşumu ile gerçekleşmektedir (96). Biyofilm oluşumunda bakteriye ait pilus ve kirpik varlığı, ekzopolisakkarit üretimi gibi özellikler yanında katı-sıvı etkileşim yüzeyi, sıvı besiy ortamı, hücre yüzeyinin biyokimyasal ve hidrofobik yapısı, ortam ısısı, pH'ı, O₂ basıncı, karbon kaynağı ve ozmolarite gibi çevresel faktörler de önemli bir rol oynamaktadır (32, 36, 37).

P.aeruginosa'da açıl homoserin lakton aracılıklı hücreden hücreye sinyal sistemi, çeşitli ekstrasellüler virülans faktörlerinin salınımının kontrolünün düzenlenmesinde ve biyofilm oluşumunda önemlidir. Sentezlenen bu moleküller *lasI* ve *rhlI* genleri olmak üzere 2 otoindükleyici sentez geni ile bağlantılıdır. AHL molekülleri kistik fibrozisli hastaların akciğer sekresyonlarında saptandığı gibi in vitro *P.aeruginosa* biyofilm modelinde ve in situ üretral kateterlerde de saptanmıştır (96).

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda *P.aeruginosa* olarak tanımlanan 50 alt solunum yolu örneğinden ve 50 solunum yolu dışı örnekten soyutlanmış toplam 100 *P.aeruginosa* suşunda biyofilm yapımının varlığı, şiddeti ve biyofilm oluşumunda QS genlerinin rolünün araştırılması amacıyla planlandı.

Bu çalışmaya alınan 100 *P.aeruginosa* suşundan 38 tanesinin PAO-1'in biyofilm düzeylerine göre %50 ve altında zayıf biyofilm yaptığı saptanırken, 46 tanesinin %50-%100 arasında orta kuvvetli biyofilm ve 16 tanesinin %100 ve üzerinde kuvvetli biyofilm yaptıkları saptandı.

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* suşlarından alt solunum yoluna ait örneklerden izole edilen suşların 20 tanesinin (%40) zayıf biyofilm, 21 tanesinin (%42) orta kuvvetli biyofilm, 9 tanesinin (%18) kuvvetli biyofilm yaptığı; solunum yolu dışı örneklerden izole edilen suşların ise 18 tanesinin (%36) zayıf biyofilm, 25 tanesinin (%50) orta kuvvetli biyofilm, 7 tanesinin (%14) kuvvetli biyofilm yaptığı saptandı. Bu sonuçlara göre alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşların yaptığı biyofilm düzeyleri ile diğer sistemlerden izole edilmiş suşların yapmış olduğu biyofilm düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

P.aeruginosa'nın farklı yöntemlerle biyofilm yapımının incelendiği birçok çalışma vardır (46, 47, 89, 91 97, 98). Biyofilm şiddetinin ölçümünde kullanılan mikrotitrasyon plağı yöntemi, polistren tüp yöntemi ve *flow-cell* yönteminin temeli biyofilm tabakasının absorbands ölçümüne dayanmaktadır. Burada sunulan bu çalışmada biyofilm yapımı mikrolept yöntemi ile kristal viyole kullanılarak araştırıldı (89, 90, 91).

Wang ve ark'nın 2005 yılında yaptığı bir çalışmada otopatojenik 12 *P.aeruginosa* suşunun kristal viyolenin kullanıldığı mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm düzeyleri ölçülmüş ve PAO-1'in biyofilm düzeylerine göre suşlar karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda 12 suştan 10 tanesinin PAO-1'e göre 2-18 kat daha güçlü biyofilm yaptığı saptanırken diğer 2 suşun PAO-1'e yakın veya daha düşük oranda biyofilm yaptığı saptanmıştır (99).

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Buna göre bu suşlarda en yüksek direnç oranı sefotaksimde görülürken, en duyarlı antibiyotiklerin amikasin, tobramisin ve piperasilin olduğu bulundu.

Antibiyotik direnç oranları ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda *P.aeruginosa*'nın en duyarlı olduğu antibiyotiklerin imipenem, meropenem ve daha düşük oranlarda olmakla birlikte amikasin olduğu; sefalosporinlerin daha dirençli oldukları bildirilmiştir (100 -105).

P.aeruginosa'da antibiyotiklere direnç özelliklerinin incelendiği bir çalışmada yoğun bakım ve bakımevi hastalarından izole edilen suşlar, yoğun bakım dışındaki hastalardan izole edilen suşlara göre daha dirençli saptanmış ve bu direnç istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Bunun yanı sıra örneklerin alındığı sistemlere bakıldığında ise alt solunum yolu örneklerinin üst solunum yolu ve diğer sistem örneklerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha dirençli olduğu saptanmıştır. Çoklu ilaç kullanımının, özellikle yoğun bakım ve bakımevinden izole edilen suşlarda, ilaç direncini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını belirten çalışmada, antibiyotik direncinin hastanın yaşı, yoğun bakım hastası olup olmaması gibi özellikleri ve örneğin alındığı sistemle ilişkili olduğu raporlanmıştır (106).

Bu çalışmada örnek türleri (trakeal aspirat, kan, idrar vd.) ile antibiyotik direnç oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Alt solunum yolu örnekleri ile solunum yolu dışından izole edilen örneklerin antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında alt solunum yolu örnekleri solunum yolu dışı örneklerle göre sadece aztreonam, meropenem ve imipeneme istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha dirençli saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmaktadır (106).

Bu çalışmaya alınan alt solunum yolu örneklerinin çoğunluğunun trakeal aspirasyon gibi yoğun bakım hastalarına ait olması ve örneklerin çoğunluğunun hastane kaynaklı, çoğunlukla çoklu ilaç tedavisi uygulanan yoğun bakım hastalarından izole edilen *P.aeruginosa* suşlarından oluşmasının, daha yüksek direnç oranlarının gelişmesine neden olduğu düşünülmüştür.

Biyofilm oluşumu doğal kapak endokarditi, osteomyelit, dental taşıyıcılık, kronik bakteriyel prostatit, orta kulak enfeksiyonları, tıbbi implant enfeksiyonları ve özellikle kistik fibrozisli kronik akciğer hastalıklarında önemli bir yer tutmaktadır. Oluşan biyofilmin antibiyotik tedavisine aynı genetik materyale sahip planktonik bakterilere oranla 100 -1000 kat tolerans veya direnç geliştirmesi, fagositoza karşı oluşan direnç ve tedavi sonrası relaps oranının yüksek oranda görülmesi, biyofilm oluşturan bakterilerin yaşayan organizmadan uzaklaştırılmasının ne kadar güç olduğunun en önemli göstergesidir (33).

P.aeruginosa'nın biyofilm yapısı kistik fibrozisli hastaların tedavisi güç ve dirençli enfeksiyonlarına katkıda bulunan bir faktördür ve planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında biyofilm içindeki hücrelerin antimikrobiyal tedavi ve konak immün yanıtına daha dirençli oldukları gösterilmiştir (107).

Bu çalışmaya alınan suşların biyofilm düzeylerine göre antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında, kuvvetli biyofilm yapan grubun antibiyotiklere daha dirençli olduğu görüldü. Ancak bu direnç artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bunun yanı sıra zayıf biyofilm yapan grubun kuvvetli biyofilm yapan gruba göre sadece sefotaksim ve amikasin'e daha dirençli olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Sadece iki antibiyotikte bulunan bu sonuç, tesadüfi ilişki olabileceği gibi, gerçek bir biyofilm-antibiyotik direnci ilişkisini de yansıtabilir. Bu ilişkinin daha fazla sayıda suş ile değerlendirilmesi gerçek ilişkiyi ortaya koyması açısından uygun olacaktır. Bu sonuç literatürdeki pek çok çalışma ile çelişen bir sonuç olarak görülse de, antibiyotik duyarlılık testleri ile biyofilm ölçümlerinin farklı zamanlarda, farklı ortam koşullarında yapılmış olmasının bu farka neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle biyofilm ve antibiyotik direnci ilişkisinin sorgulanmasında, biyofilmdeki ve serbest bakteriler üzerine antibiyotiklerin etkisinin ve MİK değerlerinin araştırılması daha gerçekçi ve doğru sonuçlar verecektir.

Kistik fibrozisli 8 hastanın solunum yolu örneklerinden izole edilen 12 *P.aeruginosa* suşunun antibiyotik duyarlılığının değerlendirildiği bir çalışmada, biyofilm yapan suşların biyofilm yapmayan suşlara göre tekli ve çoklu antibiyotiklere daha dirençli oldukları saptanmıştır (108).

Yapılan bir başka çalışmada 8 ayı hastaneden toplanan ve nozokomiyal enfeksiyona neden olan 162 *P.aeruginosa* suşunun mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm yapımı ve disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç oranları karşılaştırılmıştır. Çalışmada biyofilm düzeylerine göre bu suşlar biyofilm yapan ve biyofilm yapmayan olarak iki gruba ayrılmıştır. Antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında her iki grubun amikasin, gentamisin ve seftriaksona benzer oranlarda, siprofloksasine ise daha düşük oranda, dirençli oldukları görülmüş. Aynı çalışmanın sonucunda biyofilm yapan grubun antibiyotiklere daha dirençli olduğu ve tedavisi daha zor enfeksiyonlara yol açtığı belirtilmiştir (47).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı direncini sağlayan faktörler çeşitlidir. Bunlar arasında yavaş büyüme, biyofilm tabanında azalan oksijen miktarı, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü alginat polimerlerine bağlanmasıyla oluşan penetrasyon bariyeri ve bakteride beta laktamazların varlığı sayılabilir. Standart duyarlılık testleri kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı olduğunu göstermesine rağmen biyofilm içerisindeki bakterilerde artan direnç bunların tedavisinde genellikle başarısızlığa neden olmaktadır (109).

P.aeruginosa'nın ekstraselüler virülans faktörlerinin çoğunun üretiminin kontrolü hücreden hücreye sinyal aracılığı ile bakteriler arası iletişim ve bakteriyel hücre yoğunluğunun gözlendiği mekanizmalarla gerçekleşir. Bakteriler arası iletişimde kullanılan dil, mikroorganizmaların çevreye saldıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, böylece çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedir. QS olarak adlandırılan bu sistem virülansda önemlidir (50, 51).

P.aeruginosa'nın ekzoproteaz, siderofor, ekzotoksin ve lipaz gibi çoğu virülans faktörleri QS tarafından düzenlenir. Virülans faktörlerinin QS tarafından kontrolü *P.aeruginosa*'ya çeşitli avantajlar kazandırır. QS sistemi ekstraselüler virülans faktörlerinin üretiminin yeterli bakteri yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra gerçekleşmesini sağlar (93).

Genetik çalışmalar *P.aeruginosa*'da iki ayrı QS sistemini tanımlamıştır. Las R-I ve Rhl R-I olarak isimlendirilen bu sistemlerin her birinde R ve I genleri arasında bağlantı vardır. LasR sistemi, transkripsiyonel düzenlenme sonucunda LasI aracılıklı genel sinyal molekülü olan 3-O-C₁₂-HSL salınımını gerçekleştirirken, RhlR sistemi, transkripsiyonel düzenlenme sonucunda RhlI aracılıklı genel sinyal molekülü olan C₄-HSL molekülünün salınımını gerçekleştirir (110).

P.aeruginosa'da düşük hücre yoğunluğunda da bazal düzeyde LasI aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretimi mevcuttur. Hücre yoğunluğunun artması ile sinyal molekülü kritik konsantrasyona ulaşır ve LasR aktivasyonu gerçekleşir. LasR-3-O-C₁₂-HSL kompleksi virülans genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Aktive olan bu genler *lasB*, *toxA*, *rhlR* ve *lasI* genlerini içerir. LasR tarafından LasI'nın aktivasyonu pozitif otheregülatör döngüyü oluşturur. QS düzenleyici kaskatta LasR aracılığı ile RhlR'nin aktivasyonu gerçekleşir. Sonuç olarak Rhl sisteminin aktivasyonu için Las sistem aktivasyonu gereklidir (75). RhlI aracılıklı C₄-HSL salınımı RhlR aktivasyonunu sağlar. RhlR aktivasyonu hidrojen siyanid ve piyosiyenin gibi çeşitli sekonder metabolitlerin üretimi için gereken genlerin ekspresyonunu sağlar. *P.aeruginosa*'da QS mekanizmasının elementlerindeki mutasyon, bu bakterilerin laboratuvar koşullarında büyümesini belirgin bir şekilde etkilemez. PAO-1 suşu ile LasI ve RhlI sistemlerinde mutasyon olduğu saptanan *P.aeruginosa* suşlarında aynı laboratuvar koşulları altında benzer büyüme oranları saptanmıştır (75).

P.aeruginosa patogenezinin QS'in katkısı bu güne kadar literatürde yayınlanmış pek çok çalışmayla gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda özellikle *P.aeruginosa*'nın, kronik akciğer enfeksiyonu bulunan kistik fibrozis gibi hastaların enfekte akciğer dokularında ya da farklı enfekte dokularda QS'in tümüyle fonksiyonel olduğu bulunmuştur (72, 84, 87, 91, 93, 108).

P.aeruginosa'da QS sistemi alanındaki son çalışmalar, bu sistemin biyofilmin doğru oluşunu için hayati olduğunu göstermiştir (111). *P.aeruginosa* kistik fibrozisli hastaların akciğerinde kritik kolonizasyonla biyofilm oluşturur. Las sistemi elastaz, alkali proteaz gibi virlans faktörlerinin salınımını, Rhl sistemi ise ramnolipid ve piyosiyanin enzimlerinin salınımını, ayrıca hidrojen siyanid sentezini kontrol eder. Las ve Rhl sistemleri birlikte iki yüzden fazla genin salınımında etkilidirler ve biyofilm oluşumunu da kontrol ederler (112).

Literatürde yayınlanmış QS sistemi ve *P.aeruginosa*'nın virlans faktörleriyle ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu alışmalarda QS sistemine ait *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin varlığının araştırılmasında farklı yöntemler kullanılmıştır. QS genlerinin saptanması amacıyla *polimerase chain reaction* (PCR), *high pressure liqued chromatography* (HPLC), *thin layer chromatography* (TLC), *southern blot* yöntemleri sıklıkla kullanılmıştır (69, 71, 87, 91, 113, 114).

Bu alışmada QS'de rol alan *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin varlıkları PCR yöntemi kullanılarak incelendi. Bunun için bu genlerin içinde değişik bölgelere uyan ve daha önce tasarlanmış oligonükleotid primerleri kullanıldı (91).

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak, QS sistemine ait 4 geni de içerdiği bilinen *P.aeruginosa*'nın PAO-1 suşu kullanıldı. Çalışma sonuçları PAO-1 ile karşılaştırılarak değerlendirildi. QS gen çalışmasına alınan toplam 40 suşun 20'sinde 4 gen bölgesine ait hem internal hem de intakt genlerin hepsi saptanırken, 20 suşda farklı genlerde ve farklı fragmentlerde amplifikasyon ürünü saptanmadı. Bazı suşlarda birden fazla gen bölgesinde amplifikasyon ürünü elde edilemedi. Toplam 40 suşta %92,5 -97,5 oranında internal gen amplifikasyon ürünü saptanırken, özellikle *lasR* ve *rhlR* intakt gen bölgelerinde amplifikasyon ürünü daha düşük oranda saptandı.

İnternal ve intakt genlerdeki uyumsuz amplifikasyon sonuçlarını doğrulamak için, çalışmada herhangi bir gen ürünü saptanamayan suşlarda PCR çalışması ikinci kez tekrarlandı. Aynı genlerde kayıp saptanan bu suşlardan hazır ticari kit kullanılarak DNA eldesi yeniden gerçekleştirilerek bir kez de bu yeni DNA'larla PCR çalışması yapıldı. Sonuçta her üç PCR çalışmasında da *lasR* geninde 11, *rhIR* geninde 14 suшта intakt gen bölgesi amplifiye edilemedi. Bu 11 suşun 1 tanesinde *lasR* geninin hem internal hem de intakt gen bölgesi yokken, 14 suşun 2 tanesinde *rhIR* geninin hem internal hem de intakt gen bölgesi saptanmadı.

İnternal bölgede amplifikasyon ürünü elde edilmesine rağmen intakt bölgede ürün elde edilememesi şaşırtıcı ve ilginç bulunmuştur. Ancak literatürde benzer durum olup olmadığı araştırıldığında, bu çalışmanın primer dizileri için referans alınan çalışmada da benzer durumun olduğunun belirtildiği görülmüştür. Schaber ve ark yaptıkları çalışmada, intakt ve internal primerler ile QS genleri çalışılan ve sadece *lasR* intakt ve *rhIR* intakt gen kaybı olan suşlarda, aynı genlerin internal bölgelerinin sentezlenip intakt bölgelerinin sentezlenememesini, gene komşu bölgelerdeki değişimlerle açıklamaya çalışmışlardır. Bu değişimlerin primerlerin hibridizasyonu ve PCR ürünlerinin sentezini engellediği öne sürülmüştür. Mevcut değişimin internal bölge sentezini engellemediği belirtilmiştir. Çalışmada *rhIR* ve *lasR* genlerinin daha büyük DNA parçalarının klonlanmaya çalışıldığı, daha sonra intakt genler için yeni fragmentler izole edileceği ve nükleotid dizilimi belirleneceği belirtilmiştir (91).

Bu çalışmada da benzer durumun görülmesi üzerine DNA eldesi ve PCR koşulları çeşitli zamanlarda tekrarlanmış ve sonuçların aynı bulunması nedeniyle bu durumun, suşlardan DNA elde edilmesi ile ilgili veya PCR koşullarından kaynaklanmadığı düşünüldü ve büyük olasılıkla intakt gen bölgesi için tasarlanmış primerlerin primer bağlanma bölgesindeki nokta mutasyon, baz kaybı ve benzer nedenlere bağlı primer bağlanamaması sonucu olarak amplifikasyonun gerçekleşmediği şeklinde yorumlandı. Sonuçta bazı suşlarda intakt genler amplifiye edilemezken, mevcut değişimin internal bölge sentezini engellemediği düşünülmüştür. Ayrıca primerlere bağlı “mismatches”lerin primerlerin gen ürün amplifikasyonunu önleyebildiği de belirtilmektedir (91). İntakt bölgedeki bu

saptanamama durumu benzer nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Bu suşlardaki bu durumun ileri incelemelerle aydınlatılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada yukarıdaki açıklamalar temelinde hem internal hem intakt gen ürünü elde edilemeyen suşlar gerçek anlamda total gen kaybı olan suşlar olarak kabul edildi. Bu şekilde değerlendirildiğinde QS genleri çalışılan 40 suş içerisinde toplam 5 suшта farklı genlerde total gen kaybı saptandı (Tablo - 8). Bu 5 suştan 2'sinde (1 trakeal aspirat ve 1 kan örneği) *lasI*, 1'inde (balgam) *lasR*, 2'sinde (2 balgam örneği) *rhlI* ve 1'inde (idrar) *rhlR* genlerinin hem internal hem intakt bölgelerine ait amplifikasyon ürünü saptanamadı.

Tınaz ve ark, 50 klinik *P.aeruginosa* suşunda QS ve virülans faktörlerinin ilişkisini inceledikleri çalışmalarında TLC yöntemiyle 4 suşda C4-HSL salınımının düşük olduğunu bulmuşlardır. Bu 4 suşun virülans faktörleri incelendiğinde pozitif kontrol olarak alınan PAO-1 suşuna göre belirgin oranlarda daha düşük elastaz, ramnolipid ve piyosiyanin üretimleri olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçların suşlarda özellikle *rhl* gen sisteminin kaybı olduğunu düşündürdüğü belirtilmiştir. QS genleri açısından değerlendirmek amacıyla *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* intakt genlerinin ve pozitif kontrol olarak PAO-1 suşunun kullanıldığı PCR çalışmasında, 4 suşun tamamında QS genlerinin tümünün varlığı gösterilmiştir. C4-HSL defektli 4 suşun gen sekanslamaları yapıldığında 2 suşta *rhlI* geninde, 2 suşda ise hem *rhlI* hem de *rhlR* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların C4-HSL ve virülans faktörlerinin kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir. Ortama C4-HSL eklenmesi ile fenotipik değişimlerin düzelmemesi de gen mutasyonlarına bağlanmıştır. Çalışmada kullanılan suşların virülans faktörlerinin çoğunun kaybına rağmen kan, idrar ve yara yerinden izole edilmiş olması, insanlarda QS sisteminin *P.aeruginosa* patogeneğinde major rolü olduğu sonucunu desteklemiştir (115).

Yapılan diğerk bir çalışmada klinik (nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemi) ve çevresel kaynaklı olmak üzere toplam 66 *P.aeruginosa* suşu ve PAO-1 (kontrol suşu) suşunun *lasR* geninde sekans çalışması sonucunda mutasyon, nükleotid değişlikleri ve insersiyonlar saptanmış; PCR ile *lasR* internal gen varlığı saptanan 26 tane klinik (13 pnömoni, 13 bakteriyemi) ve 9 tane çevresel izolat olmak üzere toplam 35 izolattan 33 tanesinde, özellikle enfeksiyonun erken başlangıç aşamasında *lasR* düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı miktarlarda arttığı gösterilmiştir. Artışın gösterilemediği 2 suşun pnömoni hastalarından izole edilmiş suşlar olduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada farklı kaynaklardan gelen suşlarda da *lasR* düzey artışları saptanmıştır. Bununla beraber pnömoni izolatlarında bakteriyemi izolatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlendiği belirtilmiştir. Çevresel izolatlardaki *lasR* düzeylerinin değişen oranlarda saptandığı belirtilmiştir (71).

Schaber ve ark, 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada üriner sistem, alt solunum yolu ve yara enfeksiyonlarından izole edilmiş 200 *P.aeruginosa* suşunu, virölans faktörleri ve QS genleri açısından değerlendirmişlerdir. Çalışmaya alınan suşlarda elastaz üretimi düşük bulunan 5 suşta PCR yöntemi ile QS genleri çalışılmış ve 2 suşun *lasR* ve *rhlR* intakt ve internal genlerinde kayıp olduğunu saptamışlardır. Bu 2 suşdan birinde aynı zamanda *lasI* intakt gen yokluğu da saptanırken, diğerk 3 suşdan 1 tanesinde sadece *rhlR* intakt gen yokluğu bulmuşlardır. Sonuç olarak sadece 2 suşda 4 QS geni de pozitif bulunmuştur. QS sinyal moleküllerinin düzeylerine bakıldığında, elastaz düzeyi düşük bulunan bu 5 izolatın PAO-1'e göre istatistiksel olarak daha düşük düzeyde QS sinyal molekölü ürettiği saptanmıştır (91).

Chen ve ark'nın 2004 yılında yaptığı bir çalışmada *P.aeruginosa*'nın PAO-1 suşu ile *rhlI* ve *rhlR* genlerinde mutasyon olduğu bilinen suşları kullanılmıştır. Bu çalışmada *rhl* sistem otoindükleyicisi olan “N-butanoyl-homoserine lactone”ün sentez kinetikleri ve yıkımı değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan 2 mutant suşun büyüme profilleri PAO-1 ile benzer bulunurken, bu suşlarda belirgin düzeyde ramnolipid sentezi gözlenmemiştir. *rhlR* veya otoindüleyici sentezinde mutant olan suşlarda aktif ramnolipid sentezinin engellendiği gösterilmiştir (116). Bununla beraber bir diğer çalışmada *rhlI* mutant olduğu bilinen suşlarda büyüme defekti görülmezken çok düşük düzeyde ramnolipid üretimi gözlenmiştir (117).

Bir başka çalışmada *rhlI* mutant suşların ramnolipid sentezinin 1/3 ve 1/2 oranlarında azaldığı gösterilmiş ve yine aynı çalışmada *lasI* ve *rhlI* çift mutantlarda üretimin tümüyle durduğu saptanmıştır. Kesin olmamakla birlikte mutant suşlara *las* sistemi otoindükleyicisinin ilavesiyle yeniden ramnolipid sentezinin gerçekleşmeyeceği belirtilmiştir (79).

Bu çalışmada biyofilm yapımı ile QS genlerinin kaybı arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırıldı. Biyofilm yapımı PAO-1'e göre zayıf olan 30 suş ile karşılaştırma amacıyla kuvvetli biyofilm yapan 10 suş çalışmaya alındı. Zayıf biyofilm yapan suşların 26'sında (%86,7) herhangi bir total gen kaybı olmadığı saptandı. Total gen kaybı saptanan 5 suş incelendiğinde 4'ünün zayıf biyofilm, 1'inin kuvvetli biyofilm yaptığı görüldü. QS genlerine göre çalışma sonuçları değerlendirildiğinde *lasI*, *lasR* ve *rhlI* genlerindeki kaybın zayıf biyofilm yapan grupta kuvvetli biyofilm yapan gruba göre daha fazla olduğu, ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.

Özellikle *lasI* ve *rhlI* gen defekti olduğu bilinen mutant PAO suşları ile vahşi tip PAO-1 suşunun biyofilm yapım oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, *LasI* sistem otoindükleyicisi 3-O-C₁₂-HSL yokluğunda biyofilm oranlarının vahşi tip PAO-1 ile benzer olduğu bulunmuş. Buna karşılık *RhlI* sistem otoindükleyicisi olan C₄-HSL yokluğunda biyofilm oranlarının vahşi tipe göre % 40-%60 oranlarında daha düşük olduğu belirtilmiş ve biyofilm yapımında *RhlI* sisteminin *LasI* sistemine göre daha etkili olduğu vurgulanmıştır (96).

QS otoindükleyicilerinin yıkımının *P.aeruginosa*'nın virülans faktörlerine etkisini inceleyen bir çalışmada, *P.aeruginosa*'nın PAO-1 suşu ile otoindükleyicileri yıktığı bilinen genin aktarıldığı PAO-1 suşu karşılaştırılmıştır. QS otoindükleyicilerinin yıkımı ile elastaz ve proteaz gibi virülans faktörlerinin sentezinde azalmanın saptandığı çalışmada QS otoindükleyicilerinin yıkımı ile *P.aeruginosa*'nın olgun biyofilm miktarının belirgin oranda azaldığı, yapısının bozulduğu ve QS yokluğunda oluşan biyofilmin dağılımının kolaylaştığı gösterilmiştir (3).

Ülkemizde yapılmış biyofilm yapımı ve antibiyotik direnci ile QS sinyal moleküllerinin ilişkisini inceleyen bir çalışmada, gentamisine duyarlı ve orta derecede duyarlı yara örneğinden izole edilmiş klinik suşlar ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemi ile farklı bakteri ve antibiyotik dilüsyonlarında AHL türlerinin saptandığı çalışmada, her iki QS sistemine (Las ve Rhl) ait sinyal moleküllerinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinden sonra ortamda saptanmaya başladığı ve etkinliklerini sürdürdükleri belirtilmiştir. ELİSA yöntemi ile biyofilm ve AHL türleri değerlendirildiğinde ise MİK değerlerinden itibaren biyofilm oluşumu ile suşlarda Las ve Rhl sistemine ait AHL yanıtlarının paralel olarak artmaya başladığı saptanmıştır. Çalışmada sonuç olarak biyofilm oluşumunun Las ve Rhl sistemlerinin biri ve/veya ikisi ile düzenlendiği sonucuna varıldığı belirtilmiştir (118).

Shih ve ark'nın biyofilm ve QS ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, *P.aeruginosa* PA01 suşu ile *lasI-rhII*, *lasI* ve *rhII* mutant suşları biyofilm oluşturma yönünden karşılaştırdıklarında biyofilmin başlangıç aşamasında belirgin fark yokken, olgun biyofilm oluşumuna farklılanma ve çoğalma aşamasında PAO-1'in mutant suşlara göre belirgin olarak hızlı ilerlediğini saptamışlardır (119).

Yapılan bir başka çalışmada, QS otoindükleyicilerinin yıkımı ile elastaz, ramnolipid ve piosiyanın gibi virülans faktörlerinin sentezi ile *P.aeruginosa*'nın flagellar hareket yapısının bozulduğu saptanmıştır. Bu çalışmada QS otoindükleyicilerinin yıkımı sonucunda *P.aeruginosa*'nın yüzeye yapışma özelliğinin etkilenmediği bulunurken, biyofilmin erken başlangıç aşamasında anlamlı bir azalma

olmadığı saptanmıştır. QS otoindükleyicilerinin biyofilmin erken başlangıç aşamasında değil, olgun biyofilm kitlesinin oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir (120).

Bu çalışmada da PAO-1'e göre zayıf biyofilm yapan suşlardan 26'sının QS total gen kaybı saptanmamıştır. Bu sonuca göre biyofilm yapımının sadece QS gen varlığına bağlı olmadığı, gerek transkripsiyonel faktörlerin, gerekse çoğalma ortamındaki diğer çevresel faktörlerin biyofilme gidişte etkili olduğu düşünülmüştür.

Schaber ve ark, QS gen defekti saptadıkları 5 klinik izolatla PAO-1'in biyofilm yapım oranlarını ve büyüme özelliklerini bir başka çalışmada yeniden değerlendirmişlerdir. Yedi gün süreyle biyofilm kalınlıkları ve yoğunluklarının kaydedildiği çalışmada gen defekti bulunan suşların tümünde PAO-1'e göre erken biyofilm aşamasında, yüzeye tutunma evresinde daha zayıf etki gözlenmiştir. Bununla beraber *lasI* ve *rhII* gen düzeyleri düşük olan ve önceki çalışmalarında *lasR* ve *rhIR* gen kaybı saptadıkları 2 suşun 7. gün sonunda, PAO-1'den daha geç ama benzer kalınlıkta olgun biyofilm yaptıkları görülmüştür. *lasI* ve *rhII* gen düzeyleri biraz daha fazla olan diğer 2 suşda PAO-1'e göre daha ince ve heterojen yapıda olgun biyofilm gözlenirken, gen düzeyleri PAO-1'e en yakın ve en yüksek olan suşun PAO-1 ile benzer kalınlıkta, daha heterojen biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bu suşların *lasI* düzeyleri PAO-1'e göre %37-71 oranında iken, *rhII* düzeyleri %35-92 düzeylerinde bulunmuş. *lasR* ve *rhIR* gen kaybı saptadıkları suşların biyofilm yapısının PAO-1'e göre daha az farklılaşmış olmasına dayanarak, *lasR* ve *rhIR* genlerinin biyofilm farklılaşmasında rol aldığını belirtmişlerdir. QS gen defekti olan suşlarla PAO-1'in büyüme özelliklerine bakıldığında, büyümenin herhangi bir döneminde fark saptanmamıştır. Çalışmadaki suşların flagella ve pilusa bağımlı hareket özelliklerinde de PAO-1'e göre zayıflık olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda biyofilm oluşumunda flagellaya bağlı *twitching*, pilusa bağlı *swarming* hareketi ve QS sistemlerinin etkili mekanizmalar olduğu belirtilmiştir. Biyofilm başlangıcında QS'in tek başına major rol oynamadığı, daha çok olgun biyofilm yapımında etkili olduğu sonucuna varılmıştır (121).

P.aeruginosa'da biyofilm oluşumunu inceleyen bir başka çalışmada ise *lasI* gen sisteminin biyofilm oluşumunda önemli olmadığı sonucu bulunmuştur. Çalışmada vahşi tip *P.aeruginosa*, pilus defektli, *lasI* mutant ve biyofilm oluşumunda durağan fazda etkili RpoS gen defektli suşların 314 saate kadar farklı zamanlardaki biyofilm kalınlık ve yoğunluk oranları incelenmiştir. *lasI* mutant ve hareket defekti bulunan suşların vahşi tiple benzer kalınlık ve yoğunlukta biyofilm yaptığının saptandığı çalışma sonucunda, pilus bağımlı *twitching* hareketi ve *lasI* QS sisteminin biyofilm oluşumunda gerekli olmadığı, bunun yanı sıra RpoS geninin biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmada *lasI* geni ve pilus hareketinin biyofilme etkisi sonucunun literatürdeki pek çok yayına göre farklı bulunması, biyofilm deneylerinin tümünde olduğu gibi, biyofilm oluşumunun ortam koşullarından etkilenmesi olarak açıklanmıştır (122).

Diğer bazı çalışmalarda ise Las sisteminin biyofilm yapımında önemli olduğu ve Rhl sisteminin biyofilm yapımında daha az rol aldığı belirtilmiştir. *P.aeruginosa*'da biyofilmin ekzopolisakkarit matriks yapısını, *pel* operonunda yer alan ve *pelA-pelG* olarak adlandırılan genlerin sentezlediği bilinmektedir. Polisakkarit matriks, biyofilmin major komponentlerindendir ve yüzeyle ilişkili, buruşuk yapıda biyofilm oluşumu için gereklidir. *pel* geni QS sisteminde düzenlenmektedir ve *lasI* mutant suşlarda *pel* geninin salınımında defektler meydana gelmektedir (123).

Yapılan bir çalışmada *lasI* mutant, *rhII* mutant ve *pelA* mutant suşların koloni morfolojileri ve biyofilm özellikleri incelenmiştir. Koloni morfolojilerine bakıldığında *rhII* mutant suşun çok buruşuk koloni oluşturduğu ve kuvvetli vorteks ile koloninin koparak ortamdan uzaklaştırılabildiği saptanmıştır. *rhII* mutant suşlarda matriks yapısının değiştirilmiş olduğu gösterilmiştir. *lasI* mutant suşlar ise *pelA* mutant suşlara benzer şekilde tamamıyla düz, yassı koloniler oluşturmuşlardır. Yine aynı çalışmada sıvı besiyeri yüzeyinde biyofilm tabakası oluşumunda *rhII* mutant suşların gözle görülür kalınlıkta biyofilm tabakası oluşturduğu, ancak *pelA* ve *lasI* mutant suşlarda biyofilm tabakası oluşmadığı gözlenmiştir. Kristal viyolenin kullanıldığı mikrotitrasyon plağı yöntemi ile katı yüzeylerle ilişkili biyofilmin de incelendiği çalışmada, *rhII* mutant suşun vahşi tipe oranla daha az biyofilm yaptığı

saptanırken, *lasI*, *lasR* ve *lasI-rhlI* mutant suşların vahşi tipe göre belirgin oranda (%60) daha düşük biyofilm yaptığı saptanmış ve bu oran *pelA* mutant suşlarla benzer (%75) bulunmuştur. Sonuç olarak biyofilm yapımında çok önemli bir rolü olan *pel* geninin esas olarak Las sistemi ile, daha az oranda ise Rhl sistemi ile düzenlendiği ve QS sisteminin biyofilm yapımında etkili olduğu belirtilmiştir (123).

Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi biyofilm yapımını düzenlediği varsayılan genler ve gen ürünleri ile ilgili veriler halen netlik kazanmamıştır. Biyofilm yapımı oldukça dinamik bir süreçtir. Dolayısı ile QS sisteminin rolü yanında çevresel faktörlerin de son derecede önemli olduğu, ortam pH, ısı, hidrodinamik faktörlerin biyofilm oluşumunda oldukça önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada total gen kaybı saptanan 5 suşun, değişik çevresel koşullar varlığında biyofilm yapımı ve QS sinyal molekülleri yönünden yeni çalışmalarda araştırılmasının, bu ilişkilerin ortaya konması açısından yararlı olacağı düşünülmüştür.

Biyofilm oluşumu ve yapılanmasında QS sinyal molekülleri ile hidrodinamik koşulların incelendiği bir çalışmada *P.aeruginosa* PAO-1 suşu ile *lasI* mutant suş karşılaştırılmıştır. Çalışmada yüksek ve düşük şiddet uygulamak amacıyla turbuler ve laminar olmak üzere iki farklı akım ortamında biyofilmin kantitatif ve yapısal değişimi incelenmiştir. Laminar akım altında PAO-1 ile *lasI* mutant suşun biyofilm kalınlıkları ve yüzeyde yerleştikleri alan benzer oranlarda bulunurken; turbuler akımda *lasI* mutant suşun PAO-1'e göre daha ince biyofilm yaptığı gözlenmiştir. Ancak her iki akımda da *lasI* mutant suş ile PAO-1 biyofilmi kalınlığı ve genişliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışma sonucunda QS sinyal moleküllerinin biyofilm oluşumunun başlangıcında gerekli olmadığı, bununla beraber biyofilmin heterojen yapılaşmasında, farklılaşmasında rolü olduğu belirtilmiştir. Biyofilm oluşumunun ortamdaki büyüme koşullarına çok duyarlı olduğunu belirten çalışmada, hidrodinamik koşulların biyofilm kalınlığı ve dayanıklılığında etkili olduğu saptanmıştır (124).

Isıya bağılı hasar oluşturularak enfekte doku kesitlerinde elektron mikroskop ve floresan mikroskop ile biyofilm yapısının araştırıldığı hayvan modeli bir çalışmada *P.aeruginosa* ile *lasI* ve *rhlI* gen delesyonu olduğu bilinen PAO1-JP2 suşu karşılaştırılmıştır. PAO1-JP2 mutant suşunun, her iki AHL molekülünü sentezleyemediği, *twitching* hareketinin defektif olduğu ve yanık modeli çalışmalarda belirgin oranda düşük virülansa sahip olduğu bilinmektedir. PAO-1 ve mutant suşla enfekte dokularda bakteriyel yük ve mikro/makro-koloni oluşumu değerlendirilmiştir. 8, 24 ve 46. saatte her iki suşa ait bakteriyel yük benzer oranlarda bulunurken, iki suşun biyofilm oluşumlarının morfolojik analizinde de büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Özellikle kan damarları çevresinde biyofilm oluşumunun vaskülarite aracılığı ile invazyonda ve bakteriyemide başlıca rolü oynadığının belirtildiği çalışmada, mutant suşun damar çevresinde kapladığı alan PAO-1'e göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu bulgu *lasI* ve *rhlI* mutant PAO1-JP2 suşunun PAO-1'den daha az virülan ve daha az bakteriyemik yayılım yaptığının belirtildiği önceki çalışma sonuçları ile uyumlu olarak belirtilmiştir (125). Aynı çalışmada mutant suşun invazyon yeteneğindeki azalmanın bakteriyel translokasyonu sağlayan *twitching* hareketindeki defekte bağlı olduğu belirtilmiş. PAO-1 ve PAO1-JP2 suşunun in vivo biyofilm oranlarının benzer bulunduğu çalışmada sonuç olarak, AHL sinyal moleküllerinin yanık çevresinde biyofilm oluşumu için gerekli olmadığı saptanmıştır. Çalışmada *lasI* ve *rhlI* mutant suşdaki zayıf virülans ve bakteriyemik yayılımın, düşük biyofilm yapımından değil, QS sistemi tarafından düzenlenen virülans faktörlerinin salınımındaki azalmadan kaynaklandığı görüşü savunulmuştur. Bu sonuçlar, akut enfeksiyonlarda QS tarafından düzenlenen virülans faktörlerinin salınımı için önemli olan yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmada biyofilmin rolü olduğu görüşünü desteklemektedir (125).

Bizim çalışmamızda farklı anatomik bölgelerden izole edilmiş suşlar çalışmaya alınmıştır. *P.aeruginosa*'nın özellikle yatan hastalarda ventilatörle ilişkili pnömonide önemli bir fırsatçı patojen olduğu ve nozokomiyal pnömonilerin önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşlar ve diğer sistemlerden izole edilen suşlar hem biyofilm yapımı hem de QS genlerinin varlığı yönünden karşılaştırılmıştır. Çalışmaya alınan QS genlerinde total kayıp saptanan 5 suşun sistemlere göre dağılımına bakıldığında bu suşların 3'ünün alt solunum yolu örneklerinden, 2'sinin solunum yolu dışı sistemlerden izole edilen suşlar olduğu görüldü. Bu durum sistemlerden izole edilen suşlar arasında gen kaybı yönünden bir farklılık olmadığını düşündürmüştür. Ancak alt solunum yollarından izole edilen 1 balgam örneğinden izole edilen suşta 3 gen kaybı birden saptanmıştır. Bu izolatın ileri incelemelerle (sekanslama) araştırılması yararlı olacaktır.

Literatürde farklı anatomik bölgelerden izole edilen suşlarda QS gen ürünlerinin araştırıldığı çalışmalar vardır. *P.aeruginosa*'nın virülansında QS'in önemi akut ve kronik akciğer enfeksiyonunun olduğu fare modelleri ve yanık yaralarını içeren çeşitli hayvan modellerinde tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda QS gen defektinde doku hasarı ve mortalite oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir (126, 127).

Zhu ve ark'nın yapmış oldukları bir çalışmada farklı göz hastalarından (keratit, lense bağlı akut enfeksiyon, asemptomatik şikayetler) izole edilen 23 *P.aeruginosa* izolatının AHL üretim düzeyleri ile proteaz üretimi, fenotipik özellikler, bakteriyel invazyon ve akut sitotoksik aktivite özellikleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda keratit etkeni olan 17 izolatın tümünde lasI ve rhII sistemlerine ait iki farklı AHL molekülü üretimi görülürken, 2 izolatta AHL üretimi hiç gözlenmemiş, 4 izolatta ise farklı AHL moleküllerinin yokluğu görülmüştür. AHL üretiminin yüksek olduğu suşlarda yüksek proteaz aktivitesi ve invaziv yapı artışı saptanmıştır. Akut sitotoksik izolatlarda düşük AHL düzeyi ve proteaz aktivitesi gösterilmiştir. İnvaziv türlerin sitotoksik türlerden daha fazla keratit etkeni oldukları belirtilmiştir (128).

Kistik fibrozisli 8 hastadan izole edilmiş 20 mukoid olmayan *P.aeruginosa* suşunun biyofilm ve virülans faktörlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, suşların değişen oranlarda piyosyanin, proteaz ve hareket kaybı olduğu saptanmış. Bununla beraber suşlarda %45 oranında las sistem AHL yokluğu görülürken, %80 oranında rhl sistem AHL salınımı olduğu belirlenmiş. Suşların biyofilm yapım oranlarının PAO-1'e göre çeşitli oranlarda daha düşük bulunduğu çalışmada, biyofilm yapımı ve farklılaşması için las sisteminin zorunlu olmadığı, kronik akciğer enfeksiyonlarının sadece biyofilm gelişimine bağlı olmadığı, farklı enfeksiyon stratejileri bulunduğu belirtilmiştir (129).

Bizim çalışmamızda tüm suşlar hastaneden izole edilmiş klinik suşlardır ve enfeksiyon etkeni olarak soyutlanmıştır. Bu suşların %38'i zayıf biyofilm yapmakla beraber sadece 5 suшта total QS gen defekti saptanmıştır. Çalışmamızdaki 5 defektif suşun 4'ünün zayıf biyofilm yapan suşlar olması ve QS genlerinden özellikle 2 suшта *lasI* ve 2 suшта *rhlI* genlerinin saptanamamış olmasının, biyofilm yapımında bu genlerin rolü olabileceğini destekleyen bir veri olarak değerlendirilebileceği, ancak biyofilm yapılanma, olgunlaşma ve dağılım sürecinde diğer virülans faktörlerinin ve çevresel koşulların birlikte değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca QS gen transkripsiyon ürünlerinin biyofilme etkisinin daha kapsamlı moleküler çalışmalarla incelenmesi uygun olacaktır. Ancak halen literatürde bu konuya dair çok açık ve kesin sonuçlar mevcut değildir.

Sonuç olarak gerek bu çalışma ve gerekse daha önce yapılmış çalışmalar göstermektedir ki QS defektif suşlar da farklı anatomik bölgelerde enfeksiyon geliştirebilmektedir. Bu sonuçlar enfeksiyon gelişiminde tek başına QS sisteminin yeterli olmadığını, diğer bir çok virülans ve konağa ait faktörün rol aldığını göstermektedir. Bununla beraber QS inhibisyonu ile biyofilm gelişiminin engellenmesi ve bu yolla *P.aeruginosa* kolonizasyonunun engellenmesinin, enfeksiyonların tedavisinde yarar sağlayabileceği düşünülmektedir.

QS inhibisyonunu hedef alan çalışmaların sürdürülmesinin yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için yararlı ve gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu yönde in vitro ve in vivo deneysel hayvan modelleri ile yapılacak çalışmaların bu alana katkı sunacağı sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR

- Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı klinik servislerden gönderilen hasta örneklerinden izole edilen 100 tane *Pseudomonas aeruginosa* suşu çalışmaya alındı.
- Çalışmaya alınan toplam 100 suşun 50 tanesi alt solunum yolu örneklerinden, 50 tanesi solunum yolu dışı örneklerden oluştu. Suşların %37'si trakeal aspirat, %13'ü balgam, %21'i idrar, %7'si kan, %11'i yara ve %11'i diğer örneklerle aitti.
- Antibiyotik direnç oranları incelendiğinde en yüksek direnç %84 oranında sefotaksimde görüldü.
- Antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında örnek türleri ile antibiyotik dirençleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Suşların elde edildikleri örnek gruplarına göre antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında alt solunum yolu örneklerinin aztreonam, meropenem ve imipeneme, solunum yolu dışı örneklerle göre daha dirençli olduğu saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).
- PAO-1'in biyofilm değerlerine göre, çalışmaya alınan suşlardan 38 tanesinin zayıf, 46 tanesinin orta kuvvetli ve 16 tanesinin kuvvetli biyofilm yaptıkları saptandı.
- Alt solunum yolu örneklerinin yaptığı biyofilm düzeyleri ile diğer sistem örneklerinin yapmış oldukları biyofilm düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

- PAO-1'e göre zayıf biyofilm yaptığı saptanan 30 suş ile karşılaştırma amaçlı olarak kuvvetli biyofilm yaptığı saptanan 10 suşun QS genleri incelendiğinde, 40 suş içerisinde sadece 5 suшта, internal ve intakt geni içeren total gen kaybı görüldü.
- Bu suşlardan 2'sinde sadece *lasI*, 1'inde sadece *rhII*, 1'inde sadece *rhIR* geninde internal ve intakt fragmentler saptanmazken, 1 suшта hem *lasR*, hem *rhII* ve hem de *rhIR* geninin intakt ve internal fragmenti saptanmadı.
- Total gen kaybı saptanan suşların biyofilm özellikleri değerlendirildiğinde zayıf biyofilm yapan 4 suшта en az 1 QS geninde total kayıp görülürken, kuvvetli biyofilm yapan suşlardan sadece 1 tanesinde total gen kaybı saptandı.
- Zayıf biyofilm yapan suşlar ile kuvvetli biyofilm yapan suşlar arasında QS gen kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

KAYNAKLAR

1. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 2000; 68: 4331–4334.
2. Sawa T, Ohara M, Kurahashi K, Twining S, Frank DW, Doroques DB, et al. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun* 1998; 66: 3242-3249.
3. Wang Y, Dai Y, Zhang Y, Hu YB, Yang BY, Chen SY. Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci China Ser C-Life Sci* 2007; 50: 385-391.
4. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 277-281.
5. Suga H, Smith KM. Molecular mechanism of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 586-591.
6. Akova M. Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: Umut vadeden yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı. *ANKEM* 2005; 19: 126-128.
7. Baştürk S. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2005.
8. Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. Editors: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC, 1995: 509-519.

9. Algun U, Arısoy A, Gündüz T, Özbakkaloğlu B. The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. Indian J Med Microbiol 2004; 22: 112-114.
10. Karadenizli A, Kolaylı F, Gündeş S, Ergen K. *Pseudomonas aeruginosa*'nın tikarsilin-klavulanik aside duyarlılığının hastanede kullanıma girmeden ve kullanıma girdikten bir yıl sonraki değişiminin araştırılması. KLİMİK 2002; 15: 89-91.
11. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1379-1382.
12. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-Test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 33-36.
13. Erdem B. Pseudomonaslar. Editör: Ustaçelebi Ş ve ark, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 551-566.
14. Bilgehan H. Non-fermentatif gram olumsuz basiller. Editör: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2000: 175-197.
15. Howard BJ, Klas J, Rubin SJ, Weissfeld AS, Tilton RC. Nonfermentative gram negative bacteria. Editors: Carson D, Bircher S. Clinical and Pathogenic Microbiology. St Luis, Washington DC, Toronto 1987: 329-358.
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: 43-51.
17. 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.

18. Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlet LD. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 1994; 62: 4572-4579.
19. Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 2002; 70: 1352-1358.
20. 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 neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 1996; 64: 37-43.
21. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006; 36: 78-91.
22. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001; 183: 5395-5401.
23. Leidal KG, Munson KL, Denning GM. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 186-195.
24. Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cell. *Infect Immun* 1998; 66: 5777-5784.

25. Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. J Biol Chem 2004; 279: 30871-30879.
26. 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.
27. Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. J Bacteriol 1991; 173: 5290-5297.
28. Malloy JL, Veldhuizen RAW, 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: 409-418.
29. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AL, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C supresses neutrophil respiratory burst activity. Infect Immun 1999; 67: 2371-2376.
30. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquins S, Speelman P, Van Deventer SJH, Van Der Poll T. Impairment of host defence by exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. J Med Microbiol 2001; 50: 822-827.
31. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virölans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrob Cem Derg 2008; 38: 42-51.
32. Sakarya S. Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virölans ve tedavisindeki rolü. In: Çavuşlu Ş, Oral Ö, editors. 12.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 16-20 Kasım 2005; Antalya-Belek. 3-8.

33. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-193.
34. Stickler DJ, Morris NS, McLean RJC, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing signal molecules in situ and in vitro. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3486-90.
35. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 2002; 184: 1140-1154.
36. Bullitt R, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. Nature 1995; 373: 164-167.
37. Fletcher M, Lessman JM, Loeb GI. Bacterial surface adhesives and biofilm matrix polymers of marine and freshwater bacteria. Biofouling 1991; 4: 129-140.
38. Beech IB, Gaylarde CC. Adhesion of bacteria to mild steel surfaces. J Appl Bacteriol 1989; 67: 2017-2020.
39. Çitçi Z. Kronik tonsillitte biyofilmin rolü. İstanbul: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2005.
40. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1318-1322.
41. Gilmore KS, Srinivas P, Akins DR, Hatter KL, Gilmore MS. Growth, Development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. Infect Immun 2003; 71: 4759-4766.
42. Wolz C, Goerke C, Landman R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. Infect Immun 2002; 70: 2758-2762.

43. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by Staphylococcal clinical isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 3235-3238.
44. Jefferson KK, Pier DB, Goldman DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2004; 186: 2449-2456.
45. Wagner VE, Iglewski BH. *P.aeruginosa* biofilms in CF infection. Clinic Rev Allerg Immunol 2008; 10: 8079-8090.
46. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. Int J Antimicrob Agents 2007; 30: 236-241.
47. Delissalde F, Amabile-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.
48. Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. J Immunol 2003; 171: 4329-4339.
49. March JC, Bentley WE. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. Curr Opin Biotech 2004; 15: 495-502.
50. De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun 2000; 68: 4839-4849.
51. Taga ME, Bassler BL. Chemical communication among bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 14549–14554.

52. Camara M, Williams P, Hardman A. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 667-676.
53. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, et al. Bacterial communication “Quorum Sensing” via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 417-423.
54. <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/what2.htm> adresinden 14 Eylül 2008 tarihinde ulaşılmıştır.
55. Saraçlı MA. Quorum sensing: mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Derg* 2006; 48: 244-250.
56. Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MTG, et al. LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* 2002; 148: 909-922.
57. <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/grampositives.htm> adresinden 14 Eylül 2008 tarihinde ulaşılmıştır.
58. Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 2003; 46: 207-214.
59. Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps KR, Christensen KB, Jensen PO, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 2005; 151: 1325-1340.
60. Nodwell JR, Losick R. Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 1998; 180: 1334-1337.

61. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J Clin Invest 2003; 112: 1460-1465.
62. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 2003; 6: 56-60.
63. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiol Rev 2006; 30: 274-291.
64. Delden CV, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg Infect Dis 1998; 4: 551-560.
65. Smith KM, Bu Y, Suga H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. Chem & Biol 2003; 10: 81-89.
66. Baysse C, Cullinane M, Denervaud V, Burrowes E, Dow JM, Morrissey JP, et al. Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. Microbiology 2005; 151: 2529-2542.
67. Hogardt M, Roeder M, Schreff AM, Eberl T L, Heesemann J. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. Microbiology 2004; 150: 843-851.
68. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect 2000; 2: 1721-1731.
69. Elastrı M, Delorme S, Lemanceau P, Stewart G, Laue B, Glickmann E, et al. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas spp.* than among soilborne *Pseudomonas spp.* Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1198-1209.

70. Bazire A, Dheilly A, Diab F, Morin D, Jebbar M, Haras D, ET AL. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and ramnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 2005; 253: 125–131.
71. Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andreumont A, Ruimy R. Transcription of quorum sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2003; 185: 7222-7230.
72. Singh MP, Greenstein M. A simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL) -related compounds in microbial extracts. J Microbiol Methods 2006; 65: 32–37.
73. Erickson DL, Endersby R, Kirkham A, Stuber K, Vollman DD, Rabin HR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. Infect Immun 2002; 70: 1783-1790.
74. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. Chem & Biol 2002; 9: 859–871.
75. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 8789–8793.
76. Sonawane A, Jyot J, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. Infect Immun 2006; 74: 7035-7039.
77. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. Microbiology 2005; 151: 1313-1323.

78. Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 2000; 182: 6401-6411.
79. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997; 179: 5756-5767.
80. Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007; 189: 2531-2539.
81. 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.
82. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 27-33.
83. Bjarnsholt T, Jensen PQ, Burmølle M, Hentzer M, Haagensen JAJ, Hougen HP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* 2005; 151: 373-383.
84. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003; 22: 3803-3815.
85. Huang CT, Shih PC. Effects of quorum sensing signal molecules on the hydrogen peroxide resistance against planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Immunol Infect* 2000; 33: 154-158.

86. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Schreckenberger PC, Winn W.C. The Nonfermentative Gram Negative Bacilli. Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiolojy 5 th. Ed. Philadelphia, JB Lippincott 1997; 264-277: 292-310.
87. Hooi DSW, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Pritchard DI. Differential immün modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules. Infect Immun 2004; 72: 6463-6470.
88. Clinical and laboratory standards institute (CLSI): antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları, onsekizinci bilgi eki, M100-S18. Editör: Gür D. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2008.
89. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol 2003; 185: 1027-1036.
90. Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 4809-4821.
91. 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.
92. Aktaş Z, Kipritçi Ö, Bakkaloğlu H, Aydın AE, Bal Ç. Transplantasyon ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının RAPD-PCR yöntemiyle tiplendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36: 88-93.
93. Rumbaugh KP, Hamood AN, Griswold JA. Cytokine induction by the *P.aeruginosa* quorum sensing system during thermal injury. J Surg Res 2004; 116: 137-144.

94. Aydın K, Çaylan R, Köksal İ, Volkan S, Öksüz R. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. Hastane İnfeks Derg 2000; 4: 92-96.
95. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 128-132.
96. Favre-Bonte S, Köhler T, Delden CV. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 598-604.
97. Cartagena E, Colom OA, Neske A, Valdez JC, Bardon A. Effects on plant lactones on the production of biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. Chem Pharm Bull 2007; 55: 22-25.
98. Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N. Dynamics and spatial distribution of beta lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1168-1174.
99. Wang EW, Jung JY, Pashia ME, Nason R, Scholnick S, Chole RA. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains as competent biofilm formers. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2005; 131: 983-989.
100. Hoşaf E, Çalıcı A, Çetin BD, Seber E. Yara, abse ve akıntı örneklerinden elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31: 18-21.
101. Tunçbilek S, Tezeren Z, Balaban N, Öztürk S, Işılak I. Hastane enfeksiyon etkeni *Pseudomonas aeruginosa*'ların in vitro antibiyotik duyarlılıkları. İnfeks Derg 1998; 12: 361-364.
102. Ardıç N, Özyurt M, İlga U, Erdemoğlu A, Haznedaroğlu T. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarının karbapenemlere ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM 2004; 18: 145-148.

103. Fidan I, Gürelik FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. ANKEM 2005; 19: 68-70.
104. Azık TE, Doğru Ü, Güriz H, Aysev AD, İnce E, Çiftçi E. Çocuklarda *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları. J Pediatr 2007; 1: 1-5.
105. Elaldı N, Turan M, Duran B, Bakır M, Dökmetaş İ, Bakıcı MZ, ve ark. Bir üniversite hastanesinde nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları: Etken mikroorganizmalar ve antimikrobiyal direnç. CÜ Tıp Fak Derg 2003; 25: 63-68.
106. Flam RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME, Karlowsky JA, Sahm DF. Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2431-2436.
107. Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* plant root interactions pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol 2004; 134: 320–331.
108. Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis J. Clin Microbiol 2002; 40: 4172–4179.
109. Anwar H, Strap JL, Chen K, Costerton JW. Dynamic interactions of biofilms on mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1208-1214.
110. Duan K, Surette MG. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 Las and Rhl quorum sensing system. J Bacteriol 2007; 189: 4827-4836.

111. 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.
112. Juhas M, Eberl L, Tümler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005; 7: 459-471.
113. Brelles-Marino G, Bedmar EJ. Detection, purification and characterisation of quorum sensing signal molecules in plant associated bacteria. *J Biotechnol* 2001; 91: 197-209.
114. Smith RS, Haris SG, Phipps R, Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vitro. *J Bacteriol* 2002; 184: 1132-1139.
115. Boşgelmez-Tınaz G, Ulusoy S. Characterization of N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 2008; 44: 13-19.
116. Chen CC, Riadi L, Suhc SJ, Ohman DE, Ju LK. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation. *J Biotechnol* 2005; 117: 1–10.
117. Ohman D, Brint JM. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 1995; 177: 7155–7163.
118. Doğan Y, Bayrakal V, Bahar İH, Baskın H. Gentamisin varlığında *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu ve quorum sensing ilişkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007; 37: 134-137.

119. Shih PC, Huang CT. Effects of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 309-314.
120. Reimmann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology 2002; 148: 923-932.
121. Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC, Colmer-Hamood JA, Burrowes BH, et al. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2007; 56: 738-748.
122. Heydorn A, Ersboll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, et al. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 2008-2017.
123. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2007; 189: 5383-5386.
124. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 4457-4464.
125. Schaber JA, Triffo WJ, Suh SJ, Oliver JW, Hastert MC, Griswold JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. Infect Immun 2007; 75: 3715-3721.
126. 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: 5854-5862.

127. Tang HB, Dimango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, et al. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model infection. *Infect Immun* 1996; 64: 37-43.
128. Zhu H, Thuruthyil SJ, Willcox MDP. Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1063–1070.
129. Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Andersen JB, Hoiby N, Molin S. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5247-5255.