

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ENFEKSİYONU
GELİŞİMİNDE, ETKEN-KONAK
ETKİLEŞİMİNİN KARŞILIKLI KİNETİĞİ**

VAHİDE BAYRAKAL

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İzmir- 2008

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ENFEKSİYONU
GELİŞİMİNDE, ETKEN-KONAK ETKİLEŞİMİNİN
KARŞILIKLI KİNETİĞİ**

VAHİDE BAYRAKAL

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK
LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İ HAKKI BAHAR
Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. HÜSEYİN BASKIN

KISALTMA DİZİNİ	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Genel Özellikleri	2
1.2. Biyofilm Oluşumu	3
1.3. Çoğunluğu Algılama	5
1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Biyofilm ilişkisi	7
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Çoğunluğu Algılama İlişkisi	8
1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Proteaz Enzimleri	10
1.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Oksidaz, Katalaz Üretimi	10
1.8. Aminoglikozidler	11
<i>Başlıca Üstünlükleri:</i>	11
1.8.2. Etki Mekanizmaları:	11
1.8.3. Antibakteriyel spektrum:	12
1.8.4. Gentamisin:	12
1.8.5. Amikasin:	12
1.8.6. Netilmisin:	13
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
2.1. Besiyerleri	14
2.2. Kimyasal Maddeler	14
2.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	14
2.4. Mikro Dilüsyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'lerinin Belirlenmesi	14
2.5. Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi	15
2.5.1. Statik Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi	15
2.5.2. Dinamik Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi	15
2.6. Suşların Çoğunluğu Algılama yanıtlarının Değerlendirilmesi	15
2.6.1. Mikro AHL Yöntemi ile ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi	15
2.6.2. Difüzyon Yöntemi ile ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi	16
2.7. Alkalen Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	16
2.8. Alkalen Proteaza Bağlı Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	16
2.9. Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	17
2.10. Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	17
3. SONUÇLAR	18
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Gentamisin, Netilmisin; Amikasin Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri	18
3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde Çoğunluğu Algılama Yanıtları	18
3.2.1. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Çoğunluğu Algılama (ÇA) Yanıtlarının Değerlendirilmesi	18
3.2.2. Amikasin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi	18
3.2.3. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi	19
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde Patojenite Yanıtları	19

3.3.1. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaz Üretimini Değerlendirilmesi.....	19
3.3.2. Amikasin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaz Üretimini Değerlendirilmesi.....	19
3.3.3. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaz Üretimini Değerlendirilmesi.....	20
3.3.4. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi	20
3.3.5. Amikasinin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi	20
3.3.6. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Alkalen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi	20
3.3.7. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	21
3.3.8. Amikasin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	21
3.3.9. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	21
3.3.10. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	22
3.3.11. Amikasin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	22
3.3.12. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi	22
3.3.13. Gentamisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi.....	23
3.3.14. Amikasin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi	23
3.3.15. Netilmisin Etkisinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi	23
4. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
7. KAYNAKLAR.....	41
8. EKLER	49

KISALTMA DİZİNİ

AHL: Açillenmiş Homoserin Lakton

AI: Kendi Kendini Uyarıcı, “Autoinducer”

AK: Amikasin

Arr: “Aminoglycoside Response Regulator”

CRP: “Catabolite Repressor Protein”

ÇA: Çoğunluğu Algılama

di c-GMP: İkincil Mesajcı Olan di Siklik Guanozin Mono Fosfat

EPS: Ekzopolisakkarit

GN: Gentamisin

Las I: 3- oxo- C12 – HSL- L, Uzun Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni

Las R: “Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen

LBA: Luria Bertani Agar Besiyeri

LBB: Luria Bertani Broth Besiyeri

LPS: Lipopolisakkarit

McF: McFarland

MHB: Muller Hinton Broth Besiyeri

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

NET: Netilmisin

Rhl I: C4 – HSL, AI Sentaz Geni, Kısa Zincirli AHL Sentezinden Sorumlu AI Sentaz Geni

Rhl R: “Transcriptional Activator” Proteini Kodlayan Gen

RpoS: Sigma Faktör

Sub-MİK: Subminimal İnhibitör Konsantrasyon

ÖZET

***Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonu Gelişiminde, Etken-Konak Etkileşiminin Karşılıklı Kinetiği**

Biyotik ve abiyotik yüzeylere yerleşebilen ve fırsatçı bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*; dünyada olduğu kadar ülkemizde de hastane infeksiyonlarının önemli bir kaynağıdır.

Mikroorganizmaların kendi aralarında haberleşme sistemleri olan Çoğunluğu Algılama (ÇA; Quorum Sensing), virulans etkenlerinin üretiminin yeniden düzenlenmesinde de etkin olmaktadır. Bakteriler, hücre dışı sinyal molekülleri ile çalışan bu sistemleri lokal yoğunluklarını belirlemek amacı ile de kullanırlar.

Konak (*in vitro* sistem) ve değişik antibiyotik konsantrasyonları (subminimal inhibitör konsantrasyonlar =sub-MİK) ile karşılaşmış *Pseudomonas* arasındaki ilişkinin tanımlanması sağaltımın planlanmasında önem kazanmaktadır.

Günümüzde *Pseudomonas* enfeksiyonlarının sağaltımında antibakteriyeller yanı sıra, bakterinin genotipik ve fenotipik tiplendirilmesinin de büyük önemi olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada; minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlendikten sonra gentamisin, netilmisin ve amikasinin MİK ve sub-MİK konsantrasyonları ile karşılaşmış biri ÇA olumlu, diğeri ÇA olumsuz iki klinik *Pseudomonas aeruginosa* ve standart *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (ÇA olumlu) suşlarının ÇA sistemleri, biyofilm oluşumu, alkalin proteaz, jelatinaz, oksidaz, katalaz üretimi, kinetikleri belirlenen zaman aralıklarında değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak *Pseudomonas* sağaltımında ÇA' nın yeni, olası "sağaltım hedefleri" deki rolünün anlaşılmasında; ÇA olumlu ve ÇA olumsuz *Pseudomonas aeruginosa* suşları ile konak arasındaki ilişki, ÇA sistemlerinin patojenite üzerine olası etkileri, bu etkilerin zamanlamalarının saptanması gibi birçok etmenin yer aldığı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, "Quorum Sensing", subminimal konsantrasyonları,

SUMMARY

Mutual Kinetics of Agent – Host Relation in the Development of *Pseudomonas aeruginosa* Infection

Pseudomonas aeruginosa is a human opportunistic pathogen that colonises biotic and abiotic surfaces and has been emerging as an important source of nosocomial infections in Turkiye as well as any other country in the world.

It was shown that quorum sensing is an inter bacterial signalling system and is efficient on the regulation of virulence factors. These systems are efficient with extracellular signalling molecules and are used in order to detect the local concentration of bacteria.

In planning the therapy it is getting necessary to identify the relationship between the host (*in vitro* system) and the *Pseudomonas* following the exposure of the decreasing concentrations of antibiotics (subminimal inhibitory concentrations = sub-MICs).

Today it is thought that the therapy of *Pseudomonas* infections can not be realized only by the antibacterials but the genotyping and phenotyping are the main stones of this multifactorial therapy.

In this study, following the determinations of minimum inhibitor concentrations (MICs) of gentamicin, netilmicin and amikacin; biofilm formation, alkalene protease, gelatinase, catalase productions of the two clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* (one is QS positive / one is QS negative) and standard ATCC 27853 strains (QS positive), that were exposed to MIC and sub-MICs of these antibiotics, were determined in identified time intervals.

As a result, it is suggested that factors like the relation between QS positive / QS negative *Pseudomonas aeruginosa* strains with the host and the possible effect of QS systems on pathogenicity may play important roles in understanding the effect of QS in the new, possible therapeutic targets.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, “Quorum Sensing”, subminimal inhibitory concentrations

GİRİŞ ve AMAC

Yeterli nüfus yoğunluğunda bakteriler; salgıladıkları autoinducer (AI) adı verilen özgül moleküller ile aralarında iletişimi sağlarlar ve bu kontrol mekanizması Çoğunluğu Algılama (ÇA; Quorum Sensing) olarak adlandırılır. Patojen bakteriler ÇA sistemlerini kullanarak virülans etmenlerinin yapımını kontrol ederler.

Pseudomonas aeruginosa, üzerinde birçok bilimsel çalışmanın sürdürüldüğü bir mikroorganizmadır. ÇA sistemlerinin varlığı, bu bakterinin virülans davranışlarının yalnızca bir bölümünü açıklar görünmektedir. *P. aeruginosa* ile konak (*in vitro* sistem) ve antibakteriyeller arasındaki etkileşimi ele alan çalışmalar, bu mikroorganizmanın insan vücudundaki davranışlarını açıklamak ve sağaltım modelleri üzerindeki çalışmalara yön vermek noktasında değerli bilgiler sunacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

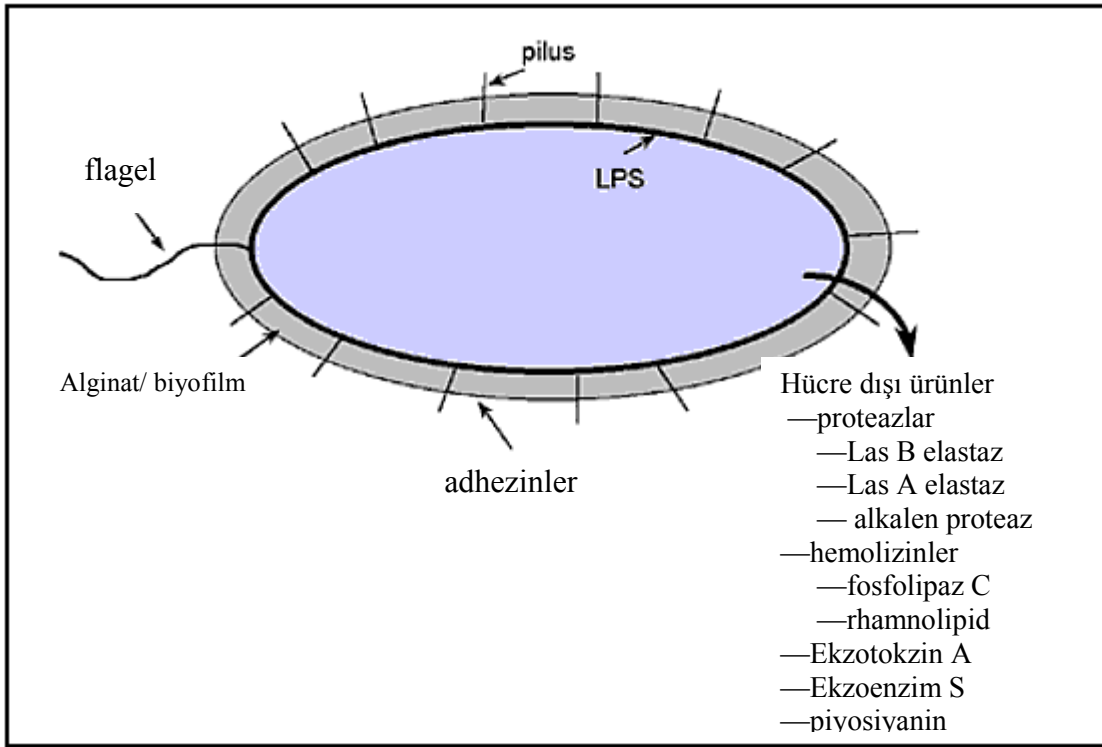
1.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) toprakta ve suda sıklıkla bulunan Gram olumsuz bir bakteridir. Zor koşullar altında canlı kalabilen ve fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*; kistik fibrosis, yanık enfeksiyonu ve HIV hastaları gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olabilir (1).

Akut ve kronik enfeksiyon boyunca farklı virülans etmenleri üretebilen *P. aeruginosa*; hastane enfeksiyonlarının % 16, hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonlarının % 12 ve cerrahi enfeksiyonlarının % 8' inin etkenidir (2).

Virülans, bakterinin hastalık yapma kapasitesini gösterir. Bakteri hücrelerini konak immun savunmasından koruyan, dokuda kolonizasyona ve / veya invazyona neden olan hücre dışı enzimler ve / veya hücre yüzeyine bağlı etmenler, bakterinin virülansını belirlemektedir. Virülans etmenlerinin enfeksiyon boyunca bakterinin yaşaması ve üremesi için gerekli olması, sadece prokaryotlara özgü bir özelliktir. Aynı zamanda bu virülans etmenleri sağaltımda antibakteriyellerin de hedefleridir. Enfeksiyonun erken safhaları boyunca bakteri, ökaryotik hücre yüzeylerine ve hücre dışı matrikse tutunmak için yüzey adhezinlerini oluşturur. Eğer enfeksiyon kronikleşmeye başlarsa, hücre dışı toksinlerin ve konaktan korunmak için gerekli olan etmenlerin yapımı artmaktadır (3). Kolonizasyon sonrasında üretilen tüm bu virülans etmenlerinin, bakteriyel enfeksiyonların yayılmasına, kolonizasyondan sonra doku hasarına, kan dolaşımına invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu hücre dışı enzim ve toksinlerin üretimi *P. aeruginosa*'nın enfeksiyon evresine ve yerleştiği yere göre değişmektedir (4, 5).

P. aeruginosa; türe özgü hücre dışı virülans etmenleri olan elastaz, alkalin proteaz, ekzoenzim S ve ekzotoksin A gibi birçok proteaz ve toksin üretir (Şekil 1).



Şekil 1. *P. aeruginosa*'nın virulans etmenleri. *P. aeruginosa*'da hem hücre ile ilişkili flagel, pilus, adhezinler, alginat/biyofilm, lipopolisakkarit (LPS) hem de proteaz, hemolizin, ekzotokzin A, ekzoenzim S, piyosivanin gibi hücre dışı virulans etmenleri bulunur (5 numaralı kaynaktan alınmıştır).

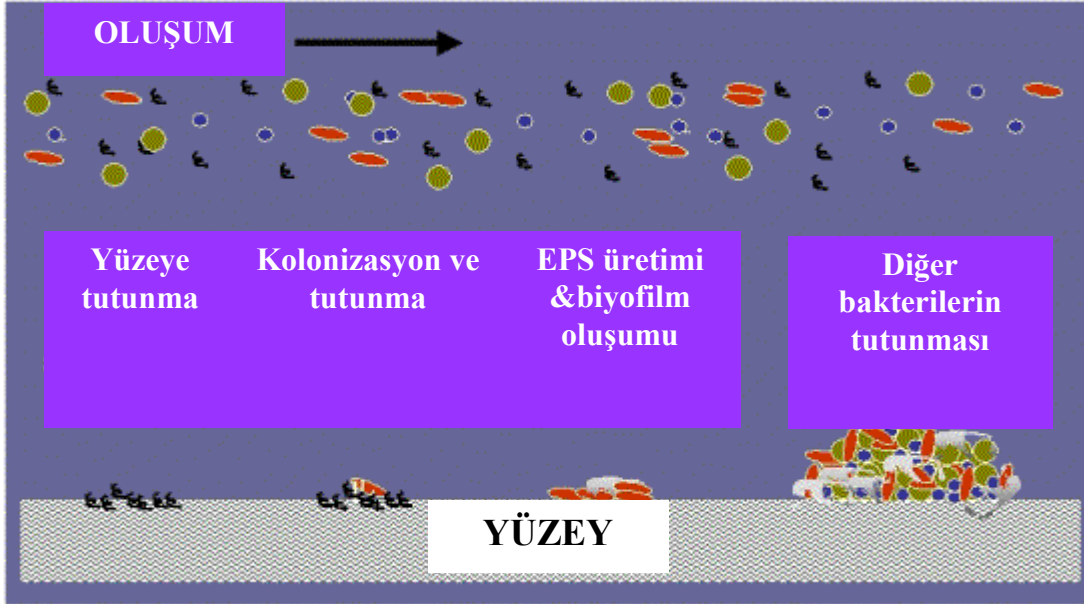
1.2. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu, bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) ve fimbriyalar ile biyotik ve / veya abiyotik yüzeye tutunmasıyla başlamaktadır. Yüzeğe tutunan bakterinin tutunma materyali olarak yeni EPS sentezlemesi ile biyofilm yapısı gelişmeye başlar (Şekil 2). EPS sentezi ile ilgili enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin sunumu ve değişen mikroçevreye uyumda etkin olan proteinlerin salınımının artması ile biyofilm yapısındaki bakterilerin fenotipleri, planktonik bakterilerden farklı bir fenotipe dönüşmektedir (6,7).

Mikroorganizmanın tipi, yüzey bileşenlerinin yapısı ve / veya çevresel etmenlerin çeşitliliği biyofilm yapısındaki farklılığa neden olmaktadır. Biyofilmler; mikroorganizma, glikokaliks (bakteriyel ekzopolisakkarit) ve yüzey olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerden birinin olmadığı durumda biyofilm yapısının oluşmadığı gösterilmiştir. Birçok türde baskın olarak anyonik yapıda olan, glikokaliks bileşeni ve

çevresindeki besin ile mineraller ve *in vitro* ortamda pH, pCO₂, pO₂, divalent katyon yoğunluğu, hidrasyon düzeyi bakterinin mikroçevresini oluşturmaktadır (8).

Biyofilm oluşumunun gelişimi Şekil 2' de özetlenmiştir(9).



Şekil 2. Biyofilm oluşumunun gelişimi (9 numaralı kaynaktan alınmıştır).

Biyofilm gelişimi, çevresel koşulların etkisine göre dinamik ve statik olmak üzere iki biçimde değerlendirilir ve deneysel modeller bu ayırım üzerinden kurgulanabilir. Statik biyofilm oluşumunda biyofilmin aşırı üretimi gözlenirken, dinamik biyofilm oluşumlarında; ortamın hareketli olması (akış hızı ve yoğunluğuna bağlı olarak kopma gücü: shear stres) ve havalandırmanın artmasına bağlı olarak, statik biyofilm oluşumuna kıyasla daha az ve oluşum süresinin daha uzun olduğu gösterilmiştir. Dinamik koşullarda, planktonik kültür yoğunluğunun daha fazla olduğu buna karşın planktonik büyüme ile ters orantılı olarak tutunmanın daha az olduğu gösterilmiştir (10).

Tek veya birçok bakteri türü birlikte; kateter, kontak lens gibi birçok gereç yüzeylerinde biyofilmler oluşturabilmektedir (11- 13). Biyofilm katmanlarındaki bakterilerin yerleşimine göre değişen fizyolojik ortam farklılığı, antibiyotik sağaltımında karşılaşılan problemlerin nedeni olabilmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturduğu zaman, antibakteriyel ajanların etkisine 10–100 kat daha dirençli hale gelmeleriyle, sağaltım güçlükleri ortaya çıkmaktadır (14).

Biyofilm oluşmasıyla birlikte ortaya çıkan direncin gelişmesinde tanımlanan mekanizmalar:

1. Antibakteriyel ajanların bakteriye etkisinin fiziksel ve kimyasal olarak engellenmesi,
2. Biyofilm yapısındaki bakterilerin; besin azlığı nedeniyle üreme hızlarını yavaşlatmaları,
3. Genel stres yanıtlarının etkinleşmesi,
4. Biyofilm oluşumu ile birlikte bakteride meydana gelen fenotip değişikliği

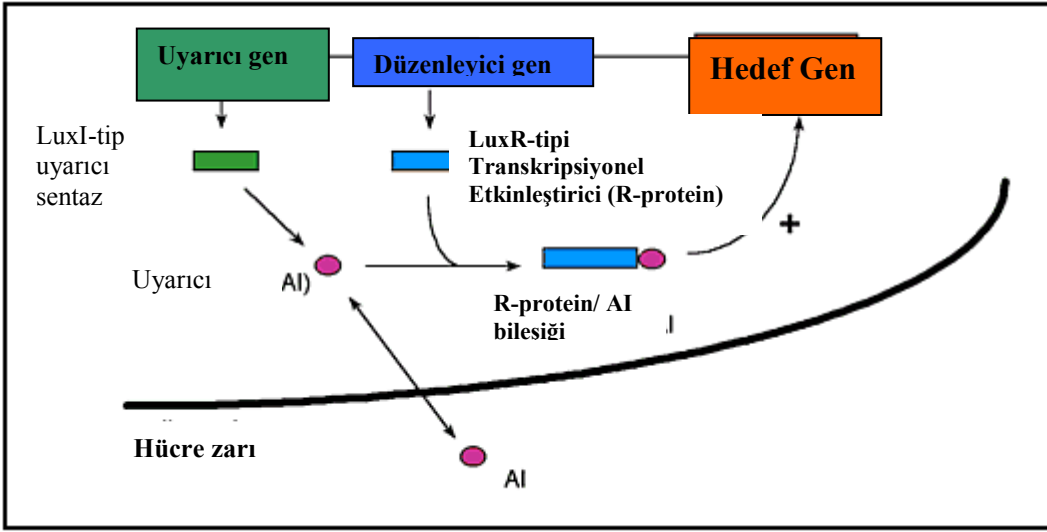
olarak açıklanmaktadır (15, 16).

Biyofilmin temel bileşeni olan glikokaliks matriksinin üretimi, antibakteriyel ajanların biyofilm yapısında bulunan bakterilere ulaşmasını engellemektedir (17). Mimarilerindeki farklılığa göre, kalın ve ince olarak tanımlanan biyofilm türlerinde antibiyotiklere direncin farklı olduğu gösterilmiştir. Kalın biyofilm yapısında bulunan bakterilerin, hidrojen peroksidin etkisinden korundukları da belirlenmiştir (18).

1.3. Çoğunluğu Algılama

Bakteriler iletişim sinyalleri ile buldukları yerdeki yoğunluklarını belirleyip, değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler. Bu davranış, çoğunluğu algılama (“quorum sensing”) (ÇA) olarak adlandırılmaktadır. Bakteri yoğunluğuna bağlı olarak salınan sinyal molekülleri ile çalışan ÇA sistemleri, bakteri plazmid konjugasyonu, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu ve çeşitli virulans etmenlerinin üretimi gibi birçok fizyolojik etkinliği düzenlemektedir (19- 22).

Çoğunluğu Algılama kavramı ilk kez, deniz hayvanlarının ışık organlarına yerleşerek simbiyoz yaşayan bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) ' de tanımlanmıştır. *V. fischeri* deniz hayvanının ışık organında yüksek yoğunluklara kadar üreyebilir. Belli bir eşik değer üzerindeki yoğunluğa kadar ürediklerinde, lux CDABEGH genleri ile şifrelenen lusiferaz enzimini üretirler ve bunun sonucunda bir ışımaya gerçekleşir. Bu enzimin etkinliği düşük yoğunluklarda baskılanır (23). Gram olumsuz bakterilerde de ÇA, *V. fischeri*'de ilk defa açıklanan LuxIR dizgesi aracılığıyla olabilmektedir. LuxIR dizgesi, LuxI proteinini kullanarak “kendi kendini uyarıcı” (AI) ve buna bağlanarak gen sunumunu düzenleyen LuxR' yi birleştirir (Şekil 3) (24). Bakteri tarafından üretilen AI' lar, türe özgül olmakla birlikte nadiren diğer türlerin LuxR tipi düzenleyicileri ile birbirlerini etkiler (25).



Şekil 3: Hücre- hücre iletişim sinyal sistemi. ÇA sistemi “autoinducer” (AI) sentaz genini kodlayan I geni ve transkripsiyonel etkinleştirici protein olan R geni olmak üzere iki gen bileşeninden oluşur. AI molekülünün sentezlenmesi ile R proteini ile bileşik oluşturarak hedef geni etkinleştirir ve hücre zarından çıkarak hücre dışı haberleşmede sinyal molekülü olarak kullanılır (5 numaralı kaynaktan alınmıştır).

ÇA sistemlerinin çalışma evreleri:

1. Hücre yoğunluğuna bağlı birikme,
2. Küçük sinyal molekülleri,
3. Komşu hücreleri belirleme,
4. Belirlenen yoğunluğa göre özgül transkripsiyonel yanıtları tetikleme,

biçiminde özetlenebilir (26).

Gram olumlu bakteriler; sinyal molekülleri olarak peptidleri kullanırlar. Bu AI peptidler sitoplazmada öncül peptidler olarak üretilir, yıkılır, değiştirilir ve taşınır. Bu hücre dışı AI polipeptidler; iki bileşenli bir dizge ile çalışır. Dış zara bağlı algılayıcı bir kinaz proteinin dış bölümü AI' ları saptar, sonra fosforlanır ve DNA' ya bağlanıp onun kopyalanmasını düzenleyecek bir yanıt düzenleyicisini etkinleştirir (27, 28).

AI-2 hem Gram olumlu hem de Gram olumsuz bakterilerde kullanılan ÇA sinyal molekülleridir. AI- 2, çevre koşullarında LuxP / LuxQ adı verilen iki bileşenli dizge ile tanımlanır ve bunun sonucunda oluşan fosforlanma zinciri gen kopyalanmasının düzenlenmesi ile sonuçlanmaktadır (29, 30).

Gram olumsuz bakteriler, AI olarak adlandırılan “açillenmiş homoserin lakton” u (AHL) hücreler arası sinyal molekülü olarak kullanmaktadırlar. Fizyolojik koşullarda büyümenin özgül evreleri boyunca üretilen, bakteriden difüzyon ve/ veya transport yolu ile salınan AI molekülleri; eşik değerdeki yoğunluğa ulaşana kadar bakteri dışında birikir, çevredeki bakteriye girer, transkripsiyonal aktivatörleri etkiler ve genlerin transkripsiyonunu tetikler (32). Tüm bakterilerin AI molekülleri benzer kimyasal yapıda olmasına ve kendi yağ asitlerinin modifikasyonunun farklılığı nedeniyle türe özgü olmasına karşın değişik türdeki birçok bakterinin ortak AI moleküllerini kullandığı gösterilmiştir. (22, 31).

1.4. *Pseudomonas aeruginosa* – Biyofilm ilişkisi

Bakteri mikroçevrede birikmeye başlayınca besin azlığı nedeniyle üreme yavaşlamaktadır. Olgun biyofilmlerde meydana gelen üremenin yavaşlaması, antibiyotiklere dirence neden olabilmektedir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinden izole edilen *P. aeruginosa* virülans etmenlerinin çevre koşullarına göre düzenlendiği gösterilmiştir. Kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin solunum yüzeylerinin düşük oksijen içermesi nedeniyle bu mikroçevrede oluşan *P. aeruginosa* biyofilmleri; aerobik koşullarda oluşan biyofilm yapıları için gerekli olan farklı genlerin aktivasyonu ile oluşmaktadır (32).

Üriner ve akciğer *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oluşan biyofilm yapı mimarisinin antibiyotik direncinin gelişmesinde oldukça önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Kalın mukozal yapı; kistik fibrosisli hastaların akciğerlerinin önemli bir mikroçevre özelliğidir. Landry ve arkadaşları *in vitro* yaptıkları bir çalışmada musin üzerinde büyük hücresel birikimler ile oluşan *P. aeruginosa* biyofilmlerinin mimarisinin farklı olduğunu ve musin ile ilişkili biyofilmlerin tobramisine daha dirençli olduğunu göstermişlerdir (33). *P. aeruginosa* yavaş üreme evresinde, planktonik ve biyofilm hücrelerinin siprofloksasine eşit direnç gösterdiği görülmüştür. Ancak üreme hızı artıkça, planktonik hücreler biyofilm hücrelerinden daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sonuca göre biyofilmin yapısal elemanları ve üremenin yavaşlaması, antibiyotik sağaltımında biyofilmlerin neden olduğu dirençte oldukça önemlidir. Biyofilm hücrelerinin planktonik hücrelerden 15 kat daha fazla antibiyotik direnci kazandığı dönem, durağan dönemdir. Buna göre üremenin hızlanması direnç seviyeleri için bir göstergedir ve üremenin yavaşlaması da koruyucu bir etki gösterebilmektedir (6).

Fizyolojik değişiklik olduğu zaman çevre streslerinden hücreyi korumak için “Stres yanıtları” meydana gelir. Böylelikle bakteriler sıcak ve soğuk şoklardan, pH

değişikliklerinden ve kimyasal ajanların etkilerinden korunmuş olurlar. Bu stres yanıtlarının merkezi düzenleyicisi durağan dönemde sunulan sigma etmenidir (RpoS). Bakteriler yüzeye tutunmaya başladığı zaman genel biyofilm fenotipini oluşturmaya başlar veya planktonik hücrelerdeki biyofilm oluşumu ile ilgili olarak tanımlanan genleri uyarmakta veya oluşumunu baskılamaktadır. Direnç fenotiplerinin meydana gelmesinde sınırlı besin, belirli stres tipleri, artan hücre yoğunluğu veya tüm bu etmenler birden etkili olabilir (6).

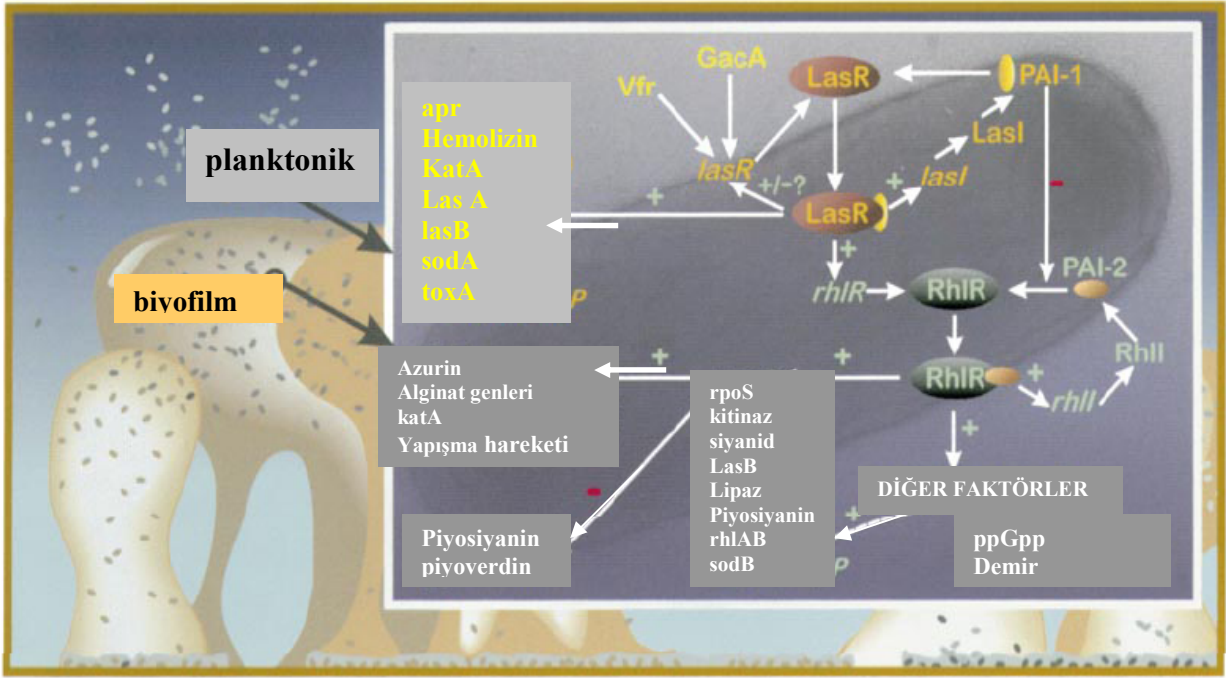
1.5. *Pseudomonas aeruginosa* - Yoğunluğu Algılama İlişkisi

P. aeruginosa'nın hücre dışına salgıladığı birçok virulans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili "las" ve "rhl" olarak tanımlanan iki ÇA sistemi ile kontrol edildiği gösterilmiştir (7). Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (LasA ve Las B), alkalin proteaz, hidrojen siyanid, ekzotokzin A, piyosiyenin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen (rpoS), ve süperoksid dismutaz başta olmak üzere çeşitli virulans etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (31).

Las B elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de "las sistemi" olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3-oxo-C12-HSL-L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI sentaz geni) ve *Las R* ("transcriptional activator" proteini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotokzin A gibi diğer ekstrasellüler virulans etmenlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder (34-36).

İkincil ÇA sistemi olan "rhl sistem" ise; *rhl I* (C4-HSL, AI sentaz geni, kısa zincirli AHL) ve *rhl R* ("transcriptional activator" proteini kodlayan gen)'den oluşur. Rhl AB operonunun (operon: yönetici DNA bölgesi) yapımını kontrol eden bu sistemin, rhamnolipid üretimi için gerekli olan "rhamnosyltransferase" enziminin sentezlemesini düzenlemesinin yanı sıra, Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyenin, siyanid ve alkalin proteazın üretimini de düzenlediği bilinmektedir (Şekil 4). (34, 37).

P. aeruginosa'da yoğunluğu algılama kontrolünün modeli Şekil 4' de gösterilmiştir(38).



Şekil 4: *P. aeruginosa*' da çoğunluğu algılama kontrolünün modeli (38. numaralı kaynaktan alınmıştır).

P. aeruginosa' da tanımlanan lipaz ve proteaz, enfeksiyon süresince yüzeye tutunmayı sağlayarak, biyofilm oluşumu için gerekli olan Tip IV pili gibi virülans etmenlerinin düzenleyicisi; *Escherichia coli*' de tanımlanan “catabolite repressor protein” (CRP) ile homolog olan “Vfr” dir. Virülans etmenlerinin genel düzenleyicisi olarak tanımlanan Vfr, lasR ‘ nin kopyalamayı başlatan bölgesine özgün bağlanarak, dolaylı yoldan ÇA sistemlerinin kontrolünü yapmaktadır. Değişik sinyaller ile birçok geni harekete geçiren Vfr; LasR’ yi harekete geçirerek elastaz ve piyosiyanın üretimini sağlamaktadır (39- 41).

Durağan dönemde yapılan ve stres yanıtlarının merkezi düzenleyicisi olan RpoS; besin azlığı, osmotik basınç, oksidatif stres gibi çeşitli stres etmenlerine karşı birçok genin aktivasyonunu tetiklemektedir (42). Yeterli bakteri yoğunluğunda RpoS; rhlI RNA’ sının kopyalanmasını düzenlediği gösterilmiştir (43, 44).

Doğal veya kimyasallardan üretilen baskılayıcı etki gösteren antibiyotikler; diğer canlı mikroorganizmaların üremelerini engeller. Tüm antibiyotiklerin makromoleküler hedefleri diğer birçok hücrel eleman ile işlevsel etkileşim halindedir. Sub-MİK değerlerinde, birçok antibiyotiğin farklı bakterilerde transkriptin büyük bir grubunun oluşumunun artmasına veya

azalmasına neden olmaktadır. Yüksek antibiyotik yoğunluklarında stres cevaplarının üretildiği ve sub-MİK yoğunluklarındaki değişik cevapların uyarıldığı gösterilmiştir (45).

Fiziksel olarak antibiyotik penetrasyonunun baskılanması ile biyofilmler direncin artışına neden olmaktadır (46).

Hoffman ve arkadaşları aminoglikozidlerin sub-MİK konsantrasyonlarının; ikincil mesajcı olan di siklik GMP (di c-GMP)' in metabolizmasında gerekli gen bölgesi olan; "aminoglycoside response regulator" (Arr) genini aktive ederek *P. aeruginosa*' da biyofilm oluşumunu arttırdıklarını göstermişlerdir (47). *P. aeruginosa*' da di c-GMP metabolizması biyofilm oluşumu, virülans etmenlerinin oluşumu ve antibiyotik direnci için gerekli proteinlerin sentezlenmesinde önemlidir (48).

1.6. *Pseudomonas aeruginosa* – Proteaz Enzimleri

Proteazın; akut *P. aeruginosa* enfeksiyonu boyunca etkin olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*; LasB elastaz, Las A elastaz ve alkaleen proteazın bulunduğu birçok proteaz üretir. Alkaleen proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki etkisi tam olarak açıklanamamakta birlikte korneal enfeksiyonlarda etkisi olduğu bilinmektedir (49, 50).

1.7. *Pseudomonas aeruginosa* – Oksidaz, Katalaz Üretimi

Aerop bakteriler; katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri ile üreme sonrası oluşan hidrojen peroksit ve süperoksit iyonlarını metabolize etmektedirler. Hidrojen peroksit ve süperoksit iyonlarındaki oksijen atomu havanın serbest oksijeninden farklı elektriksiz yapıdadır ve dış membran proteinlerine toksiktir. Bu toksik moleküller; insan lökositleri tarafından da oluşturulur ve mikrobiyal yayılımı önleyici etkileri vardır. Mikroorganizma katalaz enzimi ile hidrojen peroksidi su ve oksijene çevirir. Süperoksit dismutaz enzimi ile de süperoksiti hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Hidrojen peroksit katalaz enzimi ile metabolize edilmesi ile mikroorganizma için toksik olan iyonların birikmesi engellenmiş olur (51).

Sitokrom oksidaz enzimi bazı bakterilerde elektron transportunun ve nitrat metabolizmasının bir üyesidir. Bu enzim; fenilendiamin türevleri gibi besin maddelerinden elektron alır, oksitlenmiş bir ürün oluşur (52).

1.8. Aminoglikozidler

Bu gruptaki antibiyotikler 1940' larda bulunan streptomisin ile başlayarak *Streptomyces* veya *Micromonospora* türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı sentetik maddeler olan gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, kanamisin, viyomisinidir.

Başlıca Üstünlükleri:

2. Gram- olumsuz aerobik basiller üzerinde; antibiyotiklerin çoğuna göre çok daha güçlü etkinlik gösterirler,
3. Hızlı bakterisid etki yaparlar,
4. Post antibiyotik etkileri belirgindir ve oldukça uzun sürer.

1.8.2. Etki Mekanizmaları:

Bakteri ribozomlarının aminoglikozidlerin birincil etki yeri 30S alt-birimleridir. Bu alt-bimirlere geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanarak, ribozomların protein sentezini inhibe ederler. Bu engelleme;

1. Protein sentezinin başlama basamağının engellenmesiyle,
2. mRNA moleküllerinin üzerindeki kodonların yanlış okunması nedeniyle yapıları bozulmuş, bir işlevi olmayan anormal proteinlerin sentez edilmesine neden olarak,
3. Ribozomal kompleksin mRNA' dan erken ayrılması sonucu tamamlanmamış anormal proteinlerin oluşması biçimindedir.

Protein sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösteren diğer antibiyotikler bakteriyostatik oldukları halde, aminoglikozidlerin aynı temel mekanizma ile hızlı bakterisid olmalarının nedenleri;

1. Ribozomlara bağlanmalarının geri dönüşümsüz olması,
2. Yanlış okuma sonucu sentez edilen anormal proteinlerin bakteri hücre membranında birikmesi nedeniyle membran geçirgenliğinin artması,
3. Bunun sonucu yaşamsal öneme sahip maddelerin hücre dışına çıkması ve fazla miktarda ilacın hücre içine girmesidir.

1.8.3. Antibakteriyel spektrum:

Aminoglikozidler esas olarak dar spektrumlu antibiyotiklerdir. Bunlara en duyarlı olan bakteri grubu Gram-olumsuz aerobik basillerdir. Bunlar arasında Enterobacteriaceae türleri (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella* ve *Serratia* türleri), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Brucella* türleri, *Yersinia tularensis* (tularemi etkeni), *Y. pestis* ve *Haemophilus influenzae* bulunur.

Aminoglikozid antibiyotiklerin çeşitli türlerinin duyarlı bakteriler üzerindeki etkinlikleri nicel olarak farklılık gösterir. Bu nedenle *in vitro* minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine veya plazmadaki terapötik doruk konsantrasyonları 4–10 µg/ mL arasında olanlar; gentamisin, tobramisin ve netilmisindir. MİK' leri 1–16 µg/ mL veya terapötik doruk konsantrasyonları 10 – 30 µg/ mL arasında olanlar; streptomisin, kanamisin ve amikasinidir. Bu konsantrasyon aralıkları içinde bazı üyelerin belirli bakterilere karşı etkinlikleri diğerlerinden fazla olabilir.

1.8.4. Gentamisin:

Micromonospora purpurea ' dan elde edilir. Gerçekte yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün (C₁ C_{1a} ve C₂) karışımından ibarettir. Aminoglikozid ilaçlar içinde amikasinden sonra spektrumu en geniş olan ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır. Duyarlı bakterilerde direncin gelişimi yavaş ve küçük derecededir. Amikasin hariç diğer aminoglikozidlere dirençli olan bakteri suşlarında gentamisin etkin olmakla birlikte gentamisine dirençli bakteri suşları amikasin hariç diğer aminoglikozidlerden pek etkilenmezler.

1.8.5. Amikasin:

Aminoglikozidler arasında yarı sentetik yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A' dan asilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili olarak gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklı olmasından dolayı en geniş spektrumlu aminoglikoziddir.

1.8.6. Netilmisin:

Yarı sentetik bir aminoglikozid antibiyotiktir. Amikasin gibi, bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklıdır; sadece asetilaz tarafından inaktive edilir. Bu nedenle gentamisine ve tobramisine dirençli *Enterobacteriaceae* grubu bakterilere karşı etkilidir. *Pseudomonas*, *Providencia* ve *Serratia* türlerine karşı etki gücü, gentamisine oranla biraz daha düşüktür (53).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Besiyerleri

1. Mueller Hinton Broth Besiyeri (Oxoid)
2. Luria Bertani Agar (Oxoid)
3. Luria Bertani Broth (Oxoid)
4. Skim Milk (Applichem)
5. Nutrient Agar (Applichem)
6. Gelatin (Applichem)

2.2. Kimyasal Maddeler

1. Gentamisin (İ.E.Ulagay, 20 mg/mL)
2. Amikasin (Biosel, 100 mg/ mL)
3. Netilmisin (Schering Plough, 400 mg/ mL)
4. Katalaz reaktifi (% 3' lük hidrojen peroksit)
5. Oksidaz reaktifi (1: 1 nnnn- tetrametil- 1,4 – fenilen diamin hidroklorid)

2.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Klinikten izole edilen iki *Pseudomonas aeruginosa* (K1, K2) ve standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanıldı.

ÇA yanıtlarını göstermek için rhl sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Chromobacterium violaceum* (CV026); las sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Agrobacterium tumefaciens* (A136) suşları kullanıldı.

2.4. Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'larının Belirlenmesi

Her suş için gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin MİK değerleri, mikrodilusyon yöntemi ile katyon eklenmiş Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde saptandı. Bakteriler McFarland (McF) 0. 5 (1, 5 x 10⁸ hücre/mL)' e eşit bulanıklıkta hazırlandı. ELISA mikro plaklarındaki kuyucuklara önce MHB besiyerinden eşit miktarlarda dağıtılıp, daha sonra antibiyotiklerin iki kat dilusyonları ve son olarak da bakteri

süspansiyondan dağıtıldı. Plaklar 18 saat 37°C’ de inkübe edildikten sonra 450 nm’ de spektrofotometrik olarak değerlendirildi (54, 55).

2.5. Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi

2.5.1. Statik Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi

McFarland 0. 5’ e eşit bulanıklıkta hazırlanan standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve klinikten izole edilen iki *P. aeruginosa* (K1, K2) suşu; gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin daha önce belirlenen MİK ve % 50, % 25, % 12.5 , % 6.2 X MİK yoğunlukları ile birlikte, eşit miktarlarda sıvı besiyeri içinde Eppendorf tüplerine ayrı ayrı ekilip, 37°C’ de inkübe edildi. Sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm değerlendirilmesi yapıldı. Tüpte biyofilm oluşumu yokken tutunmayan kristal viyole boyası, tüpün iç yüzeyini sıvı besiyeri boyunca boyamışsa, bu görüntü pozitif olarak değerlendirildi. (56, 57).

2.5.2. Dinamik Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi Yöntemi

McFarland 0. 5’ e eşit bulanıklıkta hazırlanan standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* ve K1 ve K2 suşu; gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin belirlenen MİK ve % 50, % 25, % 12.5 , % 6. 2 X MİK yoğunlukları ile birlikte eşit miktarlarda sıvı besiyerine; içinde cam boncuk eklenmiş “Eppendorf” tüplerine ayrı ayrı ekildi. Çalkalayıcı ile birlikte 37°C’ de inkübe edildi ve Sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde kristal viyole boyama yöntemi ile statik biyofilm değerlendirmesinde olduğu gibi değerlendirildi. Tüpte biyofilm oluşumu yokken tutunmayan kristal viyole boyası, tüpün iç yüzeyini sıvı besiyeri boyunca boyamışsa, bu görüntü pozitif olarak değerlendirildi (56, 57).

2.6. Suşların Çoğunluğu Algılama yanıtlarının Değerlendirilmesi

2.6.1. Mikro AHL Yöntemi ile ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Louria Bertani Agar (LBA) dökülen 96 çukurlu ELİSA mikro plakların LBB’ da 30 °C 18 saat inkübe edilip McF 0.5’ e eşit bulanıkta ayarlanan *Chromobacterium violaceum*(*rhl* sistemini görüntülemek (C4- HSL) için) ve *Agrobacterium tumefaciens* (*Las* sistemini (3-

oxo-C12-HSL) göstermek için) ile birlikte antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25, %12.5, %6.2 X MİK değerleri ile karşılaşmış standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarından eşit miktarda ekilerek 37 °C’ de 36 saat inkübe edilerek değerlendirilmeleri yapıldı. AHL varlığı makroskobik olarak değerlendirildi. “mavi- yeşil” renk görülmesi pozitif olarak kabul edildi (58, 59).

2.6.2. Difüzyon Yöntemi ile ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Önceden ısıtılmış LBA içeren petri kapları ikiye bölünerek bir tarafına LBB’ da 30°C 18 saat inkübe edilip McF 0.5’ e eşit bulanıkta ayarlanan *C. violaceum* (*rhl* sistemini görüntülemek (C4- HSL) için), diğer tarafına da aynı şekilde üretilip hazırlanan *A. tumefaciens* (*Las* sistemini (3- oxo-C12-HSL) göstermek için) bakterilerinin süspansiyonlarından eşit miktarda alınarak yayma ekimi yapıldı. Her iki bölüme de 5 mm çapında çukurlar açılıp, her bir çukura antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25, %12.5, %6.2 X MİK değerleri ile karşılaşmış standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarından eşit miktarda ekimi yapılarak, 30°C’ 48 saat inkübe edilerek değerlendirilmeleri yapıldı. “Mavi-yeşil” renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (60).

2.7. Alkalin Proteaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Nutrient agar %1,5 skim milk içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanmış olan bu skim milk içeren agar besiyerine, antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25, %12.5, %6.2, X MİK değerleri ile karşılaşmış standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarından eşit miktarlarda ekimi yapılarak 37 °C ‘de inkübe edildi. Sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerinin sonlarında değerlendirmeleri yapıldı. Şeffaflaşma zonunun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (61).

2.8. Alkalin Proteaza Bağlı Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Louria Bertani Agar 30g/L jelatin içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanmış olan bu besiyerine antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin, netilmisin) belirlenen MİK, %50, %25,

%12. 5, % 6. 2, X MİK değerleri ile karşılaşmış standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarından eşit miktarlarda ekimi yapılarak 37 °C 'de inkübe edildi. Sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerinin sonlarında değerlendirilmeleri yapıldı. Koloni çevresinde bulanıklık zonunun görölmesi pozitif olarak değerlendirildi (61).

2.9. Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Gentamisin, amikasin ve netilmisinin belirlenen MİK ve sub-MİK yoğunlukları ile birlikte ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilen standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarının oksidaz yanıtları sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde değerlendirildi (62).

2.10. Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Gentamisin, amikasin ve netilmisinin belirlenen MİK ve sub-MİK yoğunlukları ile birlikte ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilen standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile K1 ve K2 suşlarının katalaz yanıtları %3' lük hidrojen perokid ile sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde değerlendirildi (63).

3. SONUÇLAR

3.1 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Gentamisin, Netilmisin; Amikasin Antibiyotiklerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değerleri

Suşların gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotikleri için belirlenen MİK değerleri farklıdır. K1 suşu için sırasıyla 2, 8, 2 µg/mL; K2 için 1, 1, 2 µg/mL ve ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa* suşları için 1, 2, 0.5 µg/mL'dir.

3.2 *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde Çoğunluğu Algılama Yanıtları

*3.2.1. Gentamisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çoğunluğu Algılama (ÇA) Yanıtlarının Değerlendirilmesi*

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında ÇA sistemleri olan las ve rhl sisteminin çalıştığı gözlemlendi. K1 suşunda ise; las sistemi gentamisin etkisinde çalışmazken, rhl sisteminin %12,5 X MİK' ten itibaren çalıştığı görüldü. K2 suşunda ise her iki sisteminde çalışmadığı gözlemlendi (Tablo 1).

*3.2.2. Amikasin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi*

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşu, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında las sisteminin çalıştığı, rhl sisteminin %50 X MİK' ten itibaren çalıştığı görüldü. K1 ve K2 suşlarında, las ve rhl sistemleri amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında çalışmadığı görüldü (Tablo 1).

3.2.3. Netilmisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının ÇA Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Amikasin antibiyotiğinin de olduğu gibi ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında las sisteminin çalıştığı, rhl sistemi %50 X MİK' ten itibaren çalıştığı görüldü. K1 suşunda, las sistemi çalışmadığı, rhl sistemi netilmisinin tüm yoğunluklarında çalıştığı görüldü. K2 suşunda ise, las ve rhl sisteminin her ikisi de netilmisin etkisinde çalışmadığı görüldü (Tablo 1).

3.3. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Aminoglikozidler (Gentamisin, Netilmisin; Amikasin) Etkisinde Patojenite Yanıtları

3.3.1. Gentamisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkalen Proteaz Üretiminin Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında sıfır ve 24. saatte görülen alkalen proteaz üretimi üç, altı, dokuz ve 12. saatte görülmedi. K1 suşunda sıfır, üç, altı ve 24. saatte alkalen proteaz üretimi belirlenirken, 9. ve 12. saatte alkalen proteaz üretimi belirlenmedi. K2 suşunda ise; sıfır, üç, altı, dokuz ve 24. saatte alkalen proteaz üretimi görülürken, 12. saatte alkalen proteaz üretimi görülmedi (Tablo 2, 5, 8).

3.3.2. Amikasin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkalen Proteaz Üretiminin Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında sıfır, altı ve 24. saatte görülen alkalen proteaz üretimi üç, dokuz ve 12. saatte görülmedi. K1 suşunda sıfır, üç, dokuz ve 24. saatte alkalen proteaz üretimi belirlenirken, 6. ve 12. saatte alkalen proteaz üretimi belirlenmedi. K2 suşunda ise, tüm saatlerde (sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde) alkalen proteaz üretimi görüldü (Tablo 3, 6, 9).

3.3.3. Netilmisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkaleen Proteaz Üretimini Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında sıfır ve 24. saatte görülen alkaleen proteaz üretimi üç, altı, dokuz ve 12. saatte görülmedi. K1 ve K2 suşlarında ise; sıfır, üç, dokuz, 12 ve 24. saatte alkaleen proteaz üretimi belirlenirken, sadece altıncı saatte proteaz üretimi belirlenmedi (Tablo 4, 7, 10).

3.3.4. Gentamisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkaleen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında; gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında; sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde alkaleen proteaza bağlı jelatinaz üretiminin olduğu belirlendi (Tablo 2, 5, 8).

3.3.5. Amikasinin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkaleen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında üçüncü saatten itibaren alkaleen proteaza bağlı jelatinaz üretimi görüldü. K1 ve K2 suşlarında, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında; sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde alkaleen proteaza bağlı jelatinaz üretiminin olduğu görüldü (Tablo 3, 6, 9).

3.3.6. Netilmisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Alkaleen Proteaza Bağlı Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında; netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında; sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24. saatlerde alkaleen proteaza bağlı jelatinaz üretiminin olduğu belirlendi (Tablo 4, 7, 10).

3.3.7. Gentamisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında oksidaz yanıtları sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altı, dokuz ve 12. saatte %12,5 X MİK, 24. saatte ise MİK' ten itibaren belirlendi. K1 ve K2 suşlarında, sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK' ten itibaren görülen oksidaz yanıtı 12 ve 24. saatte görülmedi (Tablo 2, 5, 8).

3.3.8. Amikasin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK, 24. saatte ise MİK' ten itibaren belirlenen oksidaz yanıtı 12. saatte görülmedi. K1 ve K2 suşlarında, sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK' ten itibaren görülen oksidaz yanıtı 12 ve 24. saatte görülmedi (Tablo 3, 6, 9).

3.3.9. Netilmisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Oksidaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK' ten itibaren belirlenen oksidaz yanıtı 12 ve 24. saatte görülmedi. K1 suşunda, sıfırncı % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK' ten itibaren görülen oksidaz yanıtı 12 ve 24. saatte görülmedi. K2 suşunda, sıfırncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %25 X MİK, altıncı ve dokuzuncu saatte %12,5 X MİK' ten itibaren görülen oksidaz yanıtı 12 ve 24. saatte görülmedi (Tablo 4, 7, 10).

3.3.10. Gentamisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, sıfırıncı ve altıncı saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %12, 5 X MİK, dokuzuncu ve 12. saatte %25 X MİK' ten itibaren görülen katalaz yanıtı 24. saatte görülmedi. K1 suşundaki katalaz yanıtı, sıfır, altı, 12 ve 24. saatte % 6,2 X MİK, üç ve altıncı saatte %12,5 X MİK' ten itibaren görüldü. K2 suşunda, sıfır, altı, 12 ve 24. saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %12, 5 X MİK ve dokuzuncusaatte %25 X MİK' ten itibaren katalaz yanıtı belirlendi (Tablo 2, 5, 8).

3.3.11. Amikasin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, sıfırıncı saatte MİK, üçüncü saatte %12, 5 X MİK, altıncı ve 12. saatte %6, 2 X MİK, dokuzuncu saatte % 24 x MİK'ten itibaren görülen katalaz yanıtı 24. saatte görülmedi. K1 ve K2 suşlarındaki katalaz yanıtı ise, sıfır, altı, 12 ve 24. saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %12,5 X MİK ve dokuzuncu saatte %25X MİK' ten itibaren görüldü (Tablo 3, 6, 9).

3.3.12. Netilmisin Etkisinde *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Katalaz Yanıtlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa* suşunda, amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında, sıfır, altı ve 12. saatte %6,2 X MİK, üçüncü saatte %12, 5 X MİK ve dokuzuncu saatte % 25 X MİK' ten itibaren görülen katalaz yanıtı 24. saatte görülmedi. K1 ve K2 suşlarındaki katalaz yanıtı ise; sıfır, altı, 12 ve 24. saatte % 6,2 X MİK, üçüncü saatte %12,5 X MİK ve dokuzuncu saatte %25X MİK' ten itibaren görüldü (Tablo 4, 7, 10).

3.3.13. Gentamisin Etkisinde Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında; gentamisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında statik biyofilm oluşumunun 12. saatte, dinamik biyofilm oluşumunun da 24. saatte oluşmaya başladığı görüldü (Tablo 2, 5, 8) .

3.3.14. Amikasin Etkisinde Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında; amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında statik biyofilm oluşumunun 12. saatte, dinamik biyofilm oluşumunun da 24. saatte oluşmaya başladığı görüldü (Tablo 3, 6, 9).

3.3.15. Netilmisin Etkisinde Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Biyofilm Oluşumlarının Değerlendirilmesi

ATCC 27853 standart *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında; netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında statik biyofilm oluşumunun 12. saatte, dinamik biyofilm oluşumunun da 24. saatte oluşmaya başladığı görüldü (Tablo 4, 7, 10).

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aminoglikozidler (gentamisin, netilmisin; amikasin) etkisinde Çoğunluğu Algılama sistemlerinin yanıtları (GN: gentamisin, AK: amikasin, NET: netilmisin, ÇA: Çoğunluğu algılama sistemi K1 ve K2: klinikten izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşları, ATCC: standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*)

ANTİBİYOTİK	SUŞLAR	ÇA		% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
GN	ATCC	<i>Las</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Rhl</i>	+	+	+	+	+	+
	K1	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	-	-	-	+	+	+
	K2	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	-	-	-	-	-	+
AK	ATCC	<i>Las</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Rhl</i>	-	+	+	+	+	+
	K1	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	-	-	-	-	-	+
	K2	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	-	-	-	-	-	+
NET	ATCC	<i>Las</i>	+	+	+	+	+	+
		<i>Rhl</i>	-	+	+	+	+	+
	K1	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	+	+	+	+	+	+
	K2	<i>Las</i>	-	-	-	-	-	+
		<i>Rhl</i>	-	-	-	-	-	+

Tablo 2. Gentamisin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MiK yoğunluklarında *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (gentamisin)	MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+
	Oksidaz	+	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+

Tablo 3. Amikasin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (amikasin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	-	-	-	-	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	+	+	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	-	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 4. Netilmisin antibiyotiğinin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (netilmisin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	-	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 5. Gentamisin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında K1 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K1 (gentamisin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 6. Amikasin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında K1 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K1 (amikasin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	-	-	-	-	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 7. Netilmisin antibiyotiğinin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında klinik 1 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K1 (netilmisin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	-
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 8. Gentamisin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında K2 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K2 (gentamisin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 9. Amikasin antibiyotiginin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında K2 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K2 (amikasin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

Tablo 10. Netilmisin antibiyotiğinin belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında K2 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun patojenite yanıtları (D: dinamik biyofilm oluşumu, S: statik biyofilm oluşumu)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K2 (netilmisin)		MİK	% 50 X MİK	% 25 X MİK	%12,5 X MİK	% 6,2 X MİK	KONTROL
0. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
3. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	+	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
6. saat	Proteaz	-	-	-	-	-	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
9. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	+	+	+
	Katalaz	-	-	+	+	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	-	-	-	-	-	-
12. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	-	-	-	-	-	-
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+
24. saat	Proteaz	+	+	+	+	+	+
	Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	+
	Katalaz	-	-	-	-	+	+
	Biyofilm(D)	+	+	+	+	+	+
	Biyofilm(S)	+	+	+	+	+	+

4. TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa kemoterapi sağaltımı gören kanser hastaları, kistik fibrosisli hastalar gibi immun sistemi baskılanmış hastalarda; hücre-içi ve hücre dışı enzim ve toksin salgıları ile enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojen Gram olumsuz bir bakteridir (64, 65). Çalışmamızda kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının gentamisin, amikasin ve netilmisinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve sub-MİK yoğunluklarında; çoğunluğu algılama (A) sistemlerinin kontrol ettiği biyofilm oluşumu, alkalen proteaz, alkalen proteaza bağlı jelatinaz, oksidaz ve katalaz üzerine etkilerinin her suş ve antibiyotik için farklı olduğu görüldü.

P. aeruginosa’ da biyofilm oluşumlarının hücreden hücreye sinyal iletim sistemi olan A sistemleri ile kontrol edildiği belirlenmiştir (19- 22). Hücre yoğunluğuuna bağlı olarak etkinleşen A sistemleri; ışıma, plazmid taşınımı ve farklı virülans etmenlerinin üretimi gibi bakterinin farklı metabolik etkinliklerini kontrol etmektedir. A sistemleri, kendi kendini uyarıcı sentezinden sorumlu gen bölgesi (LasI ve Rhl I) ve transkripsiyonal düzenleyici (Las R ve Rhl R) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır (66, 67). Fırsatçı patojen *P. aeruginosa*’ da LasI / R; RhlI / R ve *Pseudomonas* kinolon sinyalleme (PQS: *Pseudomonas* Quinolone Signalling) olmak üzere üç A sistemi vardır. Bunlardan ikisi; LasI/ R sistemi; “N-(3-oxododecanoly)-L-AHL” (3OC₁₂- HSL) sinyal molekülü ile rhlI/R sistemi ise ”N-butryl-L-AHL” (C₄- HSL) sinyal molekülü ile çalışmaktadır (25, 68). Bakteri sayısına bağlı olarak üretilen bu sinyal molekülleri yeterli yoğunluğua ulaştığında bazı genlerin uyarımı gerçekleşmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarına gentamisin, amikasin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında A yanıtlarının farklı olduğu belirlendi. Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunun, birincil A sistemi olan las sisteminin; gentamisin, netilmisin ve amikasinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında çalıştığı; rhl sisteminin ise netilmisin ve amikasin etkisinde %50XMİK’ ten itibaren çalışırken, gentamisin etkisinde de MİK’ ten itibaren çalıştığı saptandı. K1 suşunda, las sisteminin gentamisin, amikasin ve netilmisin etkisinde çalışmadığı; rhl sisteminin de gentamisinin %12,5 X MİK yoğunluğuundan, netilmisin etkisinde de MİK’ ten itibaren çalıştığı belirlendi. K2 suşunda ise; gentamisin, amikasin ve netilmisin etkisinde iki A sisteminin de çalışmadığı gösterildi. Bu sonuçlar; *P. aeruginosa*’ nın kullandığı las ve rhl olmak üzere iki A sisteminin

çalışmasının gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında baskılanabildiği veya uyarılabildiğini göstermektedir.

P. aeruginosa ile enfekte kistik fibrosisli hastalardan alınan balgam, bronko alveolar lavaj örneklerinde ÇA sinyal moleküllerinin üretildiğinin gösterilmesi, enfeksiyonun gelişiminde ÇA sistemlerinin etkin olduğu görüşünü desteklemektedir (69- 71). Pearson ve arkadaşları, standart *P. aeruginosa* suşu ile lasI, rhlI ve lasI/rhlI mutant suşlarla yaptıkları çalışmada; mutant suşlarda virülans özelliklerinin önemli miktarda azaldığını göstermişlerdir (72).

Bakteriyal tutunma ve konağa kolonizasyon, oldukça karmaşık bir olgudur. *P. aeruginosa* biyofilm oluşurken gösterdiği davranışlar nedeni ile ÇA sistemlerinin işlenmesinin ve kontrolünün çözümlenmesinde, yöntem geliştirilmesi için kullanılan model mikroorganizmadır (73, 74).

Kistik fibrosisli hastaların akciğer alveollerinde ve farklı konak dokularında oluşan *P. aeruginosa* enfeksiyonları için biyofilm oluşumları oldukça önemlidir. Biyofilm oluşum sürecinde bakteri üremesi devam eder ve farklı antibiyotiklere karşı ve /veya konak immun yanıtında bakteriyi koruyan bakteriyel ekzopolisakkarit olan glikokaliks tabakasını üretirler (75, 76).

P. aeruginosa'nın meydana getirdiği biyofilm oluşumlarının evreleri aşağıdaki gibidir;

1. Geri- dönüşümlü tutunma: yüzeye tutunma gerçekleşir,
2. Geri- dönüşümsüz tutunma: hücre kümeleri gelişir, Las B aktive edilir ve hücreler hareketsizdir,
3. Olgunlaşma-1: rhl A aktivasyonu olur, hücre kümeleri yüzeye yayılır, bu hücre kümelerinin kalınlığı $\geq 10 \mu\text{m}$ ' dir,
4. Olgunlaşma-2: en yüksek seviyede oluşan hücre kümelerinin kalınlığı $100 \mu\text{m}$ civarındadır. Aynı zamanda yüzeyden hücreler ayrılmaya başlar,
5. Dağılma: hücre kümelerinde kanal ve porlar oluşur, ayrılmanın başladığı (77).

Geri- dönüşümsüz tutunma evresinde; bakteri kümelerinin gelişmesi ve bakterilerin tutunmasının 24. saatinde, las regulonu etkinleşmektedir. Las B' nin etkin hale gelişiminin, biyofilm hücrelerinin gelişimi ile eş zamanlı başladığı gösterilmiştir. Dış membran proteinleri, lipopolisakkarit (LPS), alginat, flagel ve tip IV pili tutunmada önemli olan adhezinlerdir. Bu geri-dönüşümsüz tutunma evresinde, bakteri hareketinin sona erdiği ve flagel kaybının olduğu bilinmektedir (78).

Olgunlaşma- 1 evresinde ise; ikinci ÇA sistemi düzenleyicisi olan rhl A aktive olmaktadır. Hücre dışı matriks olan glikokaliks üretimi ile mikroçevrede oksijen seviyelerinin düşmesine bağlı olarak anaerobik solunum ile ilgili proteinlerin yapımı artar. Bu protein yapımının artması ile de biyofilm mimarisi şekillenir. Biyofilm yapısının en kalın olduğu olgunlaşma-2 evresinde; planktonik bakterilerden %50 oranında farklı proteinlerin yapımı gerçekleşmektedir. Oksijen yoğunluğunun daha fazla miktarlarda azalmasına bağlı olarak popülasyonun büyük bir çoğunluğu anaerobik forma dönüşmektedir (77).

Hareketin önemli olduğu dağılıma evresinde ise; bakteri kümelerinden ayrılan bakterilerin hareketli olduğu, bakteri kümelerinin duvarında kalan bakterilerin hareketsiz oldukları gösterilmiştir (79). Ortam koşulları düzeldiğinde hareket özelliği kazanan bakteriler biyofilmden ayrılmaya başlamaktadır. Biyofilm oluşumunda; aerobik ve anaerobik solunumda önemli olan proteinlerin yapımı değişmektedir. Protein yapısı ve hareket özelliği değişen biyofilm yapısındaki bakteriler bu evrede tekrar planktonik fenotipe dönmektedir (77).

P. aeruginosa biyofilmleri; enfeksiyon tipine ve tutunduğu dokuya göre farklı mimaride olmaktadır. Schaber ve arkadaşları klinikten izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının polikarbonat membranda biyofilm oluşumunu sağlayarak, planktonik form ile biyofilm formunun; *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan imipenem (karbopenem β -laktam), gentamisin (aminoglikozid) ve piperasilin-tazobaktam (β -laktamaz inhibitörü) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarını araştırmışlar ve biyofilm formunun planktonik forma göre yaklaşık 10 kat daha dirençli hale geldiğini göstermişlerdir (80). Çalışmalarımızda gentamisin, amikasin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında statik biyofilm oluşumunun 12. saatte, dinamik biyofilm oluşumunun da 24. saatte başladığı saptandı. Statik biyofilmin daha erken oluşması, biyofilmin ilk evresi olan bakteri tutunması için daha elverişli ortamın olan “statik ortam” olduğunu göstermektedir.

Biyofilmler bakterilerin hızlı ve yavaş veya değişen mikroçevre koşullarına göre üremelerini durdurmaları ile oluşmaktadır (81). Enfeksiyon bölgesinde bakteri hücreleri farklı fizyolojik mikroçevrelerde bulunabilirler. Biyofilm oluşumunda; yüzeye tutunma, yüzeyde çoğalma ve bakterinin bulunduğu üreme fazı önemlidir (82, 83). Farklı fizyolojik mikroçevrelerde, üremenin yavaşlaması bakterileri antibiyotiklerden korunmasını sağlamaktadır ve bu da biyofilm oluşumu ile meydana gelen direncin bakteri üremesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (84).

Korneal enfeksiyonlarda; konak dokunun yıkımı bakteri toksini ve / veya proteazları ile gerçekleşmektedir. Besin azlığında bakteri etkin proteaz enzimlerini salgılayarak kronik enfeksiyon süresince insan dokusunda canlı kalabilmektedir. Elastaz A (Las A), elastaz (Las B), alkalen proteaz ve proteaz IV *P. aeruginosa* 'nın ürettiği ve hücre dışı proteaz enzimleridir. Elastaz ve alkalen proteazın korneal epitellere penetrasyonda etkin olduğu gösterilmiştir. Korneal enfeksiyon bölgesinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının “açıl homoserin lakton” (AHL) ürettikleri, enfektif olmayan kontak lens ve / veya korneadan izole edilen suşların ise; ÇA sistemlerinde etkin olan Las I, Las R veya Rhl I genlerinden mutant olduğu belirlenmiştir (59, 85). Standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunda gentamisin ve netilmisinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında sıfır ve 24. saatte belirlenen alkalen proteaz üretimi; üç, altı, dokuz ve 12. saatte belirlenmedi. Amikasin antibiyotiğinin etkisinde aynı suşa; sıfır, altı ve 24. saatte alkalen proteaz üretimi görülürken; üç, dokuz ve 12. saatte görülmedi. K1 suşunda gentamisin etkisinde sıfır, üç, altı ve 24. saatte; amikasin etkisinde sıfır, üç, dokuz ve 24. saatte; netilmisin etkisinde de tüm saatlerde alkalen proteaz üretimi saptanırken; gentamisin etkisinde dokuz ve 12. saatte, amikasin etkisinde altı ve 12. saatte, netilmisin etkisinde de altıncı saatte alkalen proteaz üretiminin olmadığı görülmedi. K2 suşunda da gentamisin etkisinde üç, altı, dokuz ve 24. saatte, amikasin etkisinde tüm saatlerde, netilmisin etkisinde de sıfır, üç, dokuz, 12 ve 24 saatte alkalen proteaz üretimi belirlenirken, gentamisin etkisinde 12. saatte, netilmisin etkisinde de altıncı saatte alkalen proteaz üretiminin olmadığı görüldü. Oldak ve arkadaşları *P. aeruginosa* biyofilmlerinin; biyofilm yapılarının tamamına etki ettiği gösterilen siprofloksasin ile muamelesinden sonra proteaz enzimlerinin üretiminde azalma olmadığını ve siprofloksasinin bakteri üremesinin logaritmik fazında ve metabolik aktivitenin azaldığı durağan fazda aynı etkiyi gösterdiğini belirlemişlerdir (86). Antibiyotik etkisinde olmayan suşlar; üreme fazından daha yüksek oranlarda durağan fazda tutunma göstermektedir. Alkalen proteaza bağlı jelatinaz üretiminde; standart ATCC 27853 *P. aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarında gentamisin ve netilmisin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında tüm saatlerde (sıfır, üç, altı, dokuz, 12 ve 24.) alkalen proteaza bağlı jelatinaz üretimi saptandı. Amikasin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında ise; K1 ve K2 suşlarında tüm saatlerde, standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşunda üçüncü saatten itibaren alkalen proteaza bağlı jelatinaz üretimi görüldü.

P. aeruginosa biyofilmlerinde; oksidlenen biyosidlerden olan hidrojen peroksidi karşı biyofilm yapısının korunması için, hidrojen peroksidi su ve oksijene ayıran katalaz enziminin

sunumu önemlidir. Hidrojen peroksidi etkisizleştirerek direnç geliştiren biyofilm yapılarındaki katalaz; durağan fazda aerobik üremede hidrojen peroksid ile karşılaşılınca üretilen bir enzimdir. Biyofilm oluşturan bakterilerin hidrojen peroksid ile karşılaşma sonucunda üremelerini devam ettirdiği ve biyofilm yapılarındaki bakterilerin planktonik bakterilere oranla daha dirençli olduğunu gösterilmiştir (87, 88).

Antibiyotiklerin bakterilerde kopyaların yapımını arttıran veya azaltan subminimal inhibitör yoğunluklarında, çevresel etkilerin görülmesi bunun bir kanıtıdır (67). Virülansın kontrolünde etkin olan düzenleyici genler, antibiyotiklerin temel hedefidir (89). Antibiyotikler sub ve supra- MİK yoğunluklarında, bakterinin virülans salgılarını azaltabilir veya baskılayabilir. Antibiyotiklerin bakterisidal yoğunluğu, biyofilmlerdeki bakterilerin virülans etmenlerini salgılamasını etkiler. Antibiyotiklerin sub-MİK yoğunlukları, adhezinleri ve yüzey proteinlerinin sayılarını değiştirerek bakterinin tutunmasını etkilemektedir. Antibiyotik sağaltımında azalan yoğunluklar olan sub-MİK yoğunlukları bakterinin morfolojisinde, virülansında, hareketinde ve tutunmasında değişikliğe neden olduğu bilinmektedir (67). Fonseca ve arkadaşları, durağan fazdaki *P. aeruginosa*'nın tutunmasının piperasilin/tazobaktam antibiyotiğinin sub-MİK yoğunluklarında azalmasını nedenlerini; hem durağan hem de büyüme fazının başında hidrofobiklik değişimi, bakteri şeklinin değişimi, her iki büyüme fazında da bakteri hareketindeki değişiklik olarak açıklamışlardır (10). Topikal ve / veya sistemik antibiyotikler ile enfeksiyonların sağaltımında biyofilm oluşumundan kaynaklanan problemler çıkmaktadır (90).

Biyofilm yapılarında, fiziksel olarak antibiyotik penetrasyonunun baskılanması direncinin artmasına neden olmaktadır (46). Hoffman ve arkadaşları aminoglikozid gurubu antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının "aminoglycosidase response regulatory" (Arr) genini aktive ederek *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumlarını arttırdıklarını göstermişlerdir (47). Arr; biyofilm oluşumu, virülans etmenlerinin sunumu ve antibiyotik direnci için gerekli proteinlerin sentezlenmesinde ikincil mesajcı olan disiklik GMP (di- c GMP)'nin sentezlenmesinde önemli olan gen bölgesidir (48). Çalışmamızda gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin MİK ve sub-MİK yoğunluklarında 12. saatte gösterilen statik biyofilm oluşumunun ve 24. saatte gösterilen dinamik biyofilm oluşumunun MİK' ten itibaren tüm sub-MİK yoğunluklarında görülmesi; aminoglikozidlerin kullanılan üç *P. aeruginosa* suşları üzerinde biyofilm oluşumunu artırıcı etkisi olduğunu göstermiştir.

Biyofilm oluşumları difüzyonu sınırlandırmakta ve fizyolojik etkinliği azaltıp, uyumu arttırarak antibiyotiklere karşı dirence neden olmaktadır (91- 94). Biyofilmlerin oluşumunda zamanlama oldukça önemlidir. Dinamik biyofilmlerin gelişmesi bir gün içinde gerçekleşmekle birlikte, oluşan bu biyofilm yapısı oturmamıştır ve yıkama ile kolaylıkla bozulduğu gösterilmiştir (75). Buna karşın biyofilm gösterim yöntemindeki yıkama basamağı sonunda, çalışmada kullanılan  *P. aeruginosa* suşunda, statik ve dinamik oluşumunun bozulmadığı saptanması; gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin, MİK ve sub-MİK yoğunluklarının dinamik ve statik biyofilm oluşumlarını uzaklaştıramadığını ve biyofilmin oturmasını arttırıcı etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hazırlanan deneysel model, antibiyotik uygulamalarının başarısını sorgulamak amacıyla geliştirilebilir. Tıpkı bir klinik viroloji laboratuvarında doğrudan tanı konulur gibi, bir bakteriyoloji laboratuvarında *in vitro* koşullarda bazı ölçütler değerlendirilerek, izole edilen bakterinin seçilen antibiyotiğe yanıtlarını değerlendirerek, sağaltımın başarısı – başarısızlığı, sağaltımın dönemlerinin yönlendirilmesi – değiştirilmesi - geliştirilmesi ile ilgili yorum yapılabilir. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında; virulans etmenlerinin sunumu, direnç gelişimi, konağın davranışlarına kadar geniş bir alanı ilgilendiren ÇA sistemlerinin açıklanması ile yeni sağaltım yöntemleri geliştirilebilir.

Bu çalışmada kinetik çalışmalarda oksidaz, katalaz ve alkalin proteaz etkinliklerinin “zamana bağlı olarak” değiştiğini belirledik. Bu değişikliğin nedeni biyofilm içindeki bakterilerin değişen mikroçevrelere uyum amacıyla genetik sunumlarının farklılaşmasına bağlı olabilir. Ayrıca biyofilm içindeki bakterilerin yoğunluğuna bağlı olarak salınan AHL moleküllerinin uyardığı gen bölgesi de değişmiş olabilir. Yine biyofilm mimarisinin, önemli bir mikroçevre ortamı olarak (karbon – oksijen miktarları üzerinden), bakterinin metabolik etkinlikleri üzerindeki etkileri de genetik değişikliklere neden olabilir.

Bu aşamadan sonra, bu deney sistemini geliştirmek için önerilerimiz aşağıdaki gibi olabilir:

1. Biyofilm çalışmaları konfokal mikroskopik incelemeler ile mimarinin belirlenmesine yönelik yapılabilir,
2. Kinetik değerlendirmelerde mikroçevre değişiklikleri yapılarak, değişen mikroçevreye göre bakteri davranışı analizi yapılabilir,
3. ÇA olumlu ve ÇA olumsuz bakterilerin aminoglikozidler dışındaki diğer antibiyotik gruplarına yanıtları değerlendirilebilir.

Söz konusu etkileşimlerin *in vivo* ortamlardaki özelliklerine yaklaşım açısından hücre dizileri ile ilgili bir TÜBİTAK projesi alınmış ve hücre kültürü çalışmaları başlatılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J Clin Invest. 2003 Nov;112(10):1460–5
2. Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 30;103(22):8305–6.
3. Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? Expert Opin Ther Targets. 2002 Jun;6(3):257–74.
4. Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993; 34(9):2699–712
5. Delden CV and Iglewski B. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Emerging Infectious Diseases. 1998; Vol:4: 551- 60
6. Costerton JW. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents. 1999 May;11(3-4):217-21.
7. Favre-Bonté S, Chamot E, Köhler T, Romand JA ve ark. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. BMC Microbiol. 2007 Apr 18;7: 33.
8. Hu FZ, Ehrlich GD. Population-level virulence factors amongst pathogenic bacteria: relation to infection outcome. Future Microbiol. 2008 Feb;3(1):31 – 42
9. <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Normalflora.html> (Erişim Tarihi: 27.Kasım. 2007)
10. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. J Appl Microbiol. 2007 Nov;103(5):1828–37.
11. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends Microbiol. 2005 Jan;13(1):7- 10.
12. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes Infect. 2003 Nov;5(13):1213- 9.
13. Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 2002;(31):163S-170S

14. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*. 2007 Feb;19(1):83–8
15. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. 2003 Mar;185(5):1485-91.
16. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*. 2002;95 Suppl 41: 22- 6
17. Hostacká A, Ciznár I, Slobodníková L, Kotulová D. Clinical *Pseudomonas aeruginosa*: potential factors of pathogenicity and resistance to antimicrobials. *Folia Microbiol (Praha)*. 2006;51(6):633- 8.
18. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):2125- 33.
19. Pappas KM, Weingart CL, Winans SC. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol*. 2004 Aug;53(3):755- 69.
20. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101.
21. Joint I, Allan Downie J, Williams P. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. An introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jul 29;362(1483):1115- 7.
22. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jul 29;362(1483):1119- 34.
23. Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell- to- cell signalling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005; 73: 3197.
24. Fugua C, Parsek RM, Greenberg PE. Regulation of gene expression by cell- to-cell communication: acyl – homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 439.
25. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW ve ark. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol* 2002;4(1):18 - 28.
26. Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Jan;387(2):409–14

27. Yarwood JM, Schlievert PM. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. J Clin Invest. 2003 Dec;112(11):1620–5.
28. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N ve ark. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. Chem Biol. 2007 Oct;14(10):1119- 27.
29. Baskın H: Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: “Quorum sensing” (Çoğunluğu algılama), Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006;36(2):111- 5.
30. Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S ve ark. Autoinducer- 2 regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation. J Bacteriol. 2007 Nov 2.
31. Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect. 2000 (14):1721–31.
32. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. Curr Opin Pediatr. 2007 Feb;19(1):83–8.
33. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK ve ark. Mucin- *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. Mol Microbiol. 2006 Jan;59(1):142–51.
34. Davies DG, Parsek MR; Pearson JP, Iglewski BH ve ark. The involvement of the cell-to cell signals in the development of a biofilm, Science 1998;280 (5361):295- 298.
35. Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 2;104(40):15876- 81.
36. Köhler T, Dumas JL, Van Delden C. Ribosome Protection Prevents Azithromycin-Mediated Quorum-Sensing Modulation and Stationary-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Dec;51(12):4243- 8.
37. Fulghesu L, Giallorenzo C, Savoia D. Evaluation of different compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa* J Chemother. 2007 Aug;19(4):388- 91.
38. Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR ve ark. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. Mol Microbiol. 1999 Dec;34(5):1082– 93.
39. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC ve ark. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3605– 13.

40. Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE ve ark. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1997 Jun;179(12):3928- 35.
41. Fox A, Haas D, Reimmann C, Heeb S ve ark. Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the vfr global regulatory gene. Appl Environ Microbiol. 2008;74(6):1902- 8.
42. Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. Can J Microbiol. 1998 Aug;44(8):707– 17.
43. Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, Ream W ve ark. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf- 5. J Bacteriol. 1998 Dec;180(24):6635- 41.
44. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P ve ark. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Mol Microbiol. 1996 Sep;21(6):1137– 46.
45. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. Curr Opin Microbiol. 2006 Oct;9(5):445–53.
46. Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE ve ark. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Sep;49(9):3858– 67.
47. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z ve ark Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature. 2005 Aug 25;436(7054):1171– 5.
48. Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N ve ark. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2839 -44.
49. George M, Pierce G, Gabriel M, Morris C ve ark. Effects of quorum sensing molecules of *Pseudomonas aeruginosa* on organism growth, elastase B production, and primary adhesion to hydrogel contact lenses. Eye Contact Lens. 2005 Mar;31(2):54- 61.
50. Caballero A, Thibodeaux B, Marquart M, Traidej M ve ark. *Pseudomonas keratitis*: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Feb;45(2):522- 30.
51. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.Güneş Kitapevi. İstanbul, 1999 S: 49.
52. Anğ Ö. Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevi. İstanbul; 2006 S: 26- 27.

53. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Onbirinci baskı. Ankara, Hacettepe-Taş yayınevi; 2005 sf: 216- 22.
54. CLSI. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları; Onaylanmış standart-Onaltıncı baskı.M100-S16. Ocak -2006; 26(3).
55. Baskın H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Int. J.Antimicrob Agents, 2002; 19: 79 -82.
56. Kanamaro S, Kurazono H, Terai A, Monden K ve ark. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. Int J Antimicrob Agents; 2006.
57. 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 Sep;30(3):236–41
58. Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G ve ark. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aro A live vaccine. Veter Microb, 2004; 101: 167–176.
59. Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. Çoğunluğu Algılama Yanıtlarının Görüntülenmesinde İki Yöntemin Karşılaştırılması. (Baskıda: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2008. 38(2)).
60. Zhu H, Thurutyil SJ, Willcox MDP. Production of N-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. Clic Exoper. Ophthal, 2001;29: 150–152.
61. Sechi LA Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S ve ark. PER–1 type beta lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit.2004; 10 (6): CR180–4.
62. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Üçüncü baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2002 Sf: 673- 4.
63. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Üçüncü baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2002 Sf: 688- 9.
64. Grossi P, Dalla Gasperina D. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in critically ill patients. Expert Rev Anti Infect Ther. 2006 Aug;4(4):639- 62.
65. Nick JA, Rodman DM. Manifestations of cystic fibrosis diagnosed in adulthood. Curr Opin Pulm Med. 2005 Nov;11(6):513- 8.

66. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. FEMS Microbiol Rev. 2006 Mar;30(2):274- 91.
67. Yim G, Wang HH, Davies J. Antibiotics as signalling molecules. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007;362(1483):1195–200.
68. Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? Cell Microbiol. 2006 Dec;8(12):1841- 9.
69. Collier DN, Spence C, Cox MJ, Phibbs PV. Isolation and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pseudorevertants containing suppressors of the catabolite repression control-defective *crc-10* allele. FEMS Microbiol Lett. 2001 Mar 15;196(2):87- 92.
70. Middleton B, Rodgers HC, Cámara M, Knox AJ ve ark. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. FEMS Microbiol Lett. 2002 Jan 22;207(1):1–7.
71. Guina T, Purvine SO, Yi EC, Eng J ve ark. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2771–6.
72. 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 Jul;68(7):4331- 4.
73. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms Antimicrob Agents Chemother. 1996 Nov;40(11):2517-22.
74. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21: 319- 46.
75. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002 Apr;15(2):167- 93.
76. Matsukawa M, Greenberg EP. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J Bacteriol. 2004 Jul;186(14):4449- 56.
77. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002 Feb;184(4):1140–54.
78. Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Microbes Infect. 2000 Apr;2(4):391- 400.

79. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO ve ark. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):762- 4.
80. Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC ve ark. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(Pt 6):738- 48.
81. Sufya N, Allison DG, Gilbert P. Clonal variation in maximum specific growth rate and susceptibility towards antimicrobials. *J Appl Microbiol*. 2003;95(6):1261- 7.
82. Roberts ME. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology*. 2005 Jan;151(Pt 1):75- 80.
83. Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jun;69(6):3327- 32.
84. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001 Dec;183(23):6746- 51.
85. Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thuruthyl SJ ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1897–903.
86. Öldak E, Trafny EA. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3281- 8.
87. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR ve ark. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711- 45.
88. Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG ve ark. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Feb;66(2):836- 8.
89. Qazi S, Middleton B, Muharram SH, Cockayne A ve ark. N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2006 Feb;74(2):910- 9.
90. Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*. 2005 May;60(1):1- 7.

91. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):2125-33.
92. Pires JR, Rossa Junior C, Pizzolitto AC. In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. *Braz Oral Res*. 2007;21(4):342-347.
93. Teixeira PC, Leite GM, Domingues RJ, Silva J ve ark. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *Int J Food Microbiol*. 2007 Aug 15;118(1):15-9.
94. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B ve ark. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):231-8.

8. EKLER