

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* SUŞLARINDA BİYOFİLM VE TİP 3
SEKRESYON SİSTEMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HAZEL MALAŞ İREN**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ERGUN METE**

DENİZLİ-2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* SUŞLARINDA BİYOFİLM VE TİP-3
SEKRESYON SİSTEMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. HAZEL MALAŞ İREN**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ERGUN METE**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 19.02.2020 tarih
ve 2020TPF006 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2022

TEŐEKKÖR

Çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde çalıőmayı yönlendiren, destekleyen danışman hocam sayın Doç Dr. Ergun METE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım Prof.Dr. İlknur KALELİ'ye, Prof. Dr. Çağrı ERGİN, Prof. Dr. Melek DEMİR,. Doç. Dr. Ahmet ÇALIŐKAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ŐENGÖL ve Dr. Öğr. Üyesi. Sedef Zeliha ÖNER'e tezimin istatistik çalıőmalarında bana destek olan sevgili Hande ŐENOL'a asistanlık eğitimim süresince beraber eğitim aldığım asistan arkadaşlarıma ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren annen ve babam Nilgün ve Hakan MALAŞ'a, en büyük desteğim eşim Hurőt İREN'e ve tez dönemimde en büyük mutluluğum canım kızım İnci İREN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET	XIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	3
Kültür ve Üreme Özellikleri	4
Biyokimyasal Özellikleri	4
Virülans Faktörleri	4
Bakteriyel Hücre Yüzeyi İlişkili Virülans Faktörleri	5
Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri	6
BİYOFİLM	8
Tarihçe	8
Biyofilm Yapısı	8
Biyofilm Oluşumunda Etkili Faktörler	9
Biyofilm Oluşum Evreleri	11
Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Sebepleri	12
Biyofilm Oluşumunun Klinik Önemi	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Patogenezinde Biyofilm İlişkili Genlerin Rolü	14

<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> 'da Biyofilm Matriksinin Düzenlenmesi.....	16
TİP 3 SEKRESYON SİSTEMİ.....	17
Tanımı	17
Tip 3 Sekresyon Sistemi Bölümleri.....	18
Tip 3 Sekresyon Sisteminin Düzenlemesi	22
Tip 3 Sekresyon Sisteminin <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> Patogenezindeki Rolü ve Klinik Önemi.....	23
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> 'da Biyofilm Yapımı ve Tip 3 Sekresyon Sistemi	23
GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
BULGULAR	32
TARTIŞMA	57
SONUÇLAR	76
KAYNAKLAR	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

BHI	:Brain heart infusion
cAMP	:Siklik Adenozin Monofosfat
c-di-GMP	:Bis-(3'-5')-siklik-dimerik-guanozin monofosfat
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
dNTP	:Deoksinükleotid Trifosfat
eDNA	:Ekstrasellüler DNA
EkzoA	:Ekzotoksin- A
EkzoS	:Ekzoenzim-S
EkzoT	:Ekzoenzim-T
EkzoU	:Ekzoenzim-U
EkzoY	:Ekzoenzim-Y
HIV:	:Human Immunodeficiency viruses/İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFN-gama	:İnterferon-gama
KKA	:Kongo kırmızısı agar
LB	:Luria-Bertani
LPS	:Lipopolisakkarit
MİK	:Minimim İnhibitör Konsatrasyon
OD	:Optik Dansite
PZR	:Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
sRNA	:small RNA
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	:Tris buffer EDTA

T3SS : Tip 3 Sekresyon Sistemi
TNF-alfa : Tumor nekroz faktör-alfa
Toll benzeri reseptörler : TLR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tip 3 sekresyon sistemi	21
Şekil-2. Biyofilm oluşumunun kongo kırmızısı agar yöntemi ile yorumlanması	33
Şekil-3. Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilmesi	35
Şekil-4. <i>pslA</i> geni jel görüntüsü	40
Şekil-5. <i>pelA</i> geni jel görüntüsü	41
Şekil-6. <i>ppyR</i> geni jel görüntüsü	42
Şekil-7. <i>exoS</i> geni jel görüntüsü.....	45
Şekil-8. <i>exoY</i> geni jel görüntüsü	46
Şekil-9. <i>exoT</i> geni jel görüntüsü	47
Şekil-10. <i>exoU</i> geni jel görüntüsü	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo-1. Biyofilm veya T3SS genleri ampikonları için kullanılan primerler ve gen büyüklükleri	29
Tablo-2. PZR karışımı	30
Tablo-3. PZR termal döngü.....	30
Tablo-4. Örneklerin kliniklere göre dağılımı	32
Tablo-5. Kongo kırmızısı agar besiyerinde yoğun bakım ve yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden biyofilm pozitif ve negatif örneklerin sayı ve yüzdeleri.	34
Tablo-6. Biyofilm oluşturma şiddetine göre suşların izole edildiği kliniklerin dağılımı	36
Tablo-7. Biyofilm oluşturan suşların belirlenmesinde Kongo kırmızısı agar yöntemi ile mikrotitrasyon plağı yönteminin karşılaştırılması.	37
Tablo-8. Örneklerin gönderildiği yere göre suşların antibiyotik direnç oranları.....	38
Tablo-9. Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan suşların antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması.....	39
Tablo-10. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=100) suşlarında <i>pslA</i> , <i>pelA</i> ve <i>ppyR</i> genlerinin kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı.	43
Tablo-11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=100) suşlarında <i>pslA</i> , <i>pelA</i> ve <i>ppyR</i> genlerinin mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı.	44
Tablo-12. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=100) suşlarında <i>exoS</i> , <i>exoY</i> , <i>exoT</i> ve <i>exoU</i> genlerinin kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı.	49
Tablo-13. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=100) suşlarında <i>exoS</i> , <i>exoY</i> , <i>exoT</i> ve <i>exoU</i> genlerinin mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı.	50
Tablo-14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=100) suşlarında <i>exoS</i> , <i>exoY</i> , <i>exoT</i> ve <i>exoU</i> genlerinin <i>pslA</i> , <i>pelA</i> ve <i>ppyR</i> genleriyle karşılaştırılması.	52
Tablo-15. Antibiyotik direnci ile biyofilm genleri karşılaştırılması	54
Tablo-16. Antibiyotik direnci ile T3SS genleri karşılaştırılması	56

ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Biyofilm ve Tip 3 Sekresyon Sistemi Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Dr. Hazel MALAŞ İREN

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültürlerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşumu, Tip 3 sekresyon sistemi (T3SS), ilişkili genler ve antibiyotik dirençleri araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan 100 suşun 50 tanesi yoğun bakım ünitelerinden (%50), 50 tanesi (%50) yoğun bakım dışından gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilmiştir. Kongo kırmızısı agar besiyerinde 100 *P. aeruginosa* suşunun 25 tanesinde (%25) biyofilm oluşumu pozitif bulunup, bunların 18 tanesi (%36) yoğun bakım ünitelerinden gönderilirken, 7 (%14) tanesi yoğun bakım dışından gönderilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerde yoğun bakım dışından gönderilen örneklere göre biyofilm oluşumu istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur ($p<0.05$). Mikrotitrasyon plağı yöntemi ile yapılan biyofilm çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının 69 tanesinde (%69) biyofilm oluşumu pozitif tespit edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen suşların 34 tanesinde (%68) biyofilm oluşumu pozitif saptanmıştır. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden elde edilen suşların 35 tanesinde (%70) biyofilm oluşumu pozitif saptanmıştır. Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm ile mikrotitrasyon plak yöntemi arasındaki uyum karşılaştırıldığında yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ($p<0.05$).

Çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının en yüksek antibiyotik direnci %20 oranında seftazidime ve %19 oranında imipeneme karşı görülmüştür. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda siprofloksasin haricinde antibiyotik direnç oranının yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Biyofilm oluşturan grubun; sefepim, seftazidim, imipenem, piperasilin-tazobaktam antibiyotikleri direnç oranlarının biyofilm oluşturmaya göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Pseudomonas aeruginosa'da biyofilm oluşumu ilişkili genlerin varlığı (*pslA*, *pelA*, *ppyR*) ve *P.aeruginosa*'nın Tip 3 sekresyon sisteminde görev alan (*exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU*) genlerin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada 100 suşun tamamında (%100) *pslA* geni, 99'unda (%99) *pelA* geni, 99'unda (%99) *ppyR* geni pozitif saptandı. *pslA* geni pozitif 100 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25), *pelA* geni pozitif 99 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25.3), *ppyR* geni pozitif 99 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde; 25 tanesi pozitif (%25.3) saptandı.

pslA geni pozitif 100 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde 69 tanesi (%69) biyofilm pozitif, *pelA* geni pozitif 99 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 68 tanesi (%68.7) biyofilm pozitif, *ppyR* geni pozitif 99 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 68 tanesi (%67.7) biyofilm pozitif saptandı.

Antibiyotik dirençleri ile biyofilm genleri karşılaştırılmasında *pslA* geni pozitif suşlarda en yüksek direnç oranı seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. *pelA* ve *ppyR* genindeki pozitiflik durumlarına göre antibiyotik direnç dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

Çalışmamızda 100 *P. aeruginosa*'nın 88'inde (%88) *exoS* geni, tamamında (%100) *exoY* ve *exoT* geni, 27'sinde (%27) *exoU* geni pozitif saptandı. *exoS*, *exoU* biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmeyen izolatlara göre daha fazla oranda pozitif tespit edilmiştir. *exoS* negatif hastalarda siprofloksasin direnci pozitiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). *exoU* pozitif hastalarda levofloksasin direnci negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Biyofilm oluşturan suşlarda biyofilm genlerinden en az biri pozitif saptanmıştır. Biyofilm genleri pozitif saptanan suşlarda Tip-3 sekresyon sistemi genlerinden en az biri saptanmış olup, biyofilm oluşumu ile tip 3 sekresyon sistemi virülans faktörlerinin klinik anlamda ilişkili olduğu düşünülmüştür. *P. aeruginosa*'da biyofilm ve T3SS antibiyotik direncine katkı sağlayan önemli virülans faktörlerinden olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler; *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm, Tip 3 Sekresyon Sistemi

SUMMARY

Investigation of the Relationship Between Biofilm and Type 3 Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Blood Cultures

Dr.Hazel Malaş İREN

This study aimed to investigate the biofilm formation, Type 3 secretion system (T3SS), related genes and antibiotic resistance of *P. aeruginosa* strains isolated from blood cultures in Pamukkale University Health Research and Application Center Microbiology Laboratory.

Of the 100 strains included in the study, 50 (50%) were isolated from intensive care units, while 50 (50%) were isolated from non-intensive care departments. Biofilm formation was positive in 25 (25%) of 100 *P. aeruginosa* strains on Congo red agar; among these, 18 (36%) were sent from intensive care units, while 7 (14%) were sent from non-intensive care departments. Biofilm formation was significantly higher on samples sent from the intensive care units compared to those from non-intensive care departments ($p<0.05$). Biofilm formation was positive in 69 (69%) of *P. aeruginosa* strains in our biofilm study performed with the microtitration plate method. Biofilm formation was positive in 34 (68%) of the strains isolated from blood cultures sent from intensive care units. Biofilm formation was positive in 35 (70%) of the strains obtained from samples of non-intensive care departments ($p<0.05$). When the compatibility between the biofilm evaluated on Congo red agar medium and the microtitration plate method was compared, there was a significant difference between the methods ($p<0.05$).

The highest levels of antibiotic resistance were against ceftazidime (20%) and imipenem (19%). Except for ciprofloxacin, the rate of antibiotic resistance in the strains isolated from the samples sent from the intensive care units was higher than the antibiotic resistance in the strains isolated from the samples of non-intensive care departments. It was observed that the resistance rates of cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam antibiotics were higher in the biofilm-forming group than in the non-biofilm-forming group.

The presence of genes associated with biofilm formation (*pslA*, *pelA*, *ppyR*) in *Pseudomonas aeruginosa* and the presence of genes involved in the Type 3 secretion

system of *P.aeruginosa* (*exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU*) were investigated. The *pslA* gene was positive in all 100 (100%) strains, the *pelA* gene was found in 99 (99%) and the *ppyR* gene was positive in 99 (99%) strains. While 25 (25%) of 100 strains positive for *pslA* gene were biofilm positive on Congo red agar medium; of 99 *pelA* gene positive strains, 25 were biofilm positive (25.3%) on Congo red agar medium and of 99 *ppyR* gene positive strains, 25 (25.3%) were positive on Congo red agar medium.

69 (69%) of 100 strains positive for *pslA* gene; 68 (68.7%) of 99 strains positive for *pelA* gene and 68 (67.7%) of 99 strains positive for *ppyR* gene were biofilm positive in microtitration plate method.

In the comparison of antibiotic resistances with biofilm genes, the highest resistance rates in *pslA* gene positive strains were against ceftazidime (20%), imipenem (19%), piperacillin-tazobactam (18%) and cefepime (17%). There was no significant difference between antibiotic resistance distributions according to the positivity of *pelA* and *ppyR* gene.

ExoS gene was positive in 88 (88%) of 100 *P. aeruginosa*; while all (100%) were positive for *exoY* and *exoT* genes and 27 (27%) were positive for *exoU* gene. *exoS* was more positive in *exoU* biofilm-forming isolates than in non-forming isolates.

Ciprofloxacin resistance was significantly higher in *exoS* negative patients than in positive patients ($p<0.05$). Levofloxacin resistance was significantly higher in *exoU* positive patients than in negative patients ($p<0.05$).

At least one of the biofilm genes was positive in biofilm forming strains. At least one of the Type-3 secretion system genes were detected in strains with positive biofilm genes, and it was thought that biofilm formation and type 3 secretion system virulence factors were clinically related. Biofilm and T3SS were thought to be important virulence factors contributing to antibiotic resistance in *P. aeruginosa*.

Keywords; *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, Type 3 Secretion System

GİRİŞ

Hastane enfeksiyonlarının büyük kısmını oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* keratit, otit, endokardit, pnömoni ve bakteriyemi gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olur. *Pseudomonas aeruginosa*'nın sebep olduğu enfeksiyonlar ciddi yanık hastaları, İnsan Bağışıklık Yetmezliği (Human Immunodeficiency) Virüsü (HIV) ile enfekte olan hastalar ve kanser hastaları gibi immunsuprese hastalarda ciddi seyrederek. Yüksek ölüm oranlarına sahip olan bakteri, kateterler ve ventilatörler gibi cihazlarda biyofilm oluşturur (1,2).

Pseudomonas aeruginosa, antibiyotiklere dirençli bakteriyemilere sebep olur. Bakterinin sebep olduğu antibiyotik direncinde, yüzey ilişkili virülans faktörleri ve bakterinin salgıladığı diğer virülans faktörleri etkilidir. Yüzey ilişkili virülans faktörleri olan biyofilm, lipopolisakkarit, flagella ve pili konak hücreye yapışmada etkilidir (2,3).

Biyofilm, bakterilerin yüzeylere tutunmasında etkili bir virülans faktörüdür. Biyofilm, bakterilerin salgıladığı ekzopolisakkarit matriksi içindeki mikroorganizmaların karmaşık şekilde toplanmasıyla oluşan bir yapıdır. Biyofilm bakterinin yaşama olasılığını artırmakla birlikte, öldürülme olasılığını azaltıp antibiyotiklere dirençli hale gelmesini sağlar. Biyofilm yapısı nedeniyle *P. aeruginosa*, ventilatörler, kateterler ve cilt yaralarında kolonize olarak solunum yolu enfeksiyonları, peritonitler ve ürogenital enfeksiyonlar gibi çeşitli klinik durumlara yol açar (2,3).

Pseudomonas aeruginosa'nın salgıladığı virülans faktörlerinden olan Tip 3 sekresyon sistemi (T3SS), konak hücre teması sonrasında efektör proteinlerin, konak hücre stoplazmasına girişini sağlayarak yüksek virülansa neden olur. Tip 3 sekresyon sistemi (T3SS), bakteriyemilerde mortaliteyi artırmaktadır. Tip 3 sekresyon sisteminin biyofilmle ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, hücre ilişkili agregasyon aşamasında etkileşim halinde oldukları, karşılıklı sistemler tarafından kontrol edildikleri belirtilmektedir (4).

Son yıllarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında antibiyotiklerin kullanımının artışı ciddi antibiyotik dirençlerine neden olmuştur. Özellikle hastane enfeksiyonlarında tedavi sorunuyla beraber ciddi ekonomik problemlere de neden olmaktadır. Bu patojenin virülans faktörlerinin araştırılması ve virülans faktörleri arası ilişkilerin anlaşılması, bakterinin virülansının azaltılmasına yönelik tedavi yaklaşımları için yeni umutlar sağlayabilir.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültürlerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşumu, Tip 3 sekresyon sistemi (T3SS) ve ilişkili genlerin varlığı ve antibiyotik direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonadacea ailesi içinde yer alan *Pseudomonas* cinsine ait birçok tür; yaygın olarak sulara, topraklarda yaşar ve bu türler nonfermentatif, gram negatif ve aerobiktir. Bu türlerin bazıları bitki, hayvan ve insanlar için patojendir. *Pseudomonas*'ların çoğu insanları enfekte eder ve hasta örneklerinden en sık izole edilen klinik öneme sahip olan insan patojeni γ -proteobakteri üyesi *P. aeruginosa* 'dır (5-7).

Pseudomonas aeruginosa, savunma sistemleri zayıflamış, mekanik ventilatöre bağlı, antibiyotik tedavisi alan, cerrahi geçiren, kemoterapi alan bireylerde önemli fırsatçı bir patojendir. Hastane içinde kolonize olarak ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açabilir (7-9).

Pseudomonas aeruginosa; kan dolaşımı enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, solunum sistemi enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi çok çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Özellikle immunsuprese hastalarda oluşan hastane enfeksiyonları yüksek mortalite ve morbiditeye sahiptir. Bu bakterinin oluşturduğu enfeksiyonlarda, antibiyotik direnci tedavide önemli sorunlardandır. Antibiyotik direncinde efflux pompası, enzim üretiminin baskılanması, biyofilm formasyonu bu bakterinin oluşturduğu önemli direnç mekanizmalarındandır. Oluşan antibiyotik direnci hastane yatış süresini ve mortaliteyi artırarak, önemli ekonomik problemlere yol açar (7-9).

Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, 1,5-3 μm uzunluk ve 0,5-0,8 μm genişliğe sahip gram negatif, düz veya hafif kavisli, kapsülsüz, sporsuz basil veya kokobasildir. Bu bakteriler; bir uçlarında tek flagellalı, (bazen bir uçta birden fazla flagella bulunduran) genelde çok hareketli ve hücre yüzeyi pilisi üreten

mikroorganizmalardır. Eski kültürlerde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamdaki kısa veya çok uzun deforme şekilleri hareketsizdir (9,10).

Kültür ve Üreme Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa çoğu besiyerinde 20-42°C'de kolayca üremekle birlikte, en iyi 37°C'de ürer. Zorunlu aerob olmasına rağmen nitratı son elektron alıcısı olarak kullanıp anaerob olarak da üreyebilmektedir. Kanlı agarda 3-5 mm büyüklüğünde üzeri düz, kenarları düzensiz, yeşil metalik parlak ve β-hemolitik koloniler oluşturur. (7,9,10).

Pseudomonas aeruginosa suşları temelde, turkuaz, mavi renkli fenazin pigmenti içeren piyosiyenin ve piyoverdin (fluorescein) adı verilen pigmentlere sahiptir. Piyoverdin, piyosiyeninle birlikte üretilir, besiyerinde sarı yeşil koloni rengine sebep olur (7,9). Bazı suşlar da piyorubin (kırmızı), pyomelanin (kahverengi) ve pigmentleri de oluşturur.

Biyokimyasal Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa'nın katalaz, oksidaz testleri pozitifdir. *P. aeruginosa*, karbonhidratları fermente etmemekle birlikte; glukoz, fruktoz, ve ksiloz gibi şekerleri oksidasyon yoluyla parçalarken, laktoz, maltoz veya sükrozu etkilemez. *P. aeruginosa*'nın L-arginin dehidrolaz üretimi pozitif ve L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz üretimi negatiftir. H₂S oluşturmaması, sitratı kullanabilmesi, eskulini parçalamaması ve nitrattan gaz oluşturması tamda yardımcıdır (7,9,10).

Virülans Faktörleri

Pseudomonas aeruginosa, hücre yüzeyi ilişkili ve hücre dışı virülans faktörleri üretir (7,9,11,12).

Bakteriyel Hücre Yüzeyi İlişkili Virülans Faktörleri

Kirpik (Flagella)

Pseudomonas aeruginosa'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu olan bu yapı, epitel hücre membranındaki gangliosid reseptörlere tutunarak bakteri adezyonunda ve biyofilm oluşumunda yardımcıdır. Flagella; Toll benzeri reseptörler (TLR-5 VE TLR-2) ile etkileşimi ve IL-8 sentezi başlatmasıyla güçlü immunojendir (11,12).

Pilus (fimbriae)

Protein yapıda, filamentöz, kısa yapıdan oluşan tip-4 pili; diğer prokaryotlarda hareketten sorumlu değilken, *P. aeruginosa*'da, seğirme şeklinde hareketi sağlar. Bu hareket bakteride hızla yayılım ve kolonizasyona sebep olur. Ayrıca bu yapı epitel hücrelere tutunmayı sağlar. Flagella gibi kolonizasyonda adezyon aşamasında epitel hücre zarında sialik asitsiz gangliosid reseptörler ile etkileşime girer. Abiyotik yüzeylerde özellikle tip-4 pili in vitro biyofilm oluşumunda önemli bir yapıdır (9,11-13).

Lipopolisakkarit

Pseudomonas aeruginosa'nın dış membran dış yüzeyinde yer alır. Lipid-A, buna bağlı kor (çekirdek) polisakkarid ve O-özümlü polisakkaridi içeren kuyruktan oluşur. O-özümlü polisakkarid zincirleri serotiplendirmeyi sağlar. Lipid-A; inflamasyonda aracı, endotoksin özellikli adezyonda yardımcıdır. Lipopolisakkaritler, TLR4-MD2 reseptörlerine bağlanarak virülansda önemli yer tutarlar (11).

Aljinat:

Aljinat, mannuronik asit ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid ekzopolisakkarittir. Bakterinin nonmukoidden mukoid fenotipine dönüşümünde aljinat etkilidir. Bakterinin etrafındaki bu yapı, matriks etrafında şekillenip bakteriyi konak savunmasından korur. Aljinat, bakterinin adezyonunda ve kolonizasyonunda etkindir (11,12,14).

Aljinat biyofilm oluşumu, yapısal stabilitesinde ve biyofilm korunmasında önemli rol oynasa da biyofilm oluşumunda kesin şart değildir. Bu yapının aşırı üretimi bakteriyi opsonofagositozdan ve antibiyotiklerden koruyup konağın inflamasyon yanıtını azaltır (15).

Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri:

Piyosyanin:

Suda eriyen fenazin boyası olan pigment, mavi yeşil renkten sorumludur ve bu bakteriye özel bir pigmenttir. Bu pigment bakterinin demir alımı için siderofor görevi yapar. Demir kısıtlıysa pigment üretimi artmaktadır. Piyosyaninin siliyer fonksiyonu bozması, nötrofillerde apoptozu uyarması, immün yanıtı suprese etmesi ve kalsiyum dengesini bozması virülans özellikleri içinde sayılabilir (11,16,17).

Piyoverdin:

Kloroformda erimemesi, suda erimesiyle piyosyaninden ayrılan bu pigment, bakterinin yeşil sarı renginden sorumludur. Piyosyanin gibi bakterinin demir alımı için siderofor görevi yapıp demir bağlar. Diğer virülans özellikleri piyosyaninle benzerdir Bazı suşlar piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin gibi. (kahverengi-siyah) pigmentlerini de üretebilirler (11,17).

Elastaz

Elastaz A ve Elastaz B olmak üzere *P. aeruginosa*'da iki çeşit elastini parçalayan elastaz enzimi bulunur. Bu virülans faktörü *P. aeruginosa*'da tip-2 sekresyon sistemi ile sekrete edilen bir metalloproteinazdır. Elastaz, nötrofil göçünü kolaylaştırır. TNF-alfa ve IFN-gama sitokinlerinin inhibisyonuna sebep olup enfekte dokuların hayatta kalmasını sağlar (18-21).

Alkali proteaz

Alkali proteaz *P. aeruginosa*'nın tip-1 sekresyon sistemi tarafından sekrete edilir ve fibrini parçalar. Bu virülans faktörü, yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. C1q, C2, C3, sitokinler ve interferon (IFN)- γ 'yı inhibe eder (11,22).

Proteaz-4

Proteaz-4; *P. aeruginosa*'nın keratit patogenezinde önemli yer tutan bir virülans faktörüdür. Bu faktör sürfaktan proteinlerini yıkarak akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de etkilidir (23-25).

Fosfolipaz-C

Fosfotidilinositol ve fosfatidilkolini parçalayan Fosfolipaz-C *P. aeruginosa*'nın dış membranından tip-2 sekresyon sistemi ile sekrete edilip hemolitik ve nonhemolitik olmak üzere ikiye ayrılır. Hemolitik olanı sitokin salınımı artışına neden olur ayrıca nötrofil immun yanıtını baskılar (26-28).

Ramnlipid

Pseudomonas aeruginosa tarafından yapılan bir hemolizindir. Ramnlipid glikolipid yapıdadır. Isıya dayanıklı biyosürfaktan yapısıyla yüzey gerilimini azaltarak biyofilme katkı sağlar. Konak hücreye toksiktir ve bakterinin hareketinde ve biyofilm yapımında yardımcıdır (29,30).

Ekzotoksin-A

Ekzotoksin-A adenzin difosfat ribozile eden en toksik virülans faktörlerindedir. Hücre dışına tip-2 sekresyon sistemi ile salgılanır. Küçük dozlarda, deney hayvanlarına öldürücü etkisi vardır ve üretimi demir miktarlarından etkilenir. Ekzotoksin-A ADP'yi ribozile ederek elongasyon faktör-2 inhibisyonu ile protein sentezini inhibe ederek patogenezde rol oynar. Dokuları nekrotize edip, kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır (3,11).

BIYOFİLM

Tarihçe

Biyofilmi ilk olarak Van Leeuwenhoek 1684'te diş plaklarının yüzeylerindeki mikroorganizmaları gözlemleyerek tanımlamıştır. Daha sonra Heukelekian ve Heller 1940'da deniz mikroorganizmalarında şişe etkisi ile bakteri üremesi ve aktivitesini artıran yüzey olarak gözlemlemişlerdir. Zobel 1943'te yüzeylerdeki bakteri miktarını incelemiştir. Characklis 1973'te; endüstriyel su sistemlerinde yüzey mikroorganizmalarını inceleyip; bu mikroorganizmaların klor gibi dezenfektanlara dirençli olduklarını göstermiştir. 1978'de Costerton ve ark, dental plaklarda mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere yapışıp, ekolojiye etkilerini açıklayan biyofilm teorisini ortaya koymuştur. (31).

Biyofilm Yapısı

Biyofilm yüzeyle ilişkili tek veya farklı türde mikroorganizmaların proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler gibi polimerik maddelerden oluşan ekzopolisakkarit matriksinde çoğalıp geri dönüşümsüz şekilde bir araya gelerek oluşturduğu; canlı ve cansız yüzeylere yapışmayı sağlayan, oluşmasında çeşitli faktörlerin etkili olduğu yapıdır (31,32).

Bakteriler tarafından üretilen biyofilm yapısı; polisakkaritler, proteinler ve ekstrasellüler DNA, su, iyonlar gibi farklı bileşenlerden oluşan kompleks bir yapıdır. Biyofilm biyokütlesinin %2 ile %15'ini bakteri hücreleri oluştururken çoğunu hidratlı ekzopolisakkaritler oluşturur. Biyofilm matriks yapısı, %50-90'ı ekzopolisakkaritlerden oluşmakla birlikte türler arasında değişir. *P.aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmlerde üç ana tip ekzopolisakkarit pel, psl ve aljinattır. Bazı biyofilm matriksleri; mineral kristalleri, korozyon kil partikülleri ve kan bileşenleri gibi nonsellüler maddeler de bulundurabilmektedir (31-37).

Ekzopolisakkarit yapısı nötr veya polianyoniktir. Bunun önemi; polimerlerin kalsiyum, magnezyum gibi katyonlara bağlanması ve daha fazla bağlanma kuvvetiyle biyofilm yapısının sağlamlığının sağlanmasıdır. Ayrıca ekzopolisakkarit

yapısı; hidrate yapısıyla içerdği hidrojen bağıyla kendi yapısına yüksek miktarda su molekülü katabilir (31,33).

Biyofilm Oluşumunda Etkili Faktörler:

Biyofilm oluşumunda yüzey ile sıvı ortam (su, kan vb.) arasındaki katı-sıvı tabaka mikroorganizmaların bağlanması ve büyümesi için ideal ortam sağlar. Biyofilm oluşumunda; ekstrasellüler DNA, substrat, ortam özellikleri, sıvı besiyeri özellikleri ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların özellikleri gibi faktörler önemlidir (31).

Ekstrasellüler DNA

Pseudomonas aeruginosa'nın oluşturduğu biyofilm yapısında bulunan kromozomal DNA'dan üretilen hücreler arası bileşen olan ekstrasellüler DNA (eDNA), biyofilme besin kaynağı sağlama ve antibiyotiklere direnç gibi görevler üstlenir (37).

Ekstrasellüler DNA'nın üretimi, piyosiyenin gibi fenazin moleküllerinin uyarımı ile düzenlenmektedir. *P. aeruginosa*'da fenazin sentezinde yetersizlikte eDNA daha az üretilmesiyle beraber biyofilmde kalınlık ve biyokütlede ciddi azalma gözlenmiştir (12).

Pseudomonas aeruginosa'nın oluşturduğu biyofilm yapısında; ekstrasellüler DNA biyofilm oluşumunda etkili psl polisakkariti ile beraber, birbiriyle etkileşerek psl-eDNA ağını oluştururlar. Bu ağ bakterilerin birbirleriyle adezyonunu güçlendirmiş olur. Ayrıca Ca^{+2} katyonik iyonu negatif yük taşıyan ekstrasellüler DNA'ya bağlanıp bakterilerin çapraz köprülenmesini sağlamlaştırarak biyofilm yapısına katkıda bulunur. eDNA pH'ı düşürerek biyofilme asidik yapı kazandırır (12,13).

Substrat

Mikroorganizmaların yüzeye tutunması; yüzeydeki fizikokimyasal faktörlerden etkilenir. Katı yüzey biyofilm bağlanma sürecinde önemlidir. Yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikrobiyal kolonizasyon derecesi de artmaktadır. Yüzey pürüzlülüğü kayma kuvvetleri azalması ve yüzey alanının artmasını sağlar. Plastik gibi hidrofobik maddelere bağlanma cam ve metal gibi hidrofilik malzemelere göre daha hızlı gerçekleşmektedir (31).

Ortam Özellikleri

Sıvısal ortamdaki katı yüzey hızla polimerlerle kaplanır ve bu modifikasyon mikrobiyal bağlanma hızını ve miktarını etkiler İnsanlarda şartlar farklı olabilir. Örneğin ağız boşluğundaki diş yüzeylerinde protein yapılı biyofilm gelişir. Bakterilerin biyomalzemelere yapışmasında kan, gözyaşı, idrar, tükürük, interstisyel sıvı ve solunum sekresyonları gibi konak faktörleri etkilidir (31).

Sıvı Besiyerlerinin Özellikleri

Bir mikroorganizmanın substrata tutunmasında sıvı besiyerlerinin pH'ı, besin miktarı, iyonik kuvvetler ve ortam sıcaklığı etkilidir. Besin miktarındaki artış bakteri miktarını artırmaktadır. (31).

Biyofilmi Oluşturan Mikroorganizmaların Özellikleri

Mikrobiyal hücrelerin özellikleri; mikroorganizmaların yüzeye bağlanma hızında ve derecesinde önemli rol oynar. Mikroorganizmaların hücre yüzeyinin hidrofobikliği, fimbria, flagella varlığı ve ekzopolisakkarit üretim yeteneği biyofilm oluşumunu etkileyen faktörlerden bazılarıdır. Mikroorganizmanın hücre yüzeyindeki hidrofobiklik, yüzeylere yapışmada önemli olup, substrat yüzeyi ve hücre yüzeyi arasındaki nonpolar etkileşimi artırır. Epitel hücrelerine tutunmayı sağlayan fimbria yapısı, hücre yüzeyi hidrofobikliğini artırır. Bu yapı, yüksek oranda hidrofobik aminoasit kalıntıları içermektedir. Gram negatif hücre bakteri duvarındaki lipopolisakkaritin O antijen yapısı, hidrofilik özellikte olmakla birlikte, O antijeni içermeyen *Pseudomonas* mutantlarında hidrofobik materyallere yapışmanın fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda hareket yeteneğine sahip hücrelerin

hareketsizlere göre materyallere daha hızlı bağlanıp biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir. Mikroorganizmaların hareket kabiliyetinde önem taşıyan flagella, bakteriyel yapışmada itici kuvvetleri aşmak gibi önemli görev üstlenir. Ayrıca mikolik asitler de hidrofobik içeriğiyle bu yapıyı içeren bakterilerde yapışmada kolaylık sağlar (31).

Sonuçta, hücre yüzey yapıları olan fimbria, lipopolisakkarit, ekzopolisakkarit, flagella gibi yapılar bağlanma aşamasında önemli rol üstlenir. Polar olmayan bölgeleri içeren hücre yüzeyindeki polimerik yapılar hidrofobik tabakalara bağlanma eğilimindeyken ekzopolisakkarit, lipopolisakkaritler gibi yapılar da hidrofilik yüzeylere yapışma eğilimindedir (31).

Biyofilm Oluşum Evreleri

Biyofilm oluşum evreleri mikroorganizmaların yüzeye tutunması, mikroorganizmaların birbirlerine geri dönüşümsüz bağlanması, kolonizasyon ve mikrokolonilerin oluşumu, biyofilm olgunlaşması ve dağılmasından oluşur (32,38).

Biyofilm oluşumunda ilk evre çevresel stres altında meydana gelen mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunmalarıdır. Bu evrede mikroorganizmaların sahip oldukları flagella, fimbria gibi itici yapılar ve tutunulan yüzeye aradaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler mikroorganizmaların yüzeye kısa sürede tutunmasını sağlar. Bakteriler yüzeye birleşir ve proteinler, polisakkaritler, lipidler ve eDNA dahil olmak üzere hücre dışı polimerik maddeler üretir. Kısıtlı flagellar hareket seçirme motilitesine ve yüzey birleşmesi için gerekli olan ekzopolisakkaritlerin biyosentezine aracılık eder. *P. aeruginosa*'nın tip-4 pili yapısı O-polisakkarit zinciri kombinasyonu ile tutunmayı daha da kolaylaştırır (15,39).

Pseudomonas aeruginosa'da mürinin glikolizasyonu tutunmada etkilidir. Ayrıca hücre yüzeyi ilişkili mürin ve piliden farklı olarak adezinler yoluyla da yüzeye yapışma kolaylaşır. Mukus salgılayan hücrelerle epitel tabakasının oluşturduğu mukozal bariyer bakterinin bazolateral yüzeye ulaşmasını engeller; bu

bariyer bozulursa *P. aeruginosa* alt tabakalara kolayca iner. Hücre dışı bazal membran proteinleri fibronektin, laminin ve kollajenler de yayılma ve kolonizasyonda etkilidir (12,13).

Pseudomonas aeruginosa ikinci evrede; lipopolisakkarit yapısını değiştirerek biyofilmin kalıcılığını sağlar. Lipopolisakkarit-A üretimi hidrofobikliği artırarak hidrofobik yüzeylere tutunmayı gerçekleştirirken, lipopolisakkarit-B hidrofilik yapısıyla hidrofilik yapılara bağlanmayı kolaylaştırır (12,13).

Mikroorganizmalar yüzeye tutunduktan sonra populasyon yoğunluğu, besin miktarı, pH gibi çevresel faktörlere uyum sağlamak için metabolizmalarında çeşitli düzenlemelerde bulunarak birbirleriyle iletişim halinde olurlar. Bu haberleşme sistemine "Quorum Sensing Sistemi" bir diğer deyişle "Minimum Populasyon Birimi Algılama" denir. Kurulan iletişim sonrası bakteri hücreleri salgıladıkları ekzopolisakkaritlerle, birbirlerine ve yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar (6). Quorum sensing sistemi bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerle (N-açıl homoserin lakton gibi) biyofilm oluşumunu düzenlemektedir Ayrıca biyoluminesans, virülans faktörlerinin ifadesi, antibiyotik üretimi gibi birçok olayda bu sistem etkilidir (6).

Biyofilm oluşumunda üçüncü evre kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumudur. Bakteriler yüzeye tutunma sonrasında bölünerek kendi mikrokolonilerini oluşturur. Quorum sensing sistemi ile koloni oluşumu daha da desteklenip dirençli yapı kazanılır. En son evrede bakteri ya da bakteri toplulukları hareketlenip biyofilm üst tabakadan koparak başka odaklarda yayılır (32).

Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Sebepleri

Bakterilerin biyofilm içinde planktonik bakterilere göre büyüme hızları düşük olsa da bu yapının oluşmasında çeşitli sebepler vardır. Bunlar yaşanabilir ortam ve topluluk oluşturma, savunma, adezyon ve kolonizasyon gibi sebeplerdir (40,41).

Yaşanabilir Ortam

Bakteriler ortamdaki glukozu ve ekzopolisakkaritleri kullanarak biyofilm yapısını oluşturmayı artırır. Yüzeyle bağlanma aşamasında bakterilerin genlerinde düzenlemeyle biyofilm için uygun ortam sağlanır (40,41).

Topluluk Oluşturma

Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi çevre faktörlerine (besin, pH, ısı vb.) eksprese ettikleri genler aracılığıyla hızla planktonik hale geçerek cevap verirler. Bu cevabı oluşturmalarında quorum sensing denilen haberleşme sistemi önemlidir. Biyofilmdeki tüm bakteriler, çevre faktörlerine aynı anda cevap vererek toplu yaşam sergilerler (42).

Savunma

Bakteriler biyofilm yapısı sayesinde ortam pH farklılıklarından, konak immunitesinden, dezenfektanlardan ve antibiyotiklerden daha az etkilenip kronik enfeksiyonlara ortam hazırlarlar (43).

Adezyon ve Kolonizasyon

Biyofilm içerdiği ekzopolisakkarit yapısı içindeki su ve oksijen miktarıyla bakterilerde sabit bir yapı oluşturur. Bu sabit yapı konak matriks yapı proteinleri, bakterinin pili ve flagella gibi yapıları sayesinde olur. Bakteri yüzey proteinleri; konakçının fibrinojen, fibronektin ve elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine tutunurlar. Tutunma sonrasında bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Biyofilm oluşumu başlayınca adezyon faktörleri uyarımı azalır (42,44,45).

Biyofilm Oluşumunun Klinik Önemi:

Biyofilmler canlı dokularda, kalıcı tıbbi cihazlarda, endüstriyel veya içme suyu sistemi boruları ve doğal su sistemleri dahil çeşitli yüzeylerde oluşabilmektedir. Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin yayınına göre (46), *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının %80'den fazlası *P.aeruginosa* oluşturduğu biyofilmle; kan dolaşımı enfeksiyonları,

kateter enfeksiyonları, üst solunum yolu enfeksiyonları ve ürogenital enfeksiyonlara yol açar. Özellikle konaktaki kronik enfeksiyonlar; biyofilm oluşumu ile paralellik gösterir (12,47).

Biyofilmdeki glikokaliks antibiyotik penetrasyonuna karşı polianyonik bariyer görevinde bulunarak inflamasyona ve antibiyotik direncine yol açarak hastalarda kalıcı enfeksiyonlara neden olur. Hücre dışı biyofilm matriksi birincil yapıları antibiyotiklerden ve immun olaylardan koruma işlevindedir (33,35,48).

Bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapılarının sebep olduğu antibiyotik direncini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar arasında antimikrobiyal ilaçların biyofilmlere penetrasyonunda azalma, biyofilm içinde değişen mikroçevre, yüzeyde oksijen tüketimiyle derin katmanlarda anaerobik suşlarla antibiyotiğin inaktivasyonu, biyofilm içindeki osmotik ortam değişimiyle osmotik stres sayılabilir. Ayrıca enzimlerin modifikasyonu, hedef bölge mutasyonu biyofilm oluşturan bakterilerde antibiyotik direncine katkıda bulunur (12,35,49).

***Pseudomonas aeruginosa* Patogenezinde Biyofilm İlişkili Genlerin Rolü**

Pseudomonas aeruginosa'nın biyofilm oluşumunda bakteri tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritleri kodlayan üç önemli gen *psl*, *pel* ve *ppyR* genleridir. Bu genlerin ekspresyonu, biyofilm matriksinin karbonhidrat yönünden zengin yapısının oluşumunda önemli yer tutar (8,50,51).

***psl* (Polisakkarit Sentez Lokusu)**

Psl polisakkariti D-mannoz, L-ramnoz ve D-glukoz ve D-mannoz tekrarlarından oluşan bir ekstrasellüler pentasakkarittir (52). Bu polisakkariti kodlayan genlerden biri olan *pslA* geni; 15 genden oluşan operondur (53). Bu operon, hem mukoid olan hem mukoid olmayan *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumunun başlatılması, farklılaşması ve korunmasında etkilidir. Ayrıca, biyofilm hücrelerini matrikste bir arada tutan iskele işlevi görmektedir (50,54,55).

Psl polisakkariti, *P. aeruginosa* etrafında, biyofilm oluşumu için gerekli hücre yüzey ve hücreler arası etkileşimleri artıran sarmal yapı oluşturup, epitel hücrelere bağlanmada, biyofilm organizasyonunda yardımcıdır ve matriksin çapraz bağlanmasını, elastikyetini artırıp mikrokoloni iskelet yapısını güçlendirir. Psl sıkı mikrokoloni oluşumu ile, biyofilmlerin antibiyotiklere dirençli hale gelmesini sağlar (15,37). Psl polisakkariti yetersizliği ya da yokluğunda matriks viskozitesi artıp, biyofilm akışkanlığı bozulur (12,13,37,51,55).

Psl polisakkariti, *P. aeruginosa*'nın konak hücre immunitesinden gizlenmesini sağlayıp, bakteriyel yüzeye doğru kompleman sistem hareketini, kompleman aracılı opsonizasyonu, nötrofil fagositozunu engeller. Bu polisakkarit flagellin aracılı proinflamatuvar sinyallerin kolaylaşmasını sağlar. Bakteri hücreleri ile epitel hücreleri arasındaki teması kolaylaştırarak inflamatuvar sitokinlerin artışına katkıda bulunur (12,37,55-57).

pel (Pelikül Lokusu)

Pel, kısmen deasetillenmiş N-asetil-D-glukozamin ve N-asetil-D-galaktozaminin katyonik bir polisakkarit polimeridir. Psl gibi, Pel de mukoid olmayan *P. aeruginosa* suşlarında biyofilmin temel bir matriks bileşenidir ve yüzeye bağlanmanın başlatılmasında ve biyofilm bütünlüğünün korunmasında rol oynar. Yedi genden oluşan (*pelA*, *pelB*, *pel*, *pelD*, *pelE*, *pelF* ve *pelG*) *pel* operonuyla kontrol edilen pelikül oluşumu, *P. aeruginosa*'nın *pel* polisakkaritini sentezleyip virülansının artırmasıyla sonuçlanır. Psl ve *pel* sentezi suşun özelliğine göre değişip çevre faktöründen etkilenebilir (15,50,55).

Glikoz bakımından zengin matriks polisakkarit polimerini kodlayan *pel* operonu, ve bu operon hücre dışı matriks üretiminde ve biyofilm olgunlaşmasında etkilidir (64). Pel polisakkariti, *P. aeruginosa* biyofilmlerini korumakla kalmayıp, biyofilmlerin aminoglikozitler gibi antibiyotiklere karşı direncinde etkilidir. *P. aeruginosa* suşlarında aljinat üretimi yeterli miktarda olmazsa nonmukoid *P. aeruginosa* suşları, biyofilm oluşumunda primer yapı iskelesinde *pel* veya *psl* kullanır (12,58).

ppyR

ppyR geni ekspresyonu, *psl* operon türevli ekzopolisakkaritleri artırarak biyofilm oluşumu artırmaktadır (58). Bu genler, mukoid olmayan *P. aeruginosa* suşlarında plastik yüzeylere ve epitel hücrelere yapışma, hücre toplanması, pelikül oluşumunda bağlanma için gerekli primer ekzopolisakkaritlerin üretimini kodlamada rol almaktadır. Bu genlerin biyofilm gelişim aşamalarındaki önemi, biyofilm matriksini bozmayı amaçlayan ajanlar için caziptir (50).

***Pseudomonas aeruginosa*'da Biyofilm Matriksinin Düzenlenmesi**

Pseudomonas aeruginosa çeşitli etkilere yanıt olarak biyofilm oluşturur. *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm matriksi; GacS/GacA ve RetS/LadS gibi düzenleyici sinyal sistemleri, bis-(3'-5')-siklik-dimerik-guanozin monofosfat (c-di-GMP) aracılığıyla düzenlenir (12).

GacS / GacA İki Komponentli Düzenleyici Sinyal Sistemi

Pseudomonas aeruginosa'da ekzopolisakkarit üretimi, GacS / GacA iki komponentli sinyal sistemi tarafından düzenlenebilir (37). İki bileşenli bu sistemde GacS hücre zarına bağlı olup sensör görevi görür. GacA düzenleyici görev alır. Düzenleyici GacA GacS tarafından fosforile edilince küçük düzenleyici RNA'lar (sRNA) *rsmY* ve *rsmZ* genleri transkripsiyonu uyarılır. Bu düzenleyici RNA'lar *rsmY* ve *rsmZ* RsmA'nın (küçük RNA bağlayıcı protein) düzenleme aktivitesini antagonize eder (59-62). Serbest düzenleyici baskılayıcı RsmA, promotör bölgelere bağlanarak *pel* ve *psl* lokusu gibi biyofilm ilişkili genlerin uyarılmasını engeller, böylece GacS/GacA sinyal yolağı biyofilm oluşumu üzerinde artırıcı etki sağlar (63-66).

RetS ve LadS sinyal yolağı

RetS ve LadS olmak üzere iki sensörü içeren düzenleyici sistemdir. RetS ve LadS sinyal yolakları, GacS/GacA sinyal yolağını kontrol altında tutan bir sinyal sistemidir (37,63, 67). RetS sensörü GacS ve LadS sensörünün tersi uyarı ile serbest RsmA'nın üretimini artırarak akut enfeksiyonda rol alan biyofilm üretimini baskılar (62,64,66-68).

LadS sensörü şu ana kadar açıklanamayan mekanizmayla GacS/GacA sinyal kaskadını aktive ederek *rsmY* ve *rsmZ* gen ekspresyonunu artırır. Böylece düzenleyici RNA'ların RsmA'yı baskısıyla *pel* genleri aracılı biyofilm oluşumuna katkı sağlar. LadS sensörü biyofilm yapısını düzenleyerek enfeksiyonların kronikleşmesinde etkilidir. Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* PA14 suşunda *ladS* genin mutasyonu ile *pel* polisakkarit biyosentez genlerinin ekspresyonunu azaltarak biyofilm oluşumunun yavaşladığı görülmüştür (12,62,63,66,69).

c-di-GMP Bağlı Polisakkarit Biyosentezi

Bakteriler hücre dışı koşullarını değiştirmek amacıyla çeşitli ikincil haberci sinyal molekülleri üretirler. Bis-(3'-5')-siklik-dimerik-guanozin monofosfat (c-di-GMP) bunlardan biridir. İlk olarak 1987'de *Gluconacetobacter xylinus*'da tanımlanmıştır. Bakteri hücrelerinde c-di-GMP diguanilat siklazlar tarafından üretilip, fosfodiesterazlar tarafından parçalanır (37).

Genel olarak c-di-GMP biyofilm biyosentezini adezinler ve ekzopolisakkaritler aracılığıyla uyarır. c-di-GMP'nin yüksek seviyelerinde *P. aeruginosa*'da biyofilm üretimini artırdığı bilinmektedir. RetS tarafından biyofilm oluşumunun kontrolü küçük düzenleyici RNA'lar üzerinden c-di-GMP'ye bağlıdır. *retS* mutanı c-di-GMP aracılı hiperbiyofilm fenotipine sebep olabilir (37,59,60).

TİP-3 SEKRESYON SİSTEMİ

Tanımı

Tip-3 sekresyon sistemi ökaryotik hücrelere bakterilere ait efektör proteinlerinin konak hücrelere aktarılmasını sağlar. *P. aeruginosa* Tip-1, Tip-2, Tip-3, Tip-4 ve Tip-6 olarak tanımlanan beş protein sekresyon sistemine sahiptir. Özellikle Tip 3 sekresyon sistemi bakteri virülansında en önemli sekresyon sistemlerinden biridir. T3SS flagellar sistemle ortak bir atadan gelmektedir. *P. aeruginosa* kromozomunda beş operonda kodlanmış 36 gen, T3SS sisteminde biyogenez ve düzenlemede yer alır (1,33,70-72).

Tip-3 sekresyon sisteminde birincil sinyal konak hücre temasıdır. T3SS substratları bakteriyel sitozolden hücre dışı ortama aktaran iğne kompleksini (sekresyon aparatı) oluşturan proteinler, salgılanan proteinleri konak hücrelere aktaran proteinler (translokasyon aparatı), efektör proteinler ve salgılanma sürecini düzenleyen şaperon proteinler olmak üzere fonksiyonel bölümlere ayrılır (71).

Tip 3 Sekresyon Sistemi Bölümleri

İğne kompleksi

İğne kompleksi (sekresyon aparatı), spesifik proteinlerin bakteriyel sitozolden hücre dışı ortama taşınmasından sorumlu yapı olmakla beraber spesifik proteinleri peptidoglikan tabaka ve dış membrana bakteriyel stoplazmik zarın bariyerlerinden geçirerek taşır (36,71).

Pseudomonas aeruginosa iğne kompleksi *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bordatella* ve Enteropatojenik *Escherichia coli*'nin sahip olduğu T3SS iğne kompleksinden daha kapsamlıdır. İğne kompleksi çok halkalı bir taban ve iğneye benzer bir filament olmak üzere iki bölümden oluşur.

İğne Kompleksi Alt bileşenleri

PscF protein alt birimlerini içeren iğne benzeri filament, salgılanan faktörlerin hareketini sağlayan, konak hücre teması için sensör görevi gören bir kanaldır. Bu kanal, 60-120 nm uzunluğunda, 6-10 nm genişliğinde olmakla birlikte *Shigella flexneri*, *Shigella enterica* ve *Yersinia enterocolitica* bakterilerinin iğne benzeri filamentlerine benzer boyutlardadır. PscN *P. aeruginosa*'yı kuvvetlendiren bir ATPaz'dır. PscN fonksiyonları salgı sistemi ve PscL tarafından düzenlenir. PscC PscW'nin sayesinde bakteriyel dış zardan kanal oluşturan oligomerize sekretin benzeri proteindir. PscJ iğne kompleksinin bazal alt yapısının lipoprotein bileşenidir (36,71).

Translokasyon aparatı

İğne kompleksi tarafından salgılanan efektör proteinleri kabul eden, onları konak hücre plazma membranına ileten proteinöz zar membrandır. Translokasyon süreci hücre dışı ortama salgılanan efektör proteinler ile daha efektiftir. T3SS'ni *P. aeruginosa*'da translokasyon için PopB, PopD ve PcrV olmak üzere üç proteini kullanır (36).

Sekrete edilen PopB ve PopD 2,8-6 nm translokasyon poruyla, birbirleriyle ve konak hücre zarıyla etkileşime girer. Rekombinant PopB ve PopD in vitro lipid veziküllerde oligomerler ve halka benzeri yapılar oluşturabilir. PopB ve PopD proteinlerinin iğne kompleksi (sekresyon aparatı) tarafından sekrete edilip bu kompleks içinden fibroblastların ve eritrositlerin plazma zarına girişinde gereken porlar için PcrV proteini gereklidir. T3SS tarafından sekrete edilen translokasyon için gerekli olan PcrV Tip 3 sekresyon sisteminin iğne ucunda multimerik iskele yapısı oluşturur. Bu iskele yapısı PopB/PopD translokasyon porunun konak hücre plazma membranı içine girişini kolaylaştırır. PcrV sekresyon aparatını PopB/PopD porlarına bağlayarak; efektör proteinlerin bakteriyel sitozolden konak hücre stoplazmasına hareket ettiği kesintisiz kanal oluşturur. PcrV, konak hücrelerle temas ettiğinde virülans faktörlerini doğrudan konağın hücrelerine taşıma kapasitesindedir (67).

Translokasyon aparatının görevi; efektör proteinleri taşımakla sınırlı değildir. Translokasyon porunun membran geçirgenliğini artırma, dolaylı yoldan hücrel immun yanıtları artırıp konak hücre ölümünün sağlanmasında da görev alır.

Efektör proteinler

Pseudomonas aeruginosa T3SS efektör proteinleri; ekzoenzim-S (EkzoS), ekzoenzim-Y (EkzoY), ekzoenzim-T (EkzoT) ve ekzoenzim-U (EkzoU)'dur (73,74).

Ekzoenzim-S (EkzoS)

EkzoS, hem GTPaz aktive etme (GAP), hem de ADP riboziltransferaz (ADPRT) aktivitesine sahip bir toksindir. EkzoS'nin ADPRT aktivitesi fagositozun önlenmesinde ana faktördür. EkzoS'nin ilk amino ucu hedefe yönelik (sekresyon için gerekli) bilgiler taşır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde EkzoS nötrofillere aktarılır. Bu efektör protein hücre iskeleti bozulması hücre ölümü, sitotoksite, apoptoz, nekroz gibi olaylara yol açar. Kanda bakteriden önce tespit edilen ekzoenzim-S; *exoS* geni tarafından kodlanır. (33,75).

Ekzoenzim-Y (EkzoY)

EkzoY ATP'yi bağlayan adenilat siklaz özelliğinde bir proteindir. Bu protein hücre içi cAMP konsantrasyonunu artırarak etki eder. Aktin hücre iskeleti bozulması, endotel geçirgenliği artışıyla bakterinin kan dolaşımına yayılması ve septik şoklara neden olur. Bu protein *exoY* geni tarafından kodlanır. (36,70).

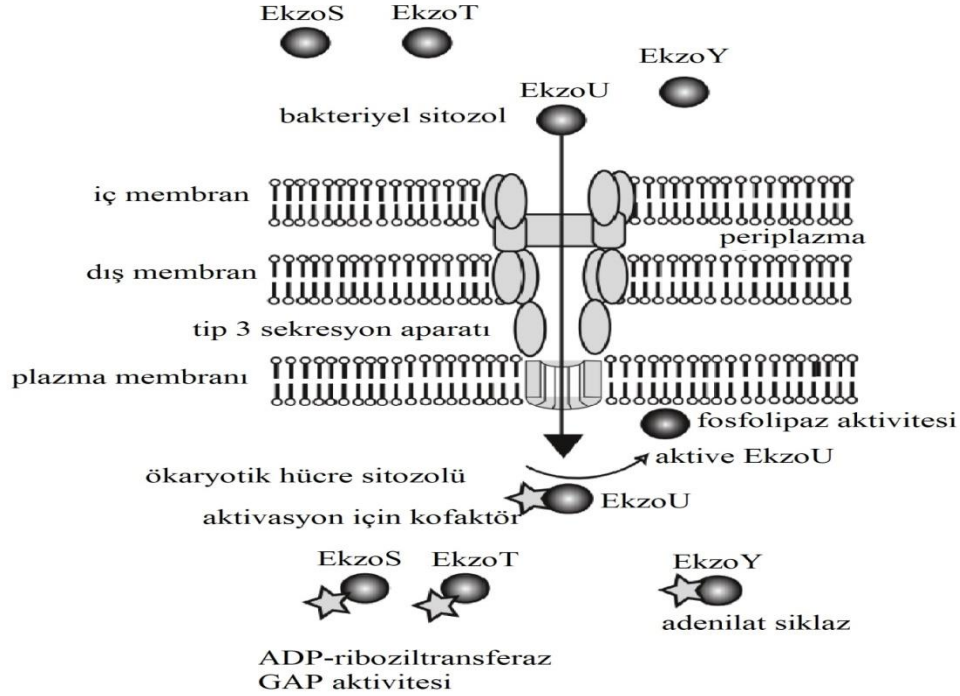
Ekzoenzim-T (EkzoT)

EkzoT ekzoS ile aminoasit yapısı bakımından benzerdir. N-terminal GAP aktivitesi ve karboksi terminal ADPRT aktivitesine sahiptir. EkzoT'nin GAP aktivitesi, EkzoS ile birlikte, efektör aktarımının inhibisyonuna katkıda bulunur. Bu efektör protein; hücre aktin iskeletinin geri dönüşlü bozulması, fagositoz inhibisyonu yol açar. EkzoT, doğal öldürücü hücreler tarafından IFN- γ üretimini arttırır ve *exoT* geni tarafından kodlanır. (36,70).

Ekzoenzim-U (EkzoU)

EkzoU, klinik izolatlarda az miktarda üretimine rağmen, ciddi akut akciğer hasarı, sepsis ve mortalite ile ilişkili olarak hastalık şiddeti üzerinde en büyük etkiye sahip olduğu için majör T3SS sitotoksini olarak kabul edilir. EkzoU konağa ait hücre zarını geri dönüşsüz yok eden fosfolipaz aktivitesiyle ökaryotik hücrelerde ölüme, sitotoksiteye sebebiyet verir. Bu efektör protein, hücre plazma membran kaybı ile doku nekrozuna sebep olur. EkzoU fagositleri ve epitelyal bariyerleri aşarak bakterinin yayılmasını sağlar. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)'yi aktive etmesi

sayesinde enfeksiyon süreci sırasında IL-8 salgılanmasını uyararak epitelde artan nötrofil alımına yol açar. Bu toksin *exoU* geni tarafından kodlanır. (1,22,36,70,76).



Şekil-1. *Pseudomonas aeruginosa* Tip 3 sekresyon sistemi (77.kaynaktan düzenlenmiştir.)

Şaperonlar

T3SS'nde sekrete edilen proteinler sekresyon öncesinde şaperon adı verilen proteinlere bağlanmaktadır. Şaperonlar; bakteri stoplazmasında protein deposunu oluşturmakla birlikte, proteinlerin iğne kompleksine uygun bir şekilde iletilmesinde de yardımcıdır.

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Şaperonları**

SpcS EkzoS ve EkzoT için, SpcU EkzoU için düzenleyici bir şaperon proteindir. PcrH; translokasyon proteinleri PopB ve PopD için, PscE ve PscG; PscF translokasyon aparatı subuniti için, ExsC düzenleyici protein ExsE için düzenleyici bir şaperon proteindir (71).

Tip 3 Sekresyon Sistemi Sistemin Düzenlemesi

T3SS düzenlenmesi sekresyonun başlatılması ve T3SS genleri transkripsiyonu olarak iki bölümde düzenlenmektedir. Sekresyon başlatılması ile transkripsiyon indüklenmesi gerçekleşir. Bu düzenleme gereksinim duyulduğunda konak hücre temasını takiben Tip 3 sekresyon sistemi bileşenlerinin gerekli düzeylerde üretimine yardımcı olur (69,70,71,78,79).

T3SS'ni ifade eden genlerin transkripsiyonu ExsA şaperon proteini tarafından düzenlenir. ExsA aracılı transkripsiyonel aktivasyon sonrasında ExsC, ExsD, ExsE olmak üzere üç protein, T3SS aracılı sekresyonu düzenler. Sekresyon sonrasında ExsD (transkripsiyonu inhibe edici antiaktivatör) ExsA'ya bağlanır. ExsC antiaktivatör özelliğiyle ExsD'ye bağlanıp ExsD-ExsA etkileşimini bozmaktadır. ExsE ExsC'ye yüksek bağlanma gücüyle bu etkileşimin bozulmasına engel olur. ExsE'nin Tip 3 sekresyon aparatı aracılığıyla konak hücre sitozolüne sekresyon sırasında dışa aktarılmasıyla ExsE seviyeleri azalır. ExsE miktarı tamamen tükenince ExsC ExsD'ye bağlanıp ExsA tarafından Tip 3 sekresyon genlerinin engelsiz transkripsiyonuna sebebiyet verir. T3SS proteinlerinin üretimi konak hücre temasına kadar düşük bazal seviyede tutulmalıdır (80).

T3SS genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesinde RsmA adı verilen düzenleyici şaperon proteinler de önemlidir. RsmA aktivitesi RsmV, RsmW, RsmY ve RsmZ tarafından kontrol edilir ve bunların yüksek seviyeleri RsmA'nın birikmesi ve T3SS ekspresyonu azalmasıyla sonuçlanır. RsmA şaperon proteini T3SS gen ifadesini pozitif yönde kontrol ederken biyofilm oluşumunu negatif yönde uyarır (80).

RetS/LadS sinyal yolağı, T3SS genleri ekspresyonunu düzenleyen GacS/GacA sinyal yolağı üzerinden T3SS'ni düzenler. RetS sensörü, T3SS genlerini indükleyici, biyofilm oluşumunu baskılayıcı şekilde düzenleme yapar. LadS sensörü; GacS'yi aktive eder ve RsmYZ transkripsiyonunun indüklenmesine yol açar. RsmY ve RsmZ; RsmA'nın birikimine yol açıp RsmA'nın azalmasına sebep olup T3SS gen ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar (62,71,80).

T3SS aktivasyonu hala anlaşılammakla beraber konak hücre teması T3SS'nde önemli bir uyarıdır. Ayrıca kalsiyum, glutamat gibi aminoasitler de T3SS aktivasyonunu sağlamaktadırlar. Bu durum T3SS'nde sitrik asit döngüsünün önemini göstermekle beraber, sitrat sentaz, piruvat dehidrogenaz, glikoz taşıyıcı düzenleyicisini kodlayan genlerde mutasyonda bu sistemin aktivasyonunun engellendiğinin gösterilmesiyle desteklenmiştir. Ayrıca bakteriler metabolik stres altındayken T3SS'nin sekrete edilmesi azalmaktadır (71).

Tip 3 Sekresyon Sisteminin *Pseudomonas aeruginosa* Patogenezindeki Rolü ve Klinik Önemi

Normalde polarize konak hücre epiteli *P. aeruginosa*'nın fırsatçı enfeksiyonlarına engel olacak şekilde bakteri istilasına karşı dirençlidir. Hasar görmüş polarize epitel *P. aeruginosa*'nın bağlanmasına Tip 3 proteinlerin girişine daha duyarlıdır. Hasarlı epitelden giriş sonrasında efektör proteinlerden ekzoT; yara iyileşmesini baskımlarken ekzoS ve ekzoU IL-1 ve IL-18 aracılı inflamasyonu baskılar. EkzoU araşidonik asit üretimini artırırken, eikosanoidleri artırıp aşırı nötrofil üretimi hasarlı dokuya daha da zarar verir. Tüm engellerin kaybıyla bakteriler kan dolaşımına yayılır. Tümör nekroz faktörü gibi proenflamatuar sitokinler uyarımı ile enfeksiyonun akciğerlerden sistemik dolaşıma yayılmasıyla septik şok oluşur (74).

Pseudomonas aeruginosa pnömoni, idrar yolu, yara, yanık, keratit kan dolaşımı enfeksiyonları dahil birçok enfeksiyona yol açarak ekonomik ve toplumsal sorunlara yol açar. Özellikle kistik fibroz hastaları, yoğun bakım hastaları ve immunsuprese hastalar bu enfeksiyonlara yatkındır (7,9). *P. aeruginosa* sahip olduğu Tip 3 sekresyon sistemini kullanarak kolaylıkla antibiyotiklere dirençli enfeksiyonlar oluşturur. T3SS *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında mortaliteyi artırır (47,71).

***Pseudomonas aeruginosa*'da Biyofilm Yapımı ve Tip 3 Sekresyon Sistemi**

Pseudomonas aeruginosa polarize epitel hücrelerinin apikal yüzeyine bağlandığında epitel bariyerinde biyofilmler aracılığıyla, hücre ile bağlantılı agregasyonlar oluşturur Epitel hücrelerinde toplanma T3SS'nin kanal oluşturmasında

aracıdır. T3SS translokasyon aparatı, konak hücre faktörünün salınımını indükleyerek hücre bağlantılı agregasyonun başlatılmasında yardımcıdır. Hücre bağlantılı agregalar epitele bağlanınca, agrega bağlanma bölgesinde aktinden zengin oluşan protrüzyon sonrası T3SS translokonu tarafından salınan konak hücre faktörü ile olayın devamlılığı sağlanır. Yapılan çalışmalarda konak hücre faktörünün (agrega indükleyici faktör) biyofilm oluşumunu artırdığı, T3SS'nin biyofilm oluşumuna doğrudan etki etmediği dolaylı etki ettiği sonucuna varılmıştır (46,81).

T3SS ekspresyonunu ve biyofilm oluşumuna yol açan ekzopolisakkaritlerin üretimini karşılıklı düzenleyen iki sensör yolağı RetS ve LadS sinyal sistemidir (82,83). RetS sensörü akut enfeksiyonlardaki genlerin uyarımını, kronik enfeksiyonla alakalı genlerin inhibisyonunu sağlayıp çoklu virülans fenotiplerini düzenler. Yapılan çalışmalarda RetS sensörü ile T3SS genleri ekspresyonu ve biyofilm oluşumunu artıran *pel* ve *psl'nin* baskılandığından bahsedilmiştir (59). RetS ekspresyonunun virülansa dahil genlerin ekspresyonunda gerekli olduğu, biyofilm oluşumu için gerekli ekzopolisakkaritlerin sentezine katılan genlerin inhibisyonuna açtığı mikrodizi analizi kullanılarak mRNA seviyeleri analizinde gösterilmiştir (37,62,66,69).

LadS sensörü T3SS'nin baskılanması ve biyofilm oluşumunu sağlayan ekzopolisakkarit üretiminde gerekli genlerin ekspresyonuna yol açarak RetS sensörünün tersi hareket eder. Ayrıca LadS sensörü *exoS'nin* aşırı ekspresyonuyla T3SS'ne negatif uyarıda bulunur (62,66,68,69).

HptB sinyal yolunun biyofilm oluşumunu ve T3SS'ni kontrol ettiği ve *P. aeruginosa* patogeneğinde önemli olduğu bulunmuştur. Çalışmalarda HptB hedef genlerinin RetS sinyal yolu ile düzenlendiği sonucuna varılmıştır (83). Yapılan çalışmalarda HptB hedef genleri mutantının hiperbiyofilm fenotipinin *pel* genleri ekspresyonuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (37,61).

Pseudomonas aeruginosa'da biyofilm olgunlaşma ve T3SS'nin düzenlemesinde SadARS sinyal sistemi SadS, SadA, SadR şeklinde 3 proteinden

oluşur. SadARS üç bileşenli sinyal sistemi abiyotik yüzeyde biyofilm olgunlaşmasında ve makrokanalların oluşmasında gerekli olmakla beraber, bu sistem tarafından düzenlenen genler T3SS'ni negatif yönde etkileyip biyofilm oluşumunu artırmaktadır. Yapılan bir çalışmada *sadARS* mutantları olgun biyofilm yapısında eksikliklere yol açtığı gösterilmiştir (84).

c-di-GMP ikincil haberci sinyal molekülü de bu iki virülans faktörünü karşılıklı etkiler. Biyofilm oluşumunun RetS/LadS sinyal yolağı tarafından kontrolü c-di-GMP'ye bağlıdır. c-di-GMP sinyal molekülü T3SS genleri ekspresyonunu azaltır ve biyofilm oluşumunu artırır (37,59,60).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÖRNEKLER

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2018-2019 tarihleri arasında çeşitli kliniklerdeki hastalardan gönderilen kan kültürlerinden *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmış 100 laboratuvar izolatu dahil edildi. Çalışmada her hastaya ait tek bir örnekten bir suş çalışmaya alındı. Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 25/12/2019 tarih ve E.92290 no ile onaylanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşların 50 tanesi yoğun bakım ünitelerinden gönderilen (%50), 50 tanesi (%50) yoğun bakım dışından gönderilip izole edilmiş suşlardı. Çalışmaya dahil edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşları çalışma zamanına kadar uygun koşullarda saklandı. Çalışma anında %5 koyun kanlı besiyerine ekilip 37°C'de inkübe edildi. Gram negatif, oksidaz pozitif, nonfermentatif, aerop, hareketli, karakteristik kokulu suşlar *P. aeruginosa* olarak tanımlandı. (1,4).

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARIN BELİRLENMESİ

Bakterilerin tanımlama işlemleri Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile gerçekleştirildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Phoenix (Becton Dickinson, ABD) sistemi kullanılarak mikrodilüsyon yöntemine göre EUCAST-2019 rehberi doğrultusunda belirlendi (85).

BİYOFİLM OLUŞUMUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Biyofilm oluşumu Kongo Kırmızısı Agar (KKA) ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle değerlendirildi.

Kongo Kırmızısı Agar (KKA) Yöntemi

Kalitatif biyofilm üretimi için KKA yöntemi kullanıldı. KKA 1 litre distile suya 37 gram beyin kalp infüzyon broth, 50 g sükröz, 10 gram agar ve 0,8 gram/L Kongo kırmızısı boyası ile hazırlandı. Kongo kırmızısı boyası solüsyonu konsantre sulu çözelti olarak hazırlanıp diğer bileşenlerden ayrı 121°C de 15 dakika otoklavlandı. Sükröz ile hazırlanan agar 50°C' ye soğutulduğunda Kongo kırmızısı boya solüsyonu besiyerine ilave edildi. Tüm besiyerlerine %5 koyun kanlı agarda üremiş saf kolonilerden inokule edilip aerobik koşulda 37°C de 24 saat inkübe edildi. Kuru kristalimsi kıvamda siyahımsı koloniler pozitif olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* PAO-1 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı (86,87).

Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi

Kantitatif biyofilm aktivitesi için kolorimetrik mikrotitrasyon plağı yöntemi kullanıldı. Örnekler saklanma koşullarından çıkarılıp besiyerlerine pasajlandıktan sonra, bakteriyel koloniler 2 ml'lik cam tüplere dağıtılan %2 beyin kalp infüzyon buyyon besiyerinde, 0,5 Mcfarland bulanıklık ölçüsüne göre bakteriler süspanse edilip 37°C de 24 saat inkübe edildi. Bu çözeltinin 200 µl'si U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına aktarıldı. Negatif kontrol kuyucuklarına 200 µl steril broth aktarıldı. Pozitif kontrol olarak PAO-1 suşu kullanıldı (86-88).

37°C derecede 24 saat inkubasyon sonrasında, mikrotitrasyon plakları ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltıldı. Kuyucuklar iki kez 200 µl fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı. Mikrotitrasyon plakları oda sıcaklığında ters konumda kurutuldu. 15 dakika sonra 200 µl %0.1 kristal viyole (CV) çözeltisi ile boyandı. Boya penetrasyonu için 30 dakika bekleme süresi sonrasında kuyucuklar PBS ile tekrar iki kez yıkandı. 30 dakika kuruma sonrasında 125 µl %30 asetik asit çözeltisi ilave edildi. Deneyler 3 kez tekrar edildi (1,87,89).

Her kuyucuğun optik dansitesi (OD) absorbansı; 590 nm'de ELISA okuyucusu (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, France) ile ölçüldü. Sonuçlar biyofilm yüzdesi şeklinde değerlendirildi. Negatif kontrol olarak bakteri inokule edilmemiş kuyucuğun OD'si (Optik yoğunluk) kullanıldı. OD kesme değeri (ODc), negatif kontrolün OD'si

üzerine negatif kontrolün üç standart sapması eklenmesiyle tanımlandı. [Optik yoğunluk kesme değeri (ODc) = Negatif kontrol ortalama OD+3x standart sapma kontrol (SD)]. Mikrotitrasyon plak testinin sonuçlarına göre, izolatlar optik yoğunluğa dayalı olarak sınıflandırıldı. Biyofilm oluşturmeyen ya da zayıf oluşturan bakteriler ($OD \leq ODc / ODc \leq OD \leq 2xODc$), orta düzeyde biyofilm oluşturan bakteriler ($2xODc < OD \leq 4xODc$), güçlü düzeyde biyofilm oluşturan bakteriler ($4xODc < OD$) olarak değerlendirildi (87).

BİYOFİLMLE İLİŞKİLİ GENLERİN VE TİP-3 SEKRESYON SİSTEMİNE AİT GENLERİN MOLEKÜLER ARAŞTIRILMASI

Çalışmada Kongo kırmızısı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemleriyle biyofilm özellikleri saptanmış 100 izolatın biyofilm oluşumunda sorumlu olduğu düşünülen *pelA*, *pslA*, *ppyR* genleri, ayrıca Tip 3 sekresyon sistemine ait *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri araştırıldı.

Bakteri DNA'sının Elde Edilmesi

Kaynatma Yöntemi

DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı. %5 koyun kanlı agarda bakterilerin 24 saat inkubasyonu sonrası saf kolonilerden Beyin kalp infüzyon broth'a ekim yapıldı. 37°C de 24 saat sonrasında bakteri çözeltisinden 1 ml alınıp ependorf tüpüne aktarıldı. 10 dakikada 13000 rpmde santrifüj sonrasında üstteki sıvı atıldı. Dipteki çözelti üzerine 200 µl distile su ilave edilip 10 dakika kaynatıldı. Tekrar 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilip üstten 150 µl alınarak çözelti kalıp DNA olarak kullanılmak için -20°C saklandı (90).

BİYOFİLMLE İLİŞKİLİ GENLERİN VE TİP-3 SEKRESYON SİSTEMİNE AİT GENLERİN AMPLİFİKASYONU

Biyofilm oluşumundan sorumlu *pslA*, *pelA* ve *ppyR* genlerinin ve biyofilm yapısıyla ilişkili olduğu düşünülen Tip 3 sekresyon sistemine ait, *exoS*, *exoY* ve *exoT*, *exoU* genlerinin mevcudiyeti için DNA amplifikasyonu in house PZR testleri ile yapıldı. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 kullanıldı (2,88,91,92). Negatif

kontrol olarak da steril distile su kullanıldı. Çalışma için bu genlerin değişik bölgelerine uyan önceden tasarlanmış kullanılan oligonükleotid primerler tablo-1’de gösterilmiştir (92,93).

Tablo-1. Biyofilm veya T3SS genleri amplikonları için kullanılan primerler ve gen büyüklükleri

Gen ismi	Primer Adı	Primer Dizisi	Gen büyüklüğü
<i>pslA</i>	Forward	TCCCTA CCTCAGCAGCAAGC	656 bp
	Reverse	TGTTGTAGCCGTAGCGTTTCTG	
<i>pelA</i>	Forward	CATACCTTCAGCCATCCGTTCTTC	786 bp
	Reverse	CGCATTGCCGCACTCAG	
<i>ppyR</i>	Forward	CGTGATCGCCGCCTATTTC	160 bp
	Reverse	ACAGCAGACCTCCCAACCG	
<i>exoS</i>	Forward	GCGAGGTCAGCAGAGTATCG	118 bp
	Reverse	TTCGGCGTCACTGTGGATGC	
<i>exoY</i>	Forward	CGGATTCTATGGCAGGGAGG	289 bp
	Reverse	GCCCTTGATGCACTCGACCA	
<i>exoT</i>	Forward	AATCGCCGTCCAACCTGCATGCG	152 bp
	Reverse	TGTTGCGCCGAGGTACTGCTC	
<i>exoU</i>	Forward	CCGTTGTGGTGCCGTTGAAG	134 bp
	Reverse	CCAGATGTTCAACCGACTCGC	

Geleneksel PZR DNA amplifikasyonu için PZR protokolü için amplifikasyon karışımı 2 ml’lik ependorf tüpünde toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. VitaTaq PZR Master Miks (2X) kiti (dNTP karışımı (Her biri 10 mM) 0.5 µl, TaqDNA Polimeraz (5 U/µL) 0.2 µl, 10X PZR Buffer 5 µl) kullanıldı (Tablo-2).

Tablo-2. PZR Karışımı

İçerik	25 µl Reaksiyon	Final Konsantrasyonu
2X Mastermix	12,5 µl	1X
Primer 1 (10 µM)	0,5 µl	0,1 µM-0,5 µM
Primer 2 (10 µM)	0,5 µl	0,1 µM-0,5 µM
Kalıp DNA	0,5 µl	<1µg
Nükleazsız dH ₂ O	25 µl'ye kadar	

Hazırlanan tüpler termal döngü cihazına (termal cycler, Mycycler, BIORAD, ABD) yerleştirilip *exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*, *pslA*, *pelA*, *ppyR* gen bölgesi amplifikasyonu için belirtilen kaynaklarda daha önce tanımlandığı şekilde uygun program düzenlendi (Tablo-3) (92,93).

Tablo-3. PZR termal döngü

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Zaman
Başlangıç Denatürasyonu	1	94°C	5 dk
Çoğalma	30-35	94°C	30 sn
		T _m -5°C	30 sn
		72°C	1 dk/kb
Son uzama	1	72°C	5 dk
	1	4°C	∞

T_m: Erime Sıcaklığı

Agaroz jel hazırlanışı (%1)

Agarozdan 0,5 gr, 1X TBE'den 50 ml karıştırılıp mikrodalgada eritildikten sonra, 2,5 µl etidyum bromür ile karıştırıldı.

Amplifikasyon ürünleri 100 volt akımda 45 dakika, ethidium bromide ile boyanmış %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Amplifiye DNA'nın molekül ağırlığı 100 bp DNA marker ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *exoS*, *exoY*, *exoU*, *exoT*, *pslA*, *pelA*, *ppyR* gen varlığı açısından uygun büyüklükte bant görülmesi pozitif olarak kabul edildi (92,93) (Tablo-4). Elektroforez sonrası jeller CCD kamera (Gel Logic 2200, KODAK, ABD) ile görüntülenerek fotoğraflandı.

İSTATİKSEL YÖNTEM

Veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Ver. 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programıyla analiz edilmiştir. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Değişkenler arasındaki farklılıklar Pearson Ki-kare testi ve Fisher kesin ki-kare testi ile incelenmiştir. Yöntemler arası incelemeler için McNemar testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan kan kültürlerinden izole edilen toplam 100 suşun 50 tanesi yoğun bakım ünitelerinden (%50), 50 tanesi (%50) yoğun bakım dışından gönderilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerin %48'i anestezi yoğun bakımdan, %20'si dahili yoğun bakımdan, %14'ü çocuk yoğun bakımdan, %18'i diğer yoğun bakımlardan gönderilmiştir. Örneklerin gönderildiği kliniklerin dağılımı tablo-5'de gösterilmiştir. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerin %28'i onkoloji servisinden, %22'si hematoloji servisinden gönderilmiştir (Tablo-4).

Tablo-4. Örneklerin kliniklere göre dağılımı

Örneklerin Gönderildiği Klinikler		Örnek Sayısı (%)
Yoğun Bakım (n:50)	Dahili Yoğun Bakım	10 (20)
	Çocuk Yoğun Bakım	7 (14)
	Anestezi Yoğun Bakım	24 (48)
	Diğer	9 (18)
Yoğun Bakım Dışı (n:50)	Onkoloji Servisi	14 (28)
	Hematoloji Servisi	11 (22)
	Diğer	25 (50)
TOPLAM 100 (100)		

BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

KKA Yöntemi ile Biyofilm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışılan suşların biyofilm oluşturma durumları için yapılan Kongo kırmızısı agar besiyerine ekilen kültürlerin bir gece 37°C inkübasyonu sonrasında kırmızı-siyah koloniler pozitif, pembe-kırmızı koloniler biyofilm negatif kabul edildi.



A

B

C

Şekil-2. Biyofilm oluşumunun Kongo kırmızısı agar yöntemi ile yorumlanması

[A-Biyofilm negatif, B-Biyofilm pozitif, C-Biyofilm pozitif(üst) ve Biyofilm negatif (alt)]

Kongo kırmızısı agar yöntemi ile yapılan biyofilm üretimi değerlendirilmesinde 100 örnekten izole edilen suşların 25 tanesinde (%25) biyofilm oluşumu pozitif bulunurken, 75 tanesi (%75) biyofilm negatif saptandı. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşların 18 tanesi (%36) biyofilm pozitif, 32 tanesi (%64) biyofilm negatif saptandı. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşların 7 (%14) tanesinde biyofilm oluşumu pozitif, 43 tanesi (%86) biyofilm negatif saptandı. Örneklerin gönderildiği kliniklerle biyofilm oluşumu dağılımı tablo-5’de gösterildi.

Tablo-5. Kongo kırmızısı agar (KKA) besiyerinde yoğun bakım ve yoğun bakım dışı gönderilen örneklerden biyofilm pozitif ve negatif örneklerin dağılımı

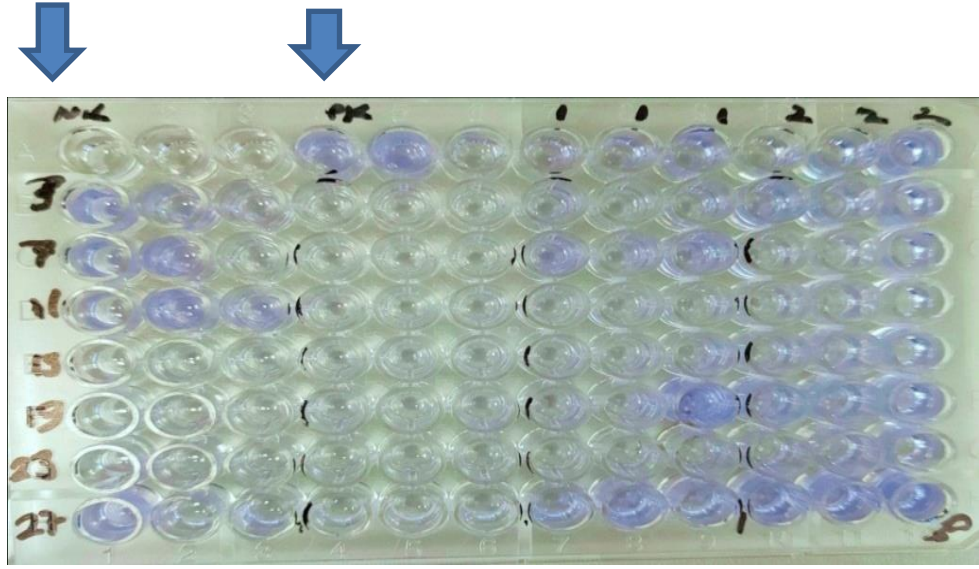
Biyofilm	Örneklerin Gönderildiği Yer			p
	Yoğun bakım	Yoğun bakım dışı	Toplam	
KKA besiyerinde biyofilm oluşumu	n (%)	n (%)	n (%)	0.011
Pozitif	18 (36)	7 (14)	25 (25)	
Negatif	32 (64)	43 (86)	75 (75)	
TOPLAM	50 (100)	50 (100)	100 (100)	

KKA: Kongo kırmızısı agar

Kongo kırmızısı agar besiyerinde biyofilm oluşumu sonuçları dağılımına bakıldığında; yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm oluşumu pozitiflik oranının %36, yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik görülme oranının %14 olduğu görülmüştür. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandığı görülmüştür ($p<0.05$).

Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi ile Biyofilm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Mikrotitrasyon plağı yönteminde 37°C 24 saatlik inkübasyonu takiben yapılan kantitatif biyofilm testinde absorban ölçümü sonrası biyofilm üretimi değerlendirildi.



Şekil-3. Biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plağı yöntemiyle değerlendirilmesi

NK:Negatif Kontrol

PK:Pozitif Kontrol

Biyofilm oluşumunu göstermek için mikrotitrasyon plağı yöntemi ile yapılan çalışmamızda toplam 100 *P. aeruginosa* suşunun, 24 tanesinde (%24) güçlü biyofilm oluşumu, 45 tanesinde (%45) orta derecede biyofilm oluşumu, 31 tanesinde (%31) biyofilm oluşumu negatif tespit edildi. Biyofilm oluşumu şiddetleri tablo-6'da gösterilmiştir. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen suşların biyofilm oluşumuna bakılacak olursa 10 tanesinde (%20) güçlü biyofilm oluşumu, 24 tanesinde (%48) orta derece biyofilm oluşumu, 16 tanesinde (%32) biyofilm oluşumu negatif saptandı. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşların, 14 tanesinde (%28) güçlü biyofilm oluşumu, 21 tanesinde (%42) orta derece biyofilm oluşumu, 15 tanesinde (%30) biyofilm oluşumu negatif saptandı (Tablo-6).

Tablo-6. Biyofilm oluşturma şiddetine göre suşların izole edildiği kliniklerin dağılımı

Biyofilm şiddeti	rneğin Gönderildiği Yer			p
	Yoğun Bakım rnekleri	Yoğun Bakım Dışı rnekler	TOPLAM	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Güçlü pozitif	10 (20)	14 (28)	24 (24)	0.513
Orta derece pozitif	24 (48)	21 (42)	45 (45)	
Negatif	16 (32)	15 (30)	31 (31)	
TOPLAM	50 (100)	50 (100)	100 (100)	

Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki biyofilm oluşumu ile yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki biyofilm şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir($p>0.05$).

Mikrotitrasyon plak yönteminde 100 suşun, 24 tanesinde (%24) güçlü pozitiflik 45 tanesinde (%45) orta derecede pozitiflik bulunurken, kongo kırmızılı besiyeri kullanılan biyofilm testinde suşların 25 (%25) tanesi biyofilm pozitif saptandı. Mikrotitrasyon plak yönteminde 100 suşun 31 (%31) tanesinde biyofilm oluşumu negatif, Kongo kırmızısı agar yönteminde 75 (%75) tanesinde biyofilm oluşumu negatif saptandı. Mikrotitrasyon plak yönteminde 69 tane pozitif suşun kongo kırmızısı agar yönteminde 47 tanesi negatif (%68.1), 22 tanesi pozitif (%31.9) saptandı. Mikrotitrasyon plak yönteminde 31 tane biyofilm negatif suşun, kongo kırmızısı agar yönteminde 28 tanesi negatif (%90.3), 3 tanesi pozitif (%9.7) saptandı. Kan kültüründen izole edilen suşların Kongo kırmızısı agar ve mikrotitrasyon plak yöntemleri ile karşılaştırılmalı sonuçları tablo-7’de gösterilmiştir.

Tablo-7. Biyofilm oluşturan suşların belirlenmesinde Kongo kırmızısı agar yöntemi ile mikrotitrasyon plağı yönteminin karşılaştırılması

Biyofilm Oluşumu		Mikrotitrasyon plak yöntemi		TOPLAM	p
		Pozitif	Negatif		
KKA	Pozitif	22 (%31.9)	3 (%9.7)	25 (%25)	0.018
	Negatif	47 (%68.1)	28 (%90.3)	75 (%75)	
	TOPLAM	69	31	100	

KKA: Kongo kırmızısı agar

Her iki testte de biyofilm oluşumu pozitif olan suş sayısı 22 (%22); her iki testte de biyofilm oluşumu negatif olan suş sayısı 28 (%28)'dir. Mikrotitrasyon plağı yönteminde biyofilm oluşumu pozitif çıkan ancak kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm oluşumu negatif çıkan suş sayısı 47 (%47)'dir. Kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm oluşumu pozitif çıkan ancak mikrotitrasyon plağı yönteminde biyofilm oluşumu negatif çıkan suş sayısı 3 (%3)'dür. Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm ile mikrotitrasyon plak yöntemi arasındaki uyum McNemar testi ile karşılaştırıldığında yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ($p < 0.05$).

ANTİBİYOTİK DİRENCİ İLE BİYOFİLM OLUŞUMU ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının en yüksek antibiyotik direnci %20 oranında seftazidime ve %19 oranında imipeneme karşı görülmüştür ve daha sonra sırasıyla %18 oranında piperasilin-tazobaktam ve %17 oranında sefepime karşı görülmüştür. Örneklerin gönderildiği yere göre suşların antibiyotik direnç oranları tablo-8'de gösterilmiştir.

Tablo-8. Örneklerin gönderildiği yere göre suşların antibiyotik direnç oranları

Antibiyotikler	YB Örnekleri (n=50)	YB Dışı Örnekler (n=50)	TOPLAM (n=100)	p
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	
Sefotaksim	8 (16)	4 (8)	12 (12)	0.218
Seftazidim	13 (26)	7 (14)	20 (20)	0.134
Sefepim	10 (20)	7 (14)	17 (17)	0.424
Piperasilin/Tazobaktam	12 (24)	6 (12)	18 (18)	0.118
Siprofloksasin	6 (12)	6 (12)	12 (12)	-
Amikasin	1 (2)	0 (0)	1 (1)	-
Meropenem	7 (14)	5 (10)	12 (12)	0.538
İmipenem	11 (22)	8 (16)	19 (19)	0.444
Levofloksasin	10 (20)	5 (10)	15 (15)	0.161

YB:Yoğun Bakım

Çalışmaya alınan suşlarda antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Ancak yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda antibiyotik direnç oranının siprofloksasin haricinde yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p>0.05$, Tablo-9).

Biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyan suşlar antibiyotik direnci yönünden karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan grubun sefepim, seftazidim, imipenem, piperasilin-tazobaktam direnci görülme oranlarının biyofilm oluşturmeyan gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ayrıca biyofilm oluşturan grupta siprofloksasin, levofloksasin, meropenem, sefotaksim, gentamisin direnci görülme oranlarının

biyofilm oluşturmeyan gruba göre daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$, Tablo-9).

Tablo-9. Biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan suşlarda antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

Antibiyotikler	Biyofilm Negatif (n=31)	Biyofilm Pozitif (n=69)	TOPLAM	p
	Sayı (%)	Sayı (%)		
Sefepim	3 (9.7)	14 (20.3)	17	0.191
Seftazidim	3 (9.7)	17 (24.6)	20	0.084
Siprofloksasin	5 (16.1)	7 (10.1)	12	0.507
Imipenem	4 (12.9)	15 (21.7)	19	0.298
Levofloksasin	7 (22.6)	8 (11.6)	15	0.224
Meropenem	4 (12.9)	8 (11.6)	12	1
Piperasilin/Tazobaktam	4 (12.9)	14 (20.3)	18	0.374
Sefotaksim	4 (12.9)	8 (11.6)	12	1
Gentamisin	3 (9.7)	3 (4.3)	6	0.371

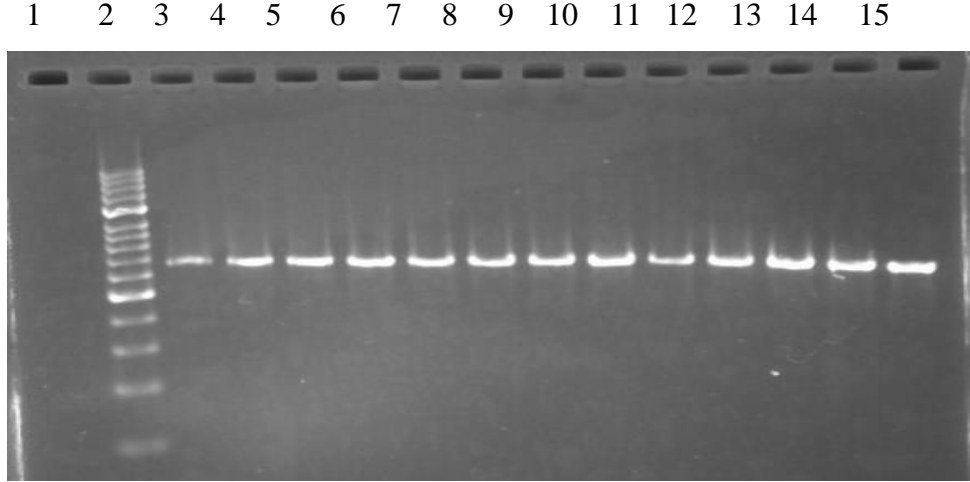
BİYOFİLM İLİŞKİLİ GENLERİN VE TİP-3 SEKRESYON SİSTEMİNE AİT GENLERİN MOLEKÜLER SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada Kongo kırmızısı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemleriyle biyofilm özellikleri saptanmış 100 izolatın biyofilm oluşumunda sorumlu olduğu düşünölen *pslA*, *pelA*, *ppyR* genleri ayrıca Tip 3 sekresyon sistemine ait *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri araştırıldı.

pslA, *pelA* ve *ppyR* Genlerinin Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

pslA Geninin Amplifikasyon Sonuçları

Çalışılan suşların *pslA* genlerinin varlığı şekil-4’de verilmiştir.

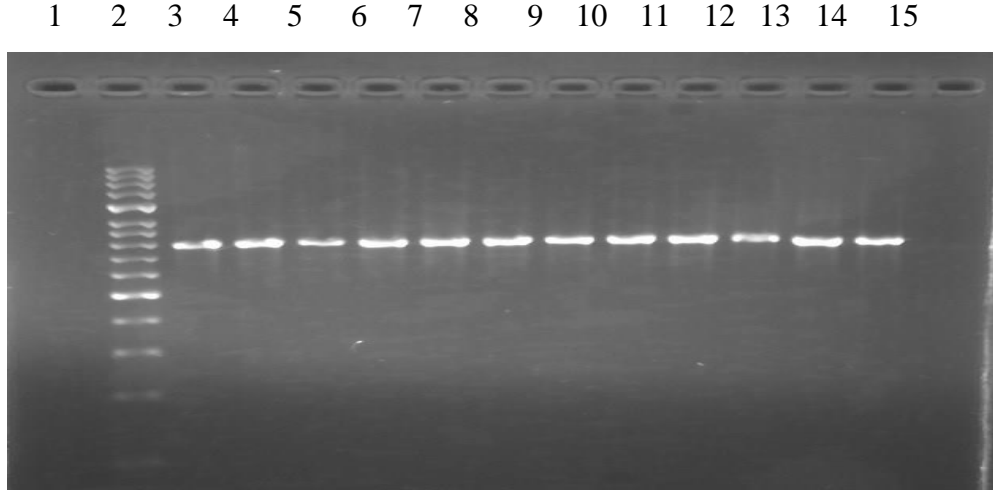


Şekil-4. *pslA* (656 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3.bant; pozitif kontrol PAO-1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 pozitif hasta izolatları)

Çalışmada *pslA* geni varlığı 100 suşun tamamında (%100) 656 bç seviyesinde saptandı.

pelA Geninin Amplifikasyon Sonuçları

pelA genine ait bant 786 bç’de saptandı. Çalışmaya alınan suşların *pelA* genlerinin varlığı şekil-5’de verilmiştir.

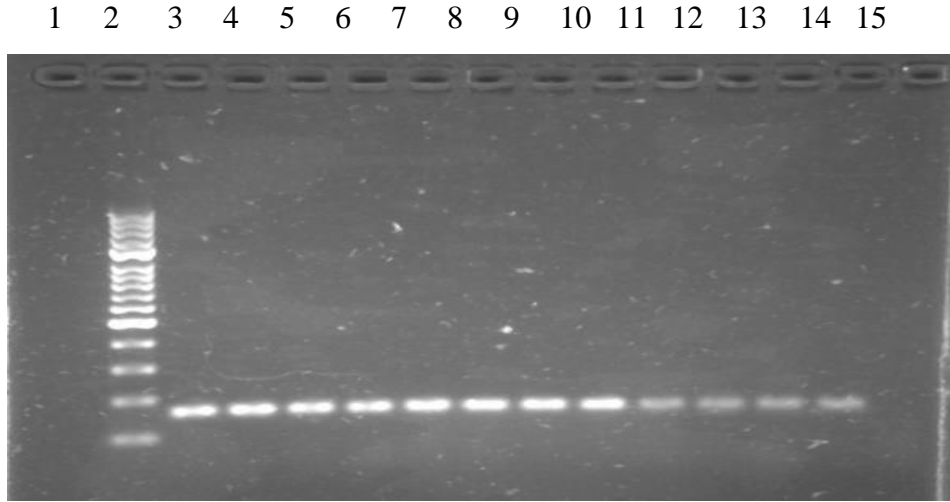


Şekil-5. *pelA* (786 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3.bant pozitif kontrol PAO-1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 pozitif hasta izolatları, 15.bant *pelA* negatif hasta izolatı).

Çalışmada incelenen 100 suştan 99’unda (%99) *pelA* geni 786 bç seviyesinde saptanırken, 1 (%1) suşta *pelA* geni saptanmadı.

***ppyR* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

ppyR genine ait bant 160 bp seviyesinde saptandı. Çalışmaya alınan suşların *ppyR* genlerinin varlığı şekil-6’da verilmiştir.



Şekil-6. *ppyR* (160 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3.bant pozitif kontrol PAO-1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 pozitif hasta izolatları, 15.bant *ppyR* negatif hasta izolatı).

Çalışmada incelenen 100 suştan 99’unda (%99) *ppyR* geni 160 bp seviyesinde saptanırken, 1 (%1) suşta *ppyR* geni saptanmadı.

BIYOFİLM İLİŞKİLİ *pslA*, *pelA*, *ppyR* GENLERİNİN FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLE DEĞERLENDİRİLMESİ

pslA geni pozitif 100 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25), 75 tanesi biyofilm negatif (%75) olarak saptandı. *pelA* geni pozitif 99 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25.3), 74 tanesi biyofilm negatif (%74.7) olarak saptandı. *pelA* geni negatif 1 suş; kongo kırmızısı agar besiyerinde de biyofilm negatif (%74.7) saptandı. *ppyR* geni pozitif 99 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde 25 tanesi pozitif (%25.3), 74 tanesi negatif (%74.7) saptandı. *ppyR* geni negatif 1 suş kongo kırmızısı agar besiyerinde de biyofilm negatif saptandı. Biyofilm oluşumu ile *pslA*, *pelA*, *ppyR* genleri dağılımı tablo-10’da gösterildi.

Tablo-10. *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) suşlarında *pslA*, *pelA* ve *ppyR* genlerinin kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı

	<i>pslA</i>		<i>pelA</i>		<i>ppyR</i>		Toplam
	P	N	P	N	P	N	
Pozitif n (%)	25 (%25)	0	25 (%25.3)	0	25 (%25.3)	0	25
KKA Negatif n (%)	75 (%75)	0	74 (%74.7)	1 (%100)	74 (%74.7)	1 (%100)	75
Toplam	100	0	99	1	99	1	100

P:Pozitif, N:Negatif, KKA:Kongo Kırmızısı Agar

pslA geni pozitif 100 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24), 45 tanesi orta derece pozitif (%45), 31 tanesi negatif (%31) olarak saptandı. *pelA* geni pozitif 99 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24.2), 44 tanesi orta derece pozitif (%44.5), 31 tanesi negatif (%31.3) olarak saptandı. *pelA* geni negatif 1 suşun; mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu orta derece pozitif saptandı. *ppyR* geni pozitif 99 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 23 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%23.2), 45 tanesi orta derece pozitif (%44.5), 31 tanesi negatif (%31.3) olarak saptandı. *ppyR* geni negatif 1 suşun; mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu güçlü pozitif saptandı. *pslA*, *pelA*, *ppyR* genlerinin mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm düzeylerine göre dağılımı tablo-11’de gösterildi.

Tablo-11. *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) suşlarında *pslA*, *pelA* ve *ppyR* genlerinin mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı

	<i>pslA</i>	<i>pslA</i>	<i>pelA</i>	<i>pelA</i>	<i>ppyR</i>	<i>ppyR</i>	Toplam
	P	N	P	N	P	N	
Güçlü pozitif n (%)	24 (%24)	0 (%0)	24 (%24.2)	0 (%0)	23 (%23.2)	1 (%100)	24 (%24)
Orta derece pozitif n (%)	45 (%45)	0 (%0)	44 (%44.5)	1 (%100)	45 (%44.5)	0 (%0)	45 (%45)
Negatif n (%)	31 (%31)	0 (%0)	31 (%31.3)	0 (%0)	31 (%31.3)	0 (%0)	31 (%31)
Toplam	100	0	99	1	99	1	100

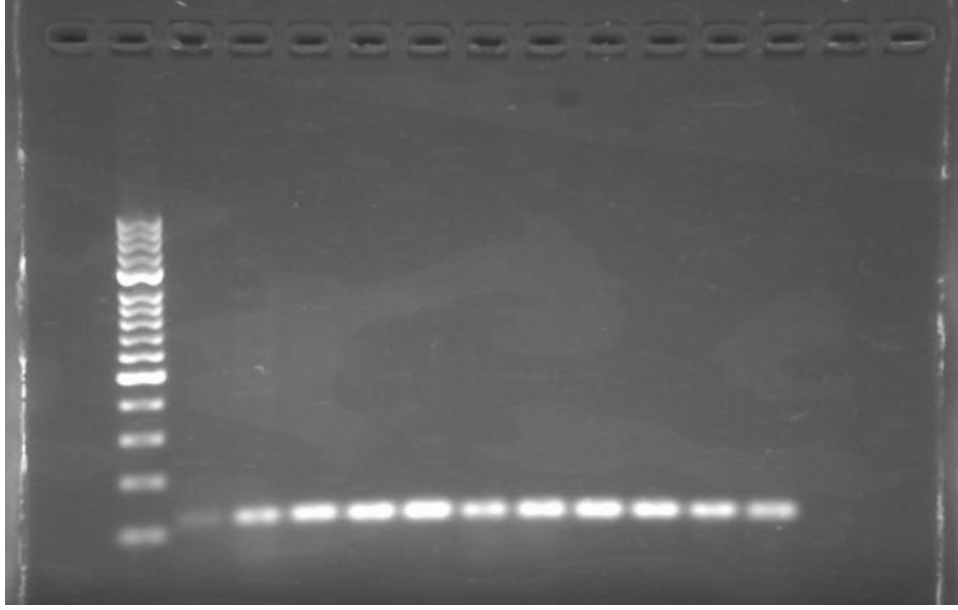
P:Pozitif, N:Negatif

***exoS*, *exoY*, *exoT* ve *exoU* Genlerinin Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

***exoS* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

exoS genine ait bant 118 bç seviyesinde saptandı. Çalışmaya alınan suşların *exoS* genlerinin varlığı şekil-7’de verilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



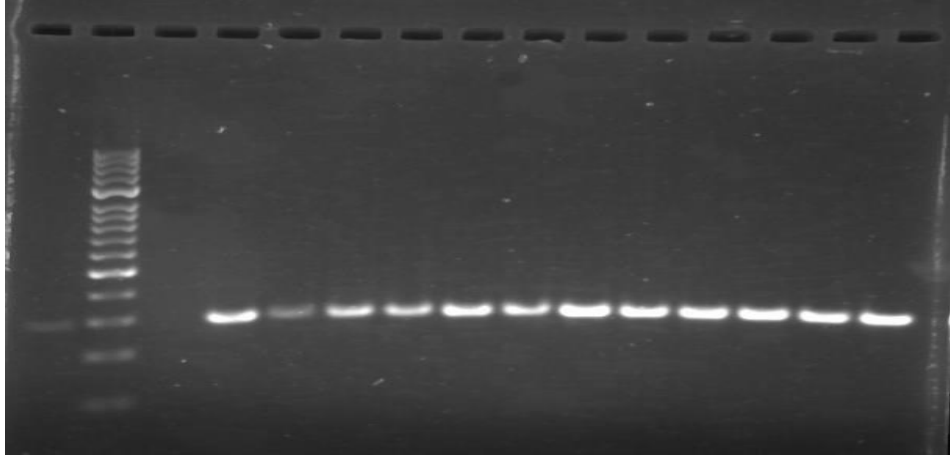
Şekil-7. *exoS* (118 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3.bant pozitif kontrol PAO-1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 pozitif hasta izolatları, 14,15 .bant *exoS* negatif hasta izolatları).

Çalışmada 100 suştan 88'inde (%88) *exoS* geni 118 bç seviyesinde tespit edilirken 12 (%12) suşta *exoS* geni saptanmadı.

***exoY* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

exoY genine ait bant 289 bç seviyesinde saptandı. Çalışmaya alınan suşların *exoY* genlerinin varlığı şekil-8'de verilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



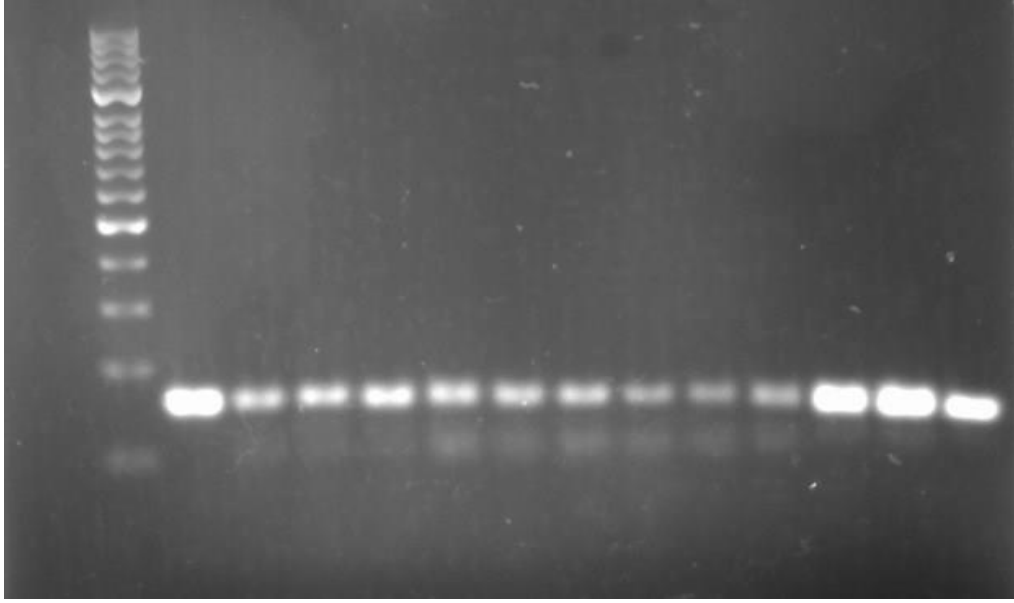
Şekil-8. *exoY* (289 bp) geni araştırılması (1.bant: pozitif kontrol PAO-1; 2.bant: marker; 3.bant; negatif kontrol; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 pozitif hasta izolatları).

Çalışmada *exoY* geni 100 suşun tamamında (%100) 289 bç seviyesinde saptandı.

***exoT* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

exoT genine ait bant 152 bç seviyesinde saptandı. Çalışmaya alınan suşların *exoT* genlerinin varlığı şekil-9'de verilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 . 15



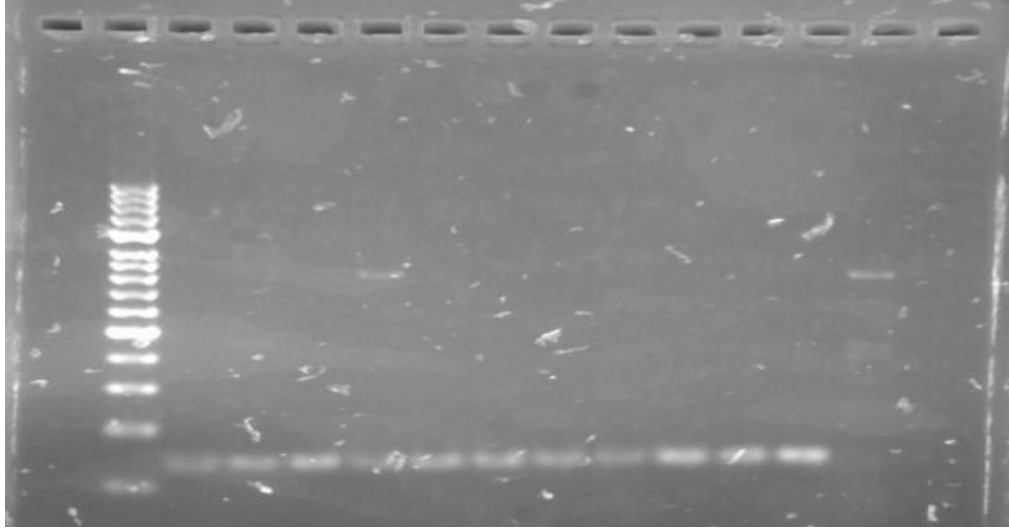
Şekil-9. *exoT* (152 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3.bant; pozitif kontrol PAO-1; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 pozitif hasta izolatları).

Çalışmada *exoT* geni 100 suşun tamamında (%100) 152 bç seviyesinde saptandı.

***exoU* Geninin Amplifikasyon Sonuçları**

exoU genine ait bant 134 bç'de saptandı. Çalışmaya alınan suşların *exoU* genlerinin varlığı şekil-10'de verilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12.. 13...14 15



Şekil-10. *exoU* (134 bp) geni araştırılması (1.bant: negatif kontrol; 2.bant: marker; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 pozitif hasta izolatları; 14, 15 *exoU* negatif hasta izolatları).

Çalışmada 100 suştan 27'sinde (%27) *exoU* geni 134 bp seviyesinde tespit edilirken 73 (%73) suşta *exoU* geni saptanmadı.

TİP-3 SEKRESYON SİSTEMİ *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* GENLERİNİN FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLE DEĞERLENDİRİLMESİ

exoS geni pozitif 88 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde 23 tanesi biyofilm pozitif (%26.1), 65 tanesi biyofilm negatif (%73.9) olarak saptandı. *exoS* geni negatif 12 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde 2 tanesi biyofilm pozitif (%16.7), 10 tanesi biyofilm negatif (%83.3) olarak saptandı. *exoY* ve *exoT* geni pozitif 100 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde 25 tanesi biyofilm pozitif (%25), 75 tanesi biyofilm negatif (%75) olarak saptandı. *exoU* geni pozitif 27 suşun kongo kırmızısı agar besiyerinde 9 tanesi pozitif (%33.3), 18 tanesi negatif (%66.7) saptandı. *exoU* geni negatif 73 suş; kongo kırmızısı agar besiyerinde 16 tanesi biyofilm pozitif (%21.9), 57 tanesi biyofilm negatif (%78.1) olarak saptandı. Biyofilm oluşumu ile *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri dağılımı tablo-12'de gösterildi.

Tablo-12. *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) suşlarında *exoS*, *exoY*, *exoT* ve *exoU* genlerinin kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı

	<i>exoS</i>		<i>exoY</i>		<i>exoT</i>		<i>exoU</i>		Toplam
	P	N	P	N	P	N	P	N	
Pozitif n	23	2	25	0	25	0	9	16	25
%	%26.1	%16.7	%25	0	%25	0	%33.3	%21.9	%100
Negatif n	65	10	75	0	75	0	18	57	75
%	%73.9	%83.3	%75	0	%75	0	%66.7	%78.1	%100
KKA									
p	0.725		-		-		0.242		
TOPLAM	88	12	100	0	100	0	27	73	100

P:Pozitif N:Negatif KKA: Kongo Kırmızısı Agar

Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm oluşumu ile *exoS*, *exoU* genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

exoS geni pozitif 88 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 21 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%23.9), 42 tanesi orta derece pozitif (%47.7), 25 tanesi negatif (%28.4) olarak saptandı. *exoS* geni negatif 12 suşun; mikrotitrasyon plak yönteminde 3 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%25), 3 tanesi orta derece pozitif (%25), 6 tanesi negatif (%50) saptandı. *exoY* ve *exoT* geni pozitif 100 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24), 45 tanesi orta derece pozitif (%45), 31 tanesi negatif (%31) olarak saptandı. *exoU* geni pozitif 27 suşun mikrotitrasyon plak yönteminde; 7 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%25.9), 12 tanesi orta derece pozitif (%44.4), 8 tanesi negatif (%29.6) olarak saptandı. *exoU* geni negatif 73 suşun; mikrotitrasyon plak yönteminde; 17 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%23.3), 33 tanesi orta derece pozitif (%45.2), 23 tanesi negatif (%31.5) olarak

saptandı. *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genlerinin mikrotitrasyon plağı yöntemi ile biyofilm düzeylerine göre dağılımı tablo-13’de gösterildi. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile *exoS* ve *exoU* dağılımı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo-13. *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) suşlarında *exoS*, *exoY*, *exoT* ve *exoU* genlerinin mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm düzeylerine göre dağılımı

	<i>exoS</i>		<i>exoY</i>		<i>exoT</i>		<i>exoU</i>		Toplam	
	P	N	P	N	P	N	P	N		
GP n	21	3	24	0	24	0	7	17	24	
%	%23.9	%25	%24	%0	%24	%0	%25.9	%23.3		
OP n	42	3	45	0	45	0	12	33	45	
%	%47.7	%25	%45	%0	%45	%0	%44.4	%45.2		
Mikrotitrasyon on Plak Yöntemi	N	25	6	31	0	31	0	8	23	31
n	%	%28.4	%50	%31	%0	%31	%0	%29.6	%31.5	
p	0.247		-		-		0.96			
Toplam	88	12	100	0	100	0	27	73	100	

GP: Güçlü pozitif, OP:Orta derece pozitif, P:Pozitif, N:Negatif

T3SS *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* Genlerinin Biyofilm Oluşumunda Rol Aldığı Düşünülen *pslA*, *pelA*, *ppyR* Genleriyle Karşılaştırılması

exoS, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri ve *pslA* geninin dağılımına bakıldığında *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri pozitif olanlarda *pslA* incelemelerinin de pozitif olduğu ayrıca *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri negatif olanlarda da *pslA* incelemelerinin pozitif olduğu görülmüştür.

exoS, *exoY*, *exoT* ve *exoU* genleri ve *pelA* geninin dağılımına bakıldığında, *exoS* pozitif olanlarda *pelA* incelemelerinin de pozitif olduğu ayrıca *exoS* negatif olanlarda *pelA* sadece 1 tane negatif olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). *exoY* ve *exoT* pozitif olanlarda *pelA* sadece 1 tane negatif olduğu, *exoY* ve *exoT* negatif olanlarda *pelA* incelemelerinin de negatif olduğu görülmüştür. *exoU* pozitif olanlarda *pelA* incelemelerinin de pozitif olduğu ayrıca *exoU* negatif olanlarda *pelA* sadece 1 tane negatif olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

exoS, *exoY*, *exoT*, *exoU* genleri ve *ppyR* geninin dağılımına bakıldığında, *exoS* pozitif olanlarda *ppyR* incelemelerinde sadece 1 tane negatif olduğu ayrıca *exoS* negatif olanlarda *ppyR*'nin tümünün pozitif olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). *exoY* ve *exoT* pozitif olanlarda *ppyR* incelemelerinde sadece 1 tane negatif olduğu ayrıca *exoY* ve *exoT* negatif olanlarda *ppyR*'de tümünün pozitif olduğu görülmüştür. *exoU* pozitif olanlarda *ppyR* incelemelerinde sadece 1 tane negatif olduğu ayrıca *exoU* negatif olanlarda *ppyR*'nin tümünün pozitif olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$, Tablo-14).

Tablo-14. *Pseudomonas aeruginosa* (n=100) suşlarında *exoS*, *exoY*, *exoT* ve *exoU* genlerinin *pslA*, *pelA* ve *ppyR* genleriyle karşılaştırılması

	<i>exoS</i>		<i>exoY</i>		<i>exoT</i>		<i>exoU</i>		Toplam	
	P	N	P	N	P	N	P	N		
<i>pslA</i>	P n	88	12	100	0	100	0	27	73	100
	%	%100	%100	%100	%0	%100	%0	%100	%100	
	N n	0	0	0	0	0	0	0	0	
	%	%0	%0	%0	%0	%0	%0	%0	%0	
	p	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>pelA</i>	P n	88	11	99	0	99	0	27	72	99
	%	%100	%91.7	%99	%0	%99	%0	%100	%98.6	
	N n	0	1	1	0	1	0	0	1	
	%	%0	%8	%1	%0	%1	%0	%0	%1.4	
	p	0.12	-	-	-	-	1	-	-	
<i>ppyR</i>	P n	87	12	99	0	99	0	26	73	99
	%	%98.9	%100	%99	%0	%99	%0	%96.3	%100	
	N n	1	0	1	0	1	0	1	0	
	%	%1.1	%0	%1	%0	%1	%0	%3.7	%0	
	p	1	-	-	-	-	0.27	-	-	
Toplam		88	12	100	0	100	0	27	73	

P:Pozitif, N:Negatif

ANTİBİYOTİK DİRENCİ İLE BİYOFİLM GENLERİNİN VARLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI

pslA geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo-16 'da gösterilmiştir. *pslA* geni pozitif suşlarda antibiyotik dirençleri gen negatif suş sayısı az olması sebebiyle tüm suşların antibiyotik sonuçlarına benzer şekilde en yüksek direnç oranı seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. En düşük antibiyotik direnç oranı gentamisinde (%6) görülmüştür (Tablo-15).

pelA geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo 16'da gösterilmiştir. *pelA* geni pozitif suşlarda suşlarda antibiyotik dirençleri gen negatif suş sayısı az olması sebebiyle tüm suşların antibiyotik sonuçlarına benzer şekilde en yüksek direnç oranı seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. En düşük antibiyotik direnç oranı gentamisinde (%6) görülmüştür. Yapılan karşılaştırmalarda ise *pelA* genindeki pozitiflik durumlarına göre antibiyotik direnç dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). *pelA* negatif olan bir suшта hiçbir antibiyotiğe karşı direnç görülmemiştir (Tablo-15).

ppyR geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo 16'da gösterilmiştir. *ppyR* geni pozitif suşlarda suşlarda antibiyotik dirençleri gen negatif suş sayısı az olması sebebiyle tüm suşların antibiyotik sonuçlarına benzer şekilde en yüksek direnç oranı seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. En düşük antibiyotik direnç oranı gentamisinde (%6) görülmüştür. Yapılan karşılaştırmalarda ise *ppyR* genindeki pozitiflik durumlarına göre antibiyotik direnç dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). *ppyR* negatif olan bir suшта hiçbir antibiyotiğe karşı direnç görülmemiştir (Tablo-15).

Tablo-15. Antibiyotik direnci ile biyofilm genlerinin karşılaştırılması

		<i>pslA</i>		<i>pelA</i>		<i>ppyR</i>	
		P	N	P	N	P	N
Sefepim	S	83 (%83)	-	82 (%82.8)	1 (%100)	82 (%82.8)	1 (%100)
	R	17 (%17)	-	17 (%17.2)	0 (%0)	17 (%17.2)	0 (%0)
Seftazidim	S	80 (%80)	-	79 (%79.8)	1 (%100)	79 (%79.8)	1 (%100)
	R	20 (%20)	-	20 (%20.2)	0 (%0)	20 (%20.2)	0 (%0)
Siprofloksasin	S	88 (%88)	-	87 (%87.9)	1 (%100)	87 (%87.9)	1 (%100)
	R	12 (%12)	-	12 (%12.1)	0 (%0)	12 (%12.1)	0 (%0)
İmipenem	S	81 (%81)	-	80 (%80.8)	1 (%100)	80 (%80.8)	1 (%100)
	R	19 (%19)	-	19 (%19.2)	0 (%0)	19 (%19.2)	0 (%0)
Levofloksasin	S	85 (%85)	-	84 (%84.8)	1 (%100)	85 (%85.9)	0 (%0)
	R	15 (%15)	-	15 (%15.2)	0 (%0)	14 (%14.1)	1 (%100)
Meropenem	S	88 (%88)	-	87 (%87.9)	1 (%100)	87 (%87.9)	1 (%100)
	R	12 (%12)	-	12 (%12.1)	0 (%0)	12 (%12.1)	0 (%0)
Piperasilin/ Tazobaktam	S	82 (%82)	-	81 (%81.8)	1 (%100)	81 (%81.8)	1 (%100)
	R	18 (%18)	-	18 (%18.2)	0 (%0)	18 (%18.2)	0 (%0)
Sefotaksim	S	88 (%88)	-	87 (%87.9)	1 (%100)	87 (%87.9)	1 (%100)
	R	12 (%12)	-	12 (%12.1)	0 (%0)	12 (%12.1)	0 (%0)
Gentamisin	S	94 (%94)	-	93 (%93.9)	1 (%100)	93 (%93.9)	1 (%100)
	R	6 (%6)	-	6 (%6.1)	0 (%0)	6 (%6.1)	0 (%0)

P:Pozitif, N:Negatif, S:Duyarlı, R:Dirençli

ANTİBİYOTİK DİRENCİ İLE T3SS GENLERİNİN VARLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI

exoS geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo- 16'de gösterilmiştir. *exoS* pozitif olan suşlarda antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında; sefepimde %17, seftazidimde %18.2, siprofloksasinde %9.1, imipenemde %20.5, levofloksasinde %14.8, meropenemde %12.5, piperasilin-tazobaktamda %17, sefotaksiminde %13.6 ve gentamisinde %5.7'dir. *exoS* negatif olan suşlarda ise antibiyotik direnç oranı sefepimde %16.7, seftazidimde %33.3, siprofloksasinde %33.3, imipenemde %8.3, levofloksasinde %16.7, meropenemde %8.3, piperasilin-tazobaktamda %25, sefotaksiminde %0 ve gentamisinde %8.3'tür. *exoS* genotipi ile siprofloksasin dışında antibiyotik direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak *exoS* pozitiflerde sefepim, imipenem, meropenem ve sefotaksim direnci negatiflere göre daha yüksek bulunmuştur. *exoS* negatif hastalarda siprofloksasin direnci pozitiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo-16).

exoY ve *exoT* geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo 17'de gösterilmiştir. *exoY* ve *exoT* en yüksek direnç oranı seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. En düşük antibiyotik direnç oranı gentamisinde (%6) görülmüştür.

exoU geninin varlığı ve antibiyotik dirençleri tablo 17'de gösterilmiştir. *exoU* pozitif olan suşlarda antibiyotik direnç oranlarına bakıldığında; sefepimde %25.9, seftazidimde %25.9, siprofloksasinde %22.2, imipenemde %22.2, levofloksasinde %29.6, meropenemde %18.5, piperasilin-tazobaktamda %29.6, sefotaksiminde %11.1 ve gentamisinde %11.1'dir. *exoU* negatif olan suşlarda ise antibiyotik direnç oranı sefepimde %13.7, seftazidimde %17.8, siprofloksasinde %8.2, imipenemde %17.8, levofloksasinde %9.6, meropenemde %9.6, piperasilin-tazobaktamda %13.7, sefotaksiminde %12.3 ve gentamisinde %4.1'dir. *exoU* genotipi ile levofloksasin dışında antibiyotik direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak *exoU* pozitiflerde, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, meropenem, piperasilin-tazobaktam ve gentamisin direnci negatiflere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada *exoU* pozitif hastalarda levofloksasin

direnci negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05, Tablo-16).

Tablo-16. Antibiyotik direnci ile T3SS genleri karşılaştırılması

		<i>exoS</i>		p	<i>exoY</i>		<i>exoT</i>		<i>exoU</i>		p
		P	N		P	N	P	N	P	N	
Sefepim	S	73 (%83)	10 (%83,3)	1	83 (%83)	-	83 (%83)	-	20 (%74,1)	63 (%86,3)	0.228
	R	15 (%17)	2 (%16,7)		17 (%17)	-	17 (%17)	-	7 (%25,9)	10 (%13,7)	
Seftazidim	S	72 (%81,8)	8 (%66,7)	0.251	80 (%80)	-	80 (%80)	-	20 (%74,1)	60 (%82,2)	0.368
	R	16 (%18,2)	4 (%33,3)		20 (%20)	-	20 (%20)	-	7 (%25,9)	13 (%17,8)	
Siprofloksasin	S	80 (%90,9)	8 (%66,7)	0.036*	88 (%88)	-	88 (%88)	-	21 (%77,8)	67 (%91,8)	0.081
	R	8 (%9,1)	4 (%33,3)		12 (%12)	-	12 (%12)	-	6 (%22,2)	6 (%8,2)	
İmipenem	S	70 (%79,5)	11 (%91,7)	0.454	81 (%81)	-	81 (%81)	-	21 (%77,8)	60 (%82,2)	0.774
	R	18 (%20,5)	1 (%8,3)		19 (%19)	-	19 (%19)	-	6 (%22,2)	13 (%17,8)	
Levofloksasin	S	75 (%85,2)	10 (%83,3)	1	85 (%85)	-	85 (%85)	-	19 (%70,4)	66 (%90,4)	0.024*
	R	13 (%14,8)	2 (%16,7)		15 (%15)	-	15 (%15)	-	8 (%29,6)	7 (%9,6)	
Meropenem	S	77 (%87,5)	11 (%91,7)	1	88 (%88)	-	88 (%88)	-	22 (%81,5)	66 (%90,4)	0.297
	R	11 (%12,5)	1 (%8,3)		12 (%12)	-	12 (%12)	-	5 (%18,5)	7 (%9,6)	
Piperasilin/ Tazobaktam	S	73 (%83)	9 (%75)	0.448	82 (%82)	-	82 (%82)	-	19 (%70,4)	63 (%86,3)	0.082
	R	15 (%17)	3 (%25)		18 (%18)	-	18 (%18)	-	8 (%29,6)	10 (%13,7)	
Sefotaksim	S	76 (%86,4)	12 (%100)	0.351	88 (%88)	-	88 (%88)	-	24 (%88,9)	64 (%87,7)	1
	R	12 (%13,6)	0 (%0)		12 (%12)	-	12 (%12)	-	3 (%11,1)	9 (%12,3)	
Gentamisin	S	83 (%94,3)	11 (%91,7)	0.545	94 (%94)	-	94 (%94)	-	24 (%88,9)	70 (%95,9)	0.339
	R	5 (%5,7)	1 (%8,3)		6 (%6)	-	6 (%6)	-	3 (%11,1)	3 (%4,1)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık, P:Pozitif, N:Negatif, S:Duyarlı, R:Direnci

TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa fırsatçı bir patojen olarak endokardit, ventilatöre bağlı solunum sistemi enfeksiyonları, bakteriyemi, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi çok çeşitli enfeksiyonlara yol açar (7,9). Hastanede yatan ağır yanıklı, HIV enfeksiyonlu, maligniteli ve immunitesi yetersiz riskli hastalarda enfeksiyonlar ciddi seyreder (1,7,9).

Pseudomonas aeruginosa'ya karşı oluşan immün yanıtta çeşitli virülans faktörleri etkilidir. Bu bakteriye ait virülans faktörleri arasında toksinler, enzimler, piyosiyenin, piyoverdin, flagella, pili ve biyofilm sayılabilir. Biyofilm patojenitede önemli virülans faktörlerindendir. *P. aeruginosa* biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm yapısını oluşturur (4,9). Biyofilm oluşumu kronik bakteriyel enfeksiyonlara ortam hazırlayıp, antimikrobiyal tedavilerde zorluğa yol açar (1,4,9,94-95).

Tıbbi cihazlar mikroorganizmaların tutunması, kolonileşmesi, biyofilm yapısının oluşturulması için uygun ortamlar yaratır. Özellikle biyofilmle ilişkili tıbbi cihazlar protez kalp kapakçıkları, idrar kateterleri, intrauterin cihazlar, vasküler kateterler, prostetik kalp kapakçıklarıdır (5). Bu abiyotik cihazlar konak proteinleriyle kaplanıp bakterinin tutunmasına katkı sağlayabilir. Daha sonra bakteriler dağılıp enfeksiyona yol açabilirler. Özellikle kateterler kan dolaşımına temas ettiği için trombosit, albümin, plazma ve fibronektin gibi doku proteinleriyle kaplanarak biyofilmlere zemin hazırlar. *P. aeruginosa* biyofilm oluşturarak riskli özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda ağır septisemilerden sorumlu tutulmuştur (5). Biyofilmler ekzopolisakkarit matriksinde mikroorganizmalar kompleks şekilde toplanınca parçalanması zor hale gelir. Biyofilm oluşumunda; substrat etkileri, ortam özellikleri ve hücre yüzeyinin özellikleri gibi faktörler önemlidir (31).

Pseudomonas aeruginosa'da Tip 3 sekresyon sistemi bazı virülans faktörlerinin kontrolünde rol alır. T3SS biyofilm ile ilgili oluşumlarla ilişkilidir. T3SS ile ilgili genler özellikle biyofilm yapısında önemli olan *pel*, *psl* genleri ile bağlantılıdır (66). T3SS molekülleri bakteriyemilerde tespit edildiği gibi *P. aeruginosa* biyofilm oluşturan izolatlarda tespit edilmiştir (4).

Pseudomonas aeruginosa ve biyofilm ile ilgili yapılan pek çok çalışma vardır. Biyofilmi saptamak için mikrotitrasyon plak yöntemi, kongo kırmızısı agar yöntemi, tüp yöntemi, biyoluminesans yöntemi, piezoelektrik sensör ve floresan mikroskopik inceleme gibi çeşitli yöntemler vardır (86,87,96,97). Bizim çalışmamızda biyofilm oluşumu kongo kırmızısı agar ve mikrotitrasyon plak yöntemi ile belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda Kongo kırmızısı agar besiyerinde yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki biyofilm oluşumu pozitiflik oranının %36, yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının %14 olduğu görülmüştür. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandığı görülmüştür ($p<0.05$, tablo-5).

Çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşların mikrotitrasyon plak yöntemi kullanıldığında biyofilm oluşum oranları; %20 güçlü pozitif, %48 orta derece pozitif toplam % 68 pozitif, yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda ise; %28 güçlü pozitif, %42 orta derece pozitif olmak üzere % 70 pozitif saptandı. Duyarlılığı daha yüksek olarak kabul edilen mikrotitrasyon plağı yöntemi dikkate alındığında özellikle yoğun bakımdan izole edilen örneklerde biyofilm oluşturma oranının yüksek bulunmasının (Tablo-6) *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı bakteriyemilerde biyofilm oluşumunun etkili olabileceğini düşündürmüştür (87).

Hassan ve ark. (87) 2010 yılında Pakistan'da çeşitli kliniklerden gönderilen 110 klinik izolatta mikrotitrasyon plak yöntemiyle %22.7 güçlü biyofilm oluşumu, %41 orta derecede biyofilm oluşumu, %36.3 zayıf biyofilm ya da biyofilm negatif saptamışlardır. Kongo kırmızısı agar yöntemiyle izolatlarda %3.6 güçlü, %6.3 orta, %90 zayıf ya da biyofilm negatif tespit etmişlerdir. Biyofilm oluşturan izolatlarda antibiyotik direnci yüksek saptamışlardır. Mikrotitrasyon plak yöntemini altın standart kabul edip, kongo kırmızısı agar yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Kongo

kırmızısı agar yöntemi ile duyarlılığı %11, özgülüğü %92 saptamışlardır. Mikrotitrasyon plak yönteminin biyofilm oluşumunu saptamada kongo kırmızısı agar yöntemine göre kantitatif ve güvenilir olduğunu tespit etmişlerdir.

Perez ve ark. (86) 2011 yılında 74 *P. aeruginosa* suşunun biyofilm oluşturma oranlarını kristal viyole boyası kullanılarak mikrotitrasyon plak yöntemiyle ölçmüşlerdir. Kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (biyofilm oluşturan) suşu kullanmışlardır. Suşların tamamı PAO-1'e göre kuvvetli biyofilm oluşturmamış, 50 tanesi PAO-1'e göre orta ve düşük düzeyde biyofilm oluşturmuştur. Deka ve ark'nın (96) Hindistanda 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada; 100 klinik izolattan biyofilm oluşumunu belirlemek için mikrotitrasyon plak yöntemi, Kongo kırmızısı agar yöntemi çalışılmıştır. 100 suştan 83 (%83) tanesi mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu pozitif, 17 (%17) tanesi zayıf ya da biyofilm oluşumu olmayan şekilde saptanmıştır. Kongo kırmızısı agar yönteminde ise izolatların %20'sinde biyofilm oluşumu pozitif, %80 zayıf ya da biyofilm oluşumu negatif saptanmıştır. Bu çalışmada kongo kırmızısı agar yönteminde mikrotitrasyon plak yöntemine göre yanlış pozitiflikler bulunmuştur (96). Azeredo ve arkadaşları (97) 2016 yılında; kongo kırmızısı agar yönteminin biyofilm oluşumunda tarama yöntemi olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Lima ve ark. (98) Brezilya'da 2017 yılında 20 pnömonili hastadan izole edilen *P. aeruginosa*'da Kongo kırmızı agar testinde, *P. aeruginosa* izolatlarının %15'inde biyofilm oluşumu pozitif, mikrotitrasyon plak yönteminde %75 biyofilm oluşumu saptamışlardır. Abdel Halim ve ark. (99) 2018 yılında biyofilm saptama yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada mikrotitrasyon plak yöntemi altın standart yöntemi olarak kabul edilmiştir. Kongo kırmızısı agar yöntemi, fenotipik bir yöntem olarak uygulanması kolay ve hızlı olmakla beraber biyofilm oluşturanların %1.3' ünü saptamıştır. Samad ve ark. (100). 2019 yılında Pakistan'da çevresel ve klinik toplam; 50 *P. aeruginosa* izolatında kongo kırmızısı agar testinde biyofilm oluşumunu 7 (%14), mikrotitrasyon plak testinde 30 (%60) pozitif bulmuşlardır. Mikrotitrasyon plak testinin biyofilm oluşumu saptamada kongo kırmızısı agar yöntemine göre kantitatif ve güvenilir bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda biyofilm oluşumunun tespitinde mikrotitrasyon plağı yöntemi ile Kongo kırmızısı agar yöntemi karşılaştırdığımızda; mikrotitrasyon plağı yönteminde 100 suşun 24 tanesinde (%24) güçlü pozitiflik, 45 tanesinde (%45) orta derecede pozitiflik toplamda 69 izolatta (%69) pozitiflik, kongo kırmızısı agar besiyerinde ise 25 izolatta (%25) pozitiflik saptanmıştır. Mikrotitrasyon plak yönteminde 69 tane pozitif izolatin kongo kırmızısı agar yönteminde 47 tanesi negatif (%68.1), 22 tanesi pozitif (%31.9) saptanmıştır ve sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (86,87,96,98,100). Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm ile mikrotitrasyon plak yöntemi arasındaki uyum McNemar testi ile karşılaştırıldığında yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ($p < 0.05$, tablo-7). Mikrotitrasyon plak yönteminde kongo kırmızısı agar yöntemine göre biyofilm pozitiflik oranının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandığı görülmüştür ($p < 0.05$, tablo-7). Kongo kırmızısı agar besiyerinde biyofilm oluşumu pozitif belirlenen 3 izolatin mikrotitrasyon plağı yönteminde biyofilm oluşumunun gösterilememesi koloni morfolojisindeki farklılıktan kaynaklanabilmektedir (101). Koloni morfolojisindeki değerlendirmeye bağlı farklı sonuçlara yol açmaması, kantitatif değerlendirme gibi avantajlar sebebiyle mikrotitrasyon plak yöntemi üstün kabul edilmiştir. Dezavantajı, biyofilm oluşumu oranının kullanılan besiyeri içindeki glikoz miktarı ve çevresel koşullar (ortam ısısı, ph) olarak değerlendirilmiştir. Ammendolia ve ark. (102) 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada Triptik Soy Broth içerisine karbonhidrat kaynağı olarak glukoz ilavesiyle biyofilm üretiminde dramatik bir artış olduğunu bildirmiştir.

She ve ark'nın (103) 2019 yılında Çin'de ekzojen glikozun *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu üzerine etkilerini incelediği bir çalışmada; %2 ve %4 glukoz ve glukoz ilavesiz biyofilm testleri yapılması sonucunda glukozun ekzopolisakkarit matriksi güçlendirip biyofilm oluşumunu artırdığını saptamıştır.

Pseudomonas aeruginosa'daki biyofilmin yapısı hastanede yatan özellikle yoğun bakım ünitesindeki hastaların bozulmuş immun sistemiyle, hastalıkların şiddetiyle, tıbbi cihazlarla, cerrahi girişimlerle anatomik bariyerlerin hasar görmesiyle kan dolaşımı enfeksiyonlarına zemin hazırlar. Ayrıca sterilizasyona

dikkat edilmemesi, kateter varsa yerleşim yeri, o bölgede kolonizasyon ve önceden antibiyotik kullanımı ilave risk faktörlerindedir. Bu risk faktörleriyle hastalıklar tekrar etmekte tedaviye dirençte artmaktadır. Bakteriyemi oluştursa hastalarda tedavi daha da zorlaşır (104).

Pseudomonas aeruginosa'nın pek çok antibiyotik sınıfına karşı doğal dirençli olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları antistafilokokal penisilinler, ampisilin-sulbaktam, ampisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asit, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim ve trimetoprim-sülfametaksazoldür (105).

Çalışmamızda *P. aeruginosa* suşlarının en yüksek antibiyotik direnci %20 oranında seftazidime ve %19 oranında imipeneme karşı görülmüştür ve daha sonra sırasıyla %18 oranında piperasilin-tazobaktam ve %17 oranında sefepime karşı görülmüştür (tablo-8). Bir araştırmada Türkiye'de son 11 yılda kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da antibiyotik direnç oranlarının meta analizi yapılmıştır (106). Bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılan meropenem ve piperasilin-tazobaktama karşı direnç oranları önemli ölçüde artmışken siprofloksasin, amikasin ve gentamisin direnç oranlarında azalma olmuştur.

Flamm ve ark. (107) 2004 yılında Amerika'da *P. aeruginosa* izolatlarında çoklu antibiyotik direncini yoğun bakımda yatan hastalarda yoğun bakım ünitesinde olmayan hastalara göre daha yüksek ve istatistiksel oranda anlamlı bulmuşlardır. Pachori ve ark. (108) 2019 yılında Hindistan'da yoğun bakımlardan gönderilen kan örneklerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarında beta laktam grubu, aminoglikozid ve florokinolon grubu antibiyotiklere direncinden bahsetmişlerdir.

Çalışmamıza alınan suşlarda antibiyotik direnç oranları karşılaştırıldığında yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, tablo-8). Ancak yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda siprofloksasin

haricinde antibiyotik direnç oranının yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Klinik olarak anlamlı olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyumludur (107,108). Bu çalışmada yoğun bakım hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında direncin daha fazla olmasının nedeninin çoklu ilaç kullanımı olduğu düşünülmüştür.

Biyofilmler tıbbi cihazlarda kalıcı kronik enfeksiyonların sebebi olarak görülmektedir. Kronik yaralar, idrar yolu enfeksiyonları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kistik fibroz, kateter enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları gibi hastalıklarla ilişkilidir. Bu kadar çeşitli enfeksiyona yol açma sebebi; biyofilm oluşturan *P. aeruginosa*'nın konak immun sistemini, antibiyotikleri tolere edebilmesidir. Bu durum biyofilm ilişkili enfeksiyonların tekrarlamasına yol açmaktadır. Antibiyotiklerin çoğu biyofilmleri yok etmemekle beraber inhibe edebilirler. Tedavide erken oluşumlu biyofilmler geç oluşumlu biyofilmlere göre antibiyotiklere daha duyarlıdır. Bu sebeplerden tedavide zamanlama önemlidir (109).

Bizim çalışmamızda biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen suşlar antibiyotik direnci yönünden karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan grubun seftazidim, imipenem, piperasilin-tazobaktam direnci görülme oranlarının biyofilm oluşturmeyan gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$, Tablo-9).

Jeong ve ark. (110) 2014 yılında Kore'de yaptığı bir çalışmada bakteriyemisi olan 242 hastanın 63'ünde karbapenem dirençli *P. aeruginosa* tespit etmişlerdir. Karbapenem dirençli suşlarda biyofilm oluşturma miktarı anlamlı şekilde karbapenem duyarlı suşlardan daha yüksek bildirmişlerdir. Banar ve ark. (111) 2016 yılında yanık yaralarından izole edilen biyofilm oluşturan *P. aeruginosa*'da seftazidimde direnç saptarlarken, Hemati ve ark. (112) benzer şekilde 2014 yılında biyofilm oluşturanlarda seftazidime direnç bulunmuştur. Zaranza ve ark. (113) 2013

yılında biyofilm oluşturan bakterilerin konak immün sisteminden ve antibiyotiklerin hedefi olmaktan korunduğunu savunmuşlardır.

Mirzahosseini H. ve ark'nın (8) 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada; *P. aeruginosa*'nın biyofilm ilişkili antibiyotik direncinde en yüksek direnç %90 ile piperasilin/tazobaktamda, en düşük direnç %2.4 ile kolistinde bildirilmiştir. Bu meta analiz çalışmasında biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasında anlamlı ilişki olduğu bulunmuş ve biyofimlerin enfeksiyonların kronikleşmesinde rol oynadığı düşünülmüştür.

Biyofilmler yapısı gereği antibiyotikler, dezenfektanlar gibi antimikrobik maddelere karşı dirence sebep olurlar. Bu durumdan sorumlu tutulan bazı mekanizmalara; biyofilm yapısının antimikrobiyal maddelere karşı penetrasyonunu geciktirmek, biyofilmin organizmaların büyüme hızında değişimlere yol açması örnek verilebilir. Antimikrobiyal maddelerin biyofilmle çevrelenmiş hücreleri inhibe etmesi için biyofilm matriksi içinden yayılarak geçmesi gerekmektedir. Biyofilm yapısını oluşturan polimerik yapı biyofilm iç kısmına yayılmayı, antimikrobiyal maddeyle matriks reaksiyonuna etki ederek penetrasyonu sınırlar. Ayrıca biyofilmle alakalı hücreler planktonik hücrelerden daha yavaş büyüyerek antimikrobiyalleri daha yavaş alır (5).

Biyofilm yapısını ifade eden *pel*, *psl* ve *ppyR* gibi pek çok gen vardır. Bu genlerin sayesinde ortaya çıkan polisakkaritler biyofilm olgunlaşmasında, biyofilm matriksinin karbonhidrat yönünden zengin yapısı oluşumunda hayati rolleri vardır (8,61,66). Literatürde yayınlanan bu genlerin varlığının araştırılmasında genel olarak polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemleri kullanılmıştır (14).

Çalışmamızda yapılan karşılaştırmada *pslA* geni pozitif bulunan 100 izolatın kongo kırmızısı agar besiyerindeki biyofilm oluşumu değerlendirildiğinde; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25), *pelA* geni pozitif 99 izolatın; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25.3), *ppyR* geni pozitif 99 izolatın 25 tanesi pozitif (%25.3) saptandı. *pslA* geni pozitif 100 izolatın mikrotitrasyon plak yöntemindeki biyofilm oluşumu

değerlendirildiğinde; 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24), 45 tanesi orta derece pozitif (%45) toplam 69 izolat (%69) pozitif, *pelA* geni pozitif 99 izolatın; 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24.2), 44 tanesi orta derece pozitif (%44.5) toplam 68 izolat (%68.7) pozitif, *ppyR* geni pozitif 99 izolatın; 23 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%23.2), 45 tanesi orta derece pozitif (%44.5) toplam 68 izolat (%67.7) pozitif saptandı. Attila ve ark'nın (58) 2008 yılında yaptığı bir çalışmada; çalışılan klinik izolatların %99'unda *ppyR* geni saptanmıştır. *ppyR* geninin biyofilm formasyonunun zengin yapısına *psl* aracılığıyla katkıda bulunduğu gösterilmiştir. *ppyR* geni klinik izolatlarda virülans gen ekspresyonunda önemli bir gen olarak tespit edilmiştir.

Colvin ve ark'nın (114) 2012 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *psl* mutasyonu olan izolatlarda biyofilm formasyonu saptanmıştır. Psl polisakkartinin eksikliği *pelA* geninin yüksek transkripsiyonuyla kompanse olmuştur. *pelA* geni *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm yapımıyla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur Ghadaksaz ve ark'nın (93) 2015 yılında kan örneklerinin de bulunduğu çeşitli örneklerden izole edilen 104 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında yaptığı bir çalışmada örneklerin %47.1'inde biyofilm oluşumu saptanmıştır. Tüm klinik izolatların %99'unda *ppyR*, %83.7'sinde *pslA*, % 45.2'sinde *pelA* genleri pozitif saptanmıştır. Özellikle *pelA* geni varlığı biyofilm oluşumuyla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Pournajaf ve ark. (14) 2018 yılında İran'da 143 kistik fibroz hastasının balgam örneklerinde; *ppyR* geni izolatların %98.6'sında, *pslA* geni %89'unda, *pelA* geni %57.3'ünde tespit etmişlerdir. Biyofilm oluşturan izolatlarda *ppyR* %87.9, *pslA* %94.5, *pelA* %89 pozitif saptamışlardır. *pslA*, *pelA*, ve *ppyR* genlerini biyofilm oluşumu ile ilişkili genler olarak savunmuşlardır. Dolatshah ve ark'nın (115) 2021 yılında İran'da klinik örneklerden (idrara, deri, balgam, vücut sıvısı, kan, yara) izole edilen *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu incelediği bir çalışmada; 100 klinik. *P. aeruginosa* izolatında %69 biyofilm oluşumu pozitif izlenmiştir. %9'u güçlü biyofilm oluşumu; %13'ü orta düzeyde biyofilm oluşumu ve %47'si zayıf biyofilm oluşumu olarak saptanmıştır ve izolatların %92'si *pslA* geni açısından pozitif olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda *P.aeruginosa* suşlarında *pslA*, *pelA*,

ppyR genlerinin yüksek bulunmasının suşların kan izolatu olup biyofilm oluşum oranının yüksekliğiyle bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. (115,116).

Çalışmamızda antibiyotik direnci ile biyofilm genleri incelemesinde; *pslA* geni pozitif suşlarda antibiyotik dirençleri gen negatif suş sayısı az olması sebebiyle tüm suşların antibiyotik sonuçlarına benzer şekildeydi. Gen pozitif suşlarda en yüksek direnç oranına sahip olan antibiyotiğin seftazidim (%20) olduğu, bunu takiben imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepim (%17) olduğu görülmüştür. *pelA* ve *ppyR* genindeki pozitiflik durumlarına göre antibiyotik direnç dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, Tablo-15). Ancak daha öncede bahsedildiği gibi biyofilm genlerini taşıyan bazı suşlarda antibiyotik direnci görülmüştür.

Pseudomonas aeruginosa hücreden hücreye sinyal sistemleriyle düzenlenen hücre yüzeyi ilişkili ya da hücre dışı virülans faktörlerine sahiptir. Tip 3 sekresyon sistemi virülans belirleyicisidir. Bu sistem konak hücrelere toksinlerini enjekte eder (74). Tip 3 sekresyon sistemi, *P. aeruginosa*'nın ciddi enfeksiyonlarının patogeneğinde temasa bağlı protein sekresyon yolu olarak rol alan önemli bir virülans faktörüdür. T3SS'nin mortalite ve morbiditeye katkısı olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma vardır (1,73,75,117).

Pseudomonas aeruginosa patogeneğinde T3SS'nin katkısı pek çok yayında gösterilmiştir. Özellikle *P. aeruginosa*'nın bakteriyemili hastalarda virülanssta etkili olduğu gösterilmiştir (74,117-122).

Literatürde T3SS ile ilgili pek çok çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda T3SS'ne ait *exoS*, *exoT*, *exoY* ve *exoU* genlerini göstermede polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi, Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD), ve Southern Hibridizasyon yöntemleri sıklıkla kullanılmıştır (1,14,74,118,122-124).

Bizim çalışmamızda kan kültürü örneklerinden izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşunun 88'inde (%88) *exoS* geni saptanırken, *exoY* ve *exoT* geni 100 suşun

tamamında (%100) saptandı, *exoU* geni 100 suştan 27'sinde (%27) pozitif tespit edildi. Sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu bulundu (2,119,122,124,125).

Feltman ve ark. (124) 2001 yılında Amerika'da *P. aeruginosa* üreyen 115 izolatın tamamında *exoT* geni saptanmış olup klinik izolatların %71'inde *exoS* geni, % 28'inde *exoU* geni, % 89'unda *exoY* geni saptamışlardır. Çevresel örneklerde 20 izolattan 16'sı (%80) *exoS* pozitif bulmuşlar ve *exoS*'nin *P. aeruginosa*'nın çevrede yaşaması için kesin gerekli olmadığını düşünmüşlerdir. Klinik ve çevresel örnekler arasında *exoS*, *exoU* ve *exoY* pozitiflik oranında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmemişlerdir.

Wareham ve ark'nın (122) 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada; 163 klinik (periton, solunum, yumuşak doku, idrar, kan) izolattan, *exoS*-/*exoU*+ genotiplerin bakteriyemi ile anlamlı ilişkili olduğu bulunmuştur. Ekzo proteininin kan örneklerinden daha fazla saptanması, (kandan % 87) akut enfeksiyondaki önemini akla getirmiştir. Bakteriyemilerde T3SS sekrete eden *P. aeruginosa*'nın tanımlanmasının tedavide yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Garey ve ark. (119) 2008 yılında hastanede yatan hastaların kan dolaşımı örneklerinden 122 kan izolatında *exoS* genini en yaygın (%70.5), *exoU* geni pozitifliğini ikinci sırada (%25.4) bulmuşlardır. Her iki gen pozitiflik oranını ise %1.6, iki geni de içermeyenlerin oranını %2.5 bulmakla birlikte, her iki genden birisinin kan izolatında bulunduğu belirtmişlerdir. *exoU* geni pozitif izolatlarda sefepim, seftazidim, piperasilin-tazobaktam, karbapenem, florokinolonlar ve gentamisine karşı antibiyotik direncini bu genin negatif olduğu izolatlara göre anlamlı yüksek bulmuşlardır.

Javadi ve ark'nın (125) 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada klinikten ve çevreden izole edilip doğrulanan 144 izolattan *exoT* %37 ve *exoS* %39 ve çevresel örneklerden *exoT* %27 ve *exoS* %24 oranında pozitif saptanmıştır. Amirmozafari ve ark. (2) 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada kan, yara, idrar ve solunum yolu

örneklerinden izole edilen 102 *P. aeruginosa* suşunda *exoS* geni; %59.8 oranında pozitif saptanmıştır.

Vance ve ark'nın (126) 2005 yılında yaptığı bir çalışmada T3SS efektörlerinin silinip mutant oluşturulmasıyla, nötropenik fare modelinde akciğer enfeksiyonu oluşumunun hafif olduğu etkenin kana yayılmasının daha az olduğu saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda T3SS'nin akciğerlerde epitel bariyerini aşmak için ve bakterinin kanda yaşayabilmesi ve yayılmasında belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır.

Berthelot ve ark. (117) Fransa'da 2003 yılında 92 bakteremik suşu dört gruba ayırıp suşları Tip 3 protein sekresyon seviyesine ve sitotoksite miktarına göre incelediği çalışmada; gruplar arasında en yüksek ve hızlı sitotoksite miktarını genotipik olarak *exoU*'ya ait bulmuşlardır. *exoS* genotipindeki suşlarda ise daha yavaş sitotoksite oluştuğunu belirtmişlerdir. Javanmardi ve ark'nın (127) 2019 yılında hastane kaynaklı *P. aeruginosa* izolatlarında ekzotoksin sıklığını inceledikleri meta analiz çalışmasında pozitiflik oranları %83 *exoT*, %32 *exoU*, %61 *exoS* ve %91 *exoY* şeklinde bulunmuştur ve *exoY* ve *exoT* 'nin çoğu klinik izolattan üretilen T3SS toksini olduğu sonucuna varılmıştır.

Pseudomonas aeruginosa özellikle yatan hastalarda bakteriyemilerde önemli fırsatçı patojen ve nozokomiyal hastalıkların önemli sebeplerindedir. Çalışmamızda bu sebeplerden yoğun bakımda ve yoğun bakım dışında yatan hastalardan alınan örneklerin biyofilm üretimi ve T3SS genleri varlığı kan kültüründen üreyen suşlardan çalışılmıştır. Literatürde solunum örnekleri, kronik bacak ülseri, yanık örnekleri gibi farklı bölgelerden izole edilen suşlarda biyofilm, T3SS genlerinin araştırıldığı çalışmalar da vardır (21,47,70).

Georgescu ve ark'nın (47) 2016 yılında Romanya'da kronik bacak ülserlerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının virülans ve direnç özelliklerini araştırdığı bir çalışmada *P. aeruginosa* 'nın virülans genlerinden en sık *exoT* (%100), tespit edilmiştir. Ekzoenzimler gibi yüzeyle ilişkili bileşenlerin doku hasarlarına, kan

dolaşım enfeksiyonlarına sebep olduğu belirtilmiştir. Haghi ve ark'nın 2018 yılında İran'da yanık yarası enfeksiyonlarından izole edilen çok ilaca dirençli *P. aeruginosa*'dan yaptıkları çalışmada *exoY* %93.1, *exoT* %20.4 pozitif tespit edilmiş olup *exoU* geni saptanmamıştır (91).

Al Dawodeyah ve ark'nın (21) 2018 yılında Amman'da yaptıkları bir çalışmada; solunum yolu enfeksiyonlu yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa*'da ve *exoU* genleri %33 oranında tespit edilmiştir. Ayrıca direnç genleri çalışılmış olup, ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatları arasında antibiyotik direnci, virülans genleri ve genotipler arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Çalışmada biyofilm oluşumu, sitotoksinin uyarılmasında *exoS*'nin etkili olduğundan bahsedilmiştir.

Khodayary ve ark. (70) İran'da 2019 yılında yanık hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında incelenen genlerden *exoT* %100, *exoY* %100, *exoS* %59, *exoU* %41 tespit edilmiştir. Bu genlerden *exoU* geni varlığı ile antibiyotik direnci arasında anlamlı ilişki bulunmuştur.

Pseudomonas aeruginosa'ya ait virülans faktörlerinden olan T3SS antibiyotik dirençlerine yol açarak mortalite ve morbiditeye katkıda bulunur ve bununla ilgili pek çok çalışma vardır (74,118,119,121,128,129). Bizim çalışmamızda antibiyotik dirençleri ile T3SS genleri karşılaştırıldığında; *exoS* genotipi ile siprofloksasin dışında antibiyotik direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$, tablo-16). Ancak *exoS* pozitiflerde sefepim, imipenem, meropenem, sefotaksim direnci negatiflere göre daha yüksek bulunmuştur. *exoS* negatif hastalarda siprofloksasin direnci pozitiflere göre anlamlı olarak yüksektir ($p<0.05$, tablo-16).

exoY ve *exoT* geni pozitif suşlarda en yüksek direnç oranı seftazidimde (%20), bunu takiben imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepimde (%17) görülmüştür. En düşük antibiyotik direnç oranı gentamisinde (%6) görülmüştür. *exoU* genotipi ile levofloksasin dışında antibiyotik direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak *exoU* pozitiflerde, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, meropenem, piperasilin-tazobaktam ve

gentamisin direnci negatiflere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada *exoU* pozitif hastalarda levofloksasin direnci negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, tablo-16). Wong-Beringer (130) ve ark. 2008 yılında göz, kan, idrar ve yara izolatlarından elde edilen *P. aeruginosa*'nın *exoU* pozitif izolatlarında *exoS* pozitif izolatlarına göre levofloksasin direncini anlamlı olarak daha fazla bulmuşlardır ve *exoU* pozitif izolatlarda %91 *gyrA* mutasyonu ve aşırı eksprese edilen dışa atım pompası fenotipi saptanırken, *exoS* pozitif izolatlarda %59 saptanmıştır. Florokinolon ile indüklenen *gyrA* mutasyonu sonucunda DNA süpersarmalındaki değişikliklerin *P. aeruginosa* klinik izolatlarında tip-3 virülans gen ekspresyonuna sebep olabileceğinden bahsedilmiştir.

El-Solh ve ark'nın (74) Amerika'da 2012 yılında *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı bakteriyemili hastalardan elde edilen 85 izolatın 37'sinde (%44) T3SS proteinlerinden en az biri saptanmıştır. Bakteriyemili hastalarda septik şoka ilerleme, T3SS proteinleri pozitif örneklerde %43, bu proteinlerin saptanmadığı negatif örnekli hastalarda %23 olarak kaydedilmiştir. T3SS pozitif hastalarda %59 siprofloksasine direnç, %35 sefepime direnç ve %38 gentamisine direnç tespit edildi. Bu çalışmada *exoU* pozitifliği siprofloksasin dirençli 22 izolattan 11 inde (%50) saptanmıştır. *exoS* pozitifliği 5 (%23) siprofloksasin dirençli izolatta ve 14 (%7) gentamisin dirençli izolatın birinde saptanmıştır. İlk 1 ay hayatta kalanlarda *exoU* pozitifliği saptanmamıştır. T3SS pozitif bakteriyemili hastalarda daha fazla antimikrobiyal direnç ve bir ay içindeki mortalitede artış saptanmıştır.

Yousefi-Avarvand ve ark'nın (118) İran'da 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, klinik (idrara, beyin-omurilik sıvısı, balgam, kan, göz, yara, periton) kaynaklı toplam 156 *P. aeruginosa* suşunda antibiyotik direnç oranları aztreonam %94.2, tikarsilin %78.8, ve piperasilin-tazobaktam %76.9 bulunmuştur. Bu çalışmada *exoS* %66,7, *exoU* geni %65.4 oranında pozitif tespit edilmiştir ve *exoU* geni göz (%80) ve yara (%75.9) örneklerinde daha fazla pozitif görülürken, *exoS* geni periton ve göz örneklerinden %100 saptanmıştır. İstatiksel olarak örnekler arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. Çoklu ilaç direnç oranı ise *exoU*+lerde, (%80) *exoS*+ (%66) lere göre daha fazla saptanmıştır.

Pena ve ark'nın (121) 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, Tip 3 sekresyon sisteminin sebep olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarında, hastaların izolatlarındaki *exoU* pozitifliğinin erken mortaliteyle anlamlı şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir ve ekzoU sekresyon proteinin inflamasyonu, konak immun yanıtı etkileyebileceğini saptamışlardır. Geç mortalitenin ise çoklu ilaç direnci ile ilişkili bulunmuştur. *exoU* genotipi ile karbapenemler, florokinolonlar, sefalosporinler gibi antipseudomonal ilaçlara karşı direnç arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da *exoU* pozitif hastalarda levofloksasin direnci negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur

Emanini ve ark'nın (128) 2019 yılında yaptıkları bir çalışmada kistik fibroz hasta örneklerinin olduğu 85 *P. aeruginosa*'da en yüksek antibiyotik direnci; polimiksin B, piperasilin-tazobaktam ve meropenem antibiyotiklerinde bulunmuştur. İzolatlar yüksek oranda (%83.5) biyofilm oluşturmuş olup, %25,88'i güçlü biyofilm pozitif, %37,64'i orta ve %20'si zayıf biyofilm oluşumu şeklindedir. *exoT* geni tüm izolatlarda pozitif olup, %79 izolatta *exoS* ve *exoY* pozitif, *exoU* % 35'inde pozitif bulunmuştur. *exoU* geninin sitotoksosite seviyelerini etkilediğini ortaya konmuştur.

Ali ve ark. (129) İran'da 2021 yılında 227 örnekten izole edilen 40 *P. aeruginosa*'da. kongo kırmızısı agar yöntemi kullanarak 28 izolatın (%70) biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Çoklu ilaç direnci olan *P. aeruginosa* izolatları arasında biyofilm oluşumunun önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. 26 (%70) çoklu ilaç direnci olan *P. aeruginosa* izolatında, *exoU* genini (%80) pozitif saptamışlardır.

Sarges ve ark. (131) Brezilya'da 2020 yılında 49 kistik fibroz hastalarından elde edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da *exoS* genini %97.9, *exoU* genini %63.2, *exoT* genini %95.9 ve *exoY* genini %97.9 pozitif tespit etmişlerdir. Kronik enfeksiyonlarda *exoS* virülotipini baskın bulup klinik sonuçların kötüleşmesiyle ilişkilendirilmişlerdir.

T3SS ve biyofilmi karşılıklı kontrol eden RetS/LadS sinyal sistemi ile bu iki virülans faktörü karşılıklı düzenlenmektedir. RetS sensörü; T3SS'ni aktive edip biyofilm oluşumunu baskılarken, LadS sensörü ise, T3SS'ni bloke edip *pel* aracılı biyofilm olgunlaşmasını artırır. RetS eksikliğinde *P. aeruginosa* hücreleri toplanıp T3SS bloke olur. Ayrıca GacS/LadS sinyal yolu uyarısı eksikliğindeyse; biyofilm maturasyonu azalmakta, T3SS aktivasyonu artmaktadır (58,59).

Bizim çalışmamızda T3SS genlerinin kongo kırmızısı agar yönteminde biyofilm oluşumu dağılımına bakıldığında *exoS* geni pozitif 88 izolatın; 23 tanesi biyofilm pozitif (%26.1), *exoY* ve *exoT* geni pozitif 100 izolatın; 25 tanesi biyofilm pozitif (%25), *exoU* geni pozitif 27 izolatın; 9 tanesi pozitif (%33.3'ü) saptandı. Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm oluşumu ile *exoS*, *exoU* genleri arasındaki farklılıklar incelendiğinde incelemeler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$, tablo-12) T3SS genlerinin mikrotitrasyon plak yönteminde biyofilm oluşumu dağılımına bakıldığında *exoS* geni pozitif 88 izolatın; 21 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%23.9), 42 tanesi orta derece pozitif (%47.7) toplam 63 izolatta (%71.6) pozitif, *exoY* ve *exoT* geni pozitif 100 izolatın; 24 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%24), 45 tanesi orta derece pozitif (%45) toplam 69 izolatta pozitif (%69), *exoU* geni pozitif 27 izolatın; 7 tanesi biyofilm güçlü pozitif (%25.9), 12 tanesi orta derece pozitif (%44.4) toplam 19 izolatta pozitif (%70.3), saptandı. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile *exoS* ve *exoU* dağılımı incelendiğinde biyofilm oluşumu ile bu genler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$, tablo-13)

Jabalamehli ve ark'nın (73) 2012 yılında İran'da yaptıkları bir çalışmada, yanık örneklerinden izole edilen *P.aeruginosa*'da Tip 3 sekresyon toksini kodlayan gen dağılımı ile biyofilm fenotipleri arasında korelasyon bulunamamıştır. Çalışma sonucunda T3SS genotipi ve biyofilm oluşumunun enfeksiyon bölgelerine göre değişebileceğini, bu farklılıklarında enfeksiyonlardaki kliniğe farklı şekilde yansıtacağı sonucuna varılmıştır.

Pseudomonas aeruginosa'da T3SS ile ilgili son çalışmalar bu sistemin biyofilm ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (35,48,49). Kateterli hastalarda biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* epitel bariyerinde biyofilmler aracılığıyla hücre bağlantılı toplanma oluştururken, T3SS translokasyon aparatı konak hücre faktörü salınımını uyarıp bu toplanmada aracıdır. Konak hücre faktörü (agrega uyarıcı faktör) biyofilm oluşumunu artırmakta, T3SS biyofilm oluşumuna doğrudan etki etmemektedir (46).

Dalvand ve ark'nın (132) 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, yanık ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa*'da, biyofilm oluşumunda etkili olan *exoU* geni varlığının idrar yolu enfeksiyonlu hasta örneklerinde düşük saptanması sebebiyle, bu hastalarda biyofilm oluşum miktarının az bulunduğu belirtilmiştir. Yanık hastalarından izole edilen örneklerde ise biyofilm oluşumu daha fazla saptanmış olup, mortalite artışı da bu sonuca bağlanmıştır. Özellikle mortalite oranı yüksek yanık hastalarında biyofilm oluşumunu inhibe edebilmek için *exoU* genin fonksiyonlarını engelleyerek hem enfeksiyon hem mortalite oranlarının azalabileceği kanısına varılmıştır.

Azimi ve ark'nın (4) İran'da 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, çeşitli klinik örneklerden (yara, solunum, idrar, kan ve balgam) elde edilen toplam 160 *P. aeruginosa* izolatında *exoS* ve *exoU*' nun biyofilm oluşturmeyen izolatlarda, *exoU*'nin ise yaygın olarak biyofilm oluşturan izolatlarda görüldüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada örneklerin kaynağıyla *exo* genleri arasında bağlantı bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda *exoS*, *exoU* biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmeyen izolatlara göre daha fazla oranda pozitif tespit edilmiştir.

Faridi ve ark'nın (1) 2019 yılında İran'da yaptığı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'da yara, solunum yolu, idrar, kan, balgam, göz ve beyin-omurilik sıvısı gibi çeşitli örneklerden 75 tane *P. aeruginosa* izolatında *exoS* %57 ve *exoU* %38 pozitif saptanmıştır. %98.6 biyofilm oluşturan izolatların % 68 tetrasikline direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların %32'si *exoS* ve %29'u *exoU* genleri varlığı için pozitif bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda *exoS* ve *exoU* genlerinin yaygın olarak biyofilm oluşturan izolatlarda görüldüğü tespit edilmiştir (tablo-13). *P. aeruginosa*'da bazen ters etkili uyarı sistemleriyle T3SS ve biyofilm oluşumunun kontrol altında olabileceği düşünülmüştür. *P.aeruginosa*'ya ait virülans faktörlerinden T3SS ve biyofilmin ilişkisi ile ilgili pek çok çalışma vardır (46,69,84,133-135).

Ventre ve ark. (69) 2006 yılında yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* virülans genlerinin çoklu sensörlerle karşılıklı düzenlendiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışma Tip 3 salgılama ve biyofilm oluşumunda rol alan polisakkaritleri ifade eden genlerin karşılıklı düzenleyen sinyal yolu sensörleri LadS ve RetS ile ilgilidir. Çalışmanın sonucunda LadS sensörünün pel ekzopolisakkarit operonunu düzenleyip, kalın agrega oluşumuna sebep olduğu; T3SS gen ekspresyonunu azalttığı, RetS sensörünün ise bunun tam tersi etkilere sebep olduğu, GacS/GacA sinyal yolu üzerinden *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, LadS ve RetS sensörlerinin düzenleyici RsmYZ üzerinde zıt etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (62,69,132).

Kuchma ve ark. (84) 2005 yılında *sadA*, *sadR* ve *sadS* 'den oluşan üç proteinin biyofilm olgunlaşmasında, makrokolonların oluşması ve kanalların sıvı dolmasında rol oynadığından ve bu proteinleri kodlayan genlerde mutasyon durumunda, biyofilm oluşumunda eksikliklere sebep olduğundan bahsedilmiştir. SadARS tarafından düzenlenen genlerin, T3SS'nin negatif yönde düzenlenmesi için de gerekli olduğu, bu sistemde mutasyon durumunda T3SS uyarısı arttığı, biyofilmlerde olgunlaşmanın azaldığı tespit edilmiştir.

Mikkelsen ve ark. (134) 2009 yılında *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu ile Tip 3 sekresyon sisteminin birbiriyle ilişkili olduğunu anlatan bir çalışma yayınlamıştır. Çalışmada biyofilmlerin hücrel ve salgılanan fraksiyonlarında immunblotlama ile PcrV antikorunu kullanılarak, PcrV tespit edilip, planktonik hücrelerde tespit edilmemiştir. Bu çalışmada Tip 3 sekresyon sistemi efektör proteinleri ekzoS ve ekzoT biyofilm rezidülerinde tespit edilip, planktonik hücrelerde tespit edilmemiştir. Hızlı büyüyen planktonik hücrelerin akut

enfeksiyonda yaygın olduğu, yavaş büyüyen hücrelerden oluşan biyofilmlerin kronik enfeksiyonlarda yaygın olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada T3SS'ni ifade eden 21 gen planktonik hücreler ve mikrokoloniler karşılaştırıldığında biyofilmlerde indüklenmiş olup; T3SS'nin 18 geni planktonik hücrelere göre biyofilmlerde anlamlı şekilde artmış olduğu saptanmıştır.

Tran ve ark. (46) 2014 yılında yaptıkları çalışmada; *P. aeruginosa*'nın Tip 3 translokunun epitel bariyerinde biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu savunmuştur. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarından saatler sonra epitel hücrelerinde hücre ilişkili agregalar oluştuğu bilinmektedir. Hücre bağlantılı agregalarda hücre dışı DNA, hem de ekzopolisakkaritler ve aminoglikozitlere direnç saptanmıştır. T3SS translokunun konak hücre faktörünün salınımı indüklediğini, konak hücre faktörünün polarize epitel hücrelerinin yüzeyinde biyofilm benzeri hücre bağlantılı agrega oluşumuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. Konak hücre faktörünün (agrega indükleyici faktör), biyofilm oluşumunu artırdığını, T3SS translokunun biyofilm oluşumuna dolaylı etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca serbest bırakılan konak hücre faktörünün T3SS fonksiyonel olmayan bakterilerde de hücre bağlantılı agregasyon oluşumunu uyarmada etkili olduğu savunulmuştur.

DiGiandomenico ve ark. (135) 2014 yılında Amerika'da yaptıkları bir çalışmada, kan örneklerinden *P. aeruginosa* izole edilen hastaların serumlarında hem PcrV'yi, hem Psl ekzopolisakkaritini hedefleyen bispesifik antikordan bahsedilmiştir. Sonuçta *P. aeruginosa* kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastaların çoğunluğu tarafından Psl ve PcrV eksprese edilmiş ve anti PcrV/Psl bispesifik antikorun bu hastalarda koruyucu aktivitesi tespit edilmiş ve murin akut pnömoni modelinde de koruyucu aktivite göstermiştir. PcrV'ye bağlanma T3SS'nin sebep olduğu sitotoksiteyi engellerken, Psl'yi hedefleyen antikorlar da, *P. aeruginosa*'nın konak hücrelere yapışmasını engelleyip, komplemanın aktive olup opsonizasyonunda yardımcı olur (56,120).

Bizim çalışmamızda hastaneden izole edilen suşlar enfeksiyon etkeni olarak alınmıştır. Bu suşların %45 orta derecede biyofilm oluşumu ve %24 güçlü biyofilm

oluşturup, tamamı T3SS genlerinden birini taşımış ve bu iki virülans faktörünün birbirine katkısı olabileceği düşünülmüştür. Ek olarak suşların %31'i biyofilm oluşturmamış olup, tüm örneklerin T3SS genlerinden birini taşıdığı bulunmuştur. Bu durumun biyofilm yapımındaki aşamalarda çeşitli çevresel faktörlerden, quorum sensing sistemi uyarı eksiklerinden, karşılıklı yanıtı düzenleyen sensör protein sistem uyarılarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. T3SS gen ürünlerinin biyofilme katkısının daha ileri mutasyonları içeren geniş kapsamlı moleküler çalışmalarla araştırılması daha uygun olacaktır.

Çalışmamızda sonuç olarak; *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi sonucunda kongo kırmızısı agar besiyeri ve mikrotitrasyon plak yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Biyofilm oluşumunun fenotipik belirlenmesinde kongo kırmızısı agar yöntemi görsel koloni değişimleri, bireysel değerlendirmeler gibi durumlardan etkileneceğinden; kantitatif ölçüm yapan mikrotitrasyon plak yöntemi verileri daha güvenilir olabileceği düşünülmüştür. Kan kültürlerinden izole edilen *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun genotipik değerlendirilmesi sonucunda *pslA*, *pelA*, *ppyR* genlerinin biyofilmi ifade etmede rolü olduğu gösterilmekle birlikte biyofilm yapısı oluşumunda genetik, çevresel faktörlerin ve diğer virülans faktörlerin katkısı düşünüldüğünde daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Aynı zamanda biyofilm oluşumunun ve T3SS'nin antibiyotiklere direnç gelişimindeki rolü buna istinaden tedavi protokollerinin düzenlenmesi göz önüne alınmalıdır. Biyofilm yapımı ve düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Biyofilm yapımı ve düzenlenmesinde T3SS yanında, ortamın ısısı, yüzey faktörleri gibi çevresel bazı faktörler de biyofilm oluşumunu etkilemektedir. T3SS ile biyofilm gelişiminin bazı sinyal sistemleriyle zıt uyarımına da bağlı olarak zıt yönde de etkilenebileceği düşünülmüştür. Tüm bu sonuçlarla *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin engellenmesi ile dirençli enfeksiyonların tedavisinde fayda sağlanabileceği aşıkardır. T3SS ile biyofilm inhibisyonu amaç edinen çalışmaların devamlılığı ve yeni tedavi metodlarının ilerlemesinde ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1. Kongo kırmızısı agar besiyerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda ekilen 100 *P. aeruginosa*'nın; 25 tanesi (%25) biyofilm pozitif saptandı. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edilen suşların 18 tanesi (%36) biyofilm pozitif saptandı. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden elde edilen suşların 7 (%14) tanesinde biyofilm üretimi pozitif saptandı. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden elde edilen suşlardaki biyofilm pozitiflik oranının göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptandığı görülmüştür ($p<0.05$).
2. Mikrotitrasyon plağı yönteminde 100 *P. aeruginosa* suşunun, 24 tanesinde (%24) güçlü biyofilm oluşumu, 45 tanesinde (%45) orta derecede biyofilm oluşumu toplam 69 tanesinde (%69) biyofilm oluşumu pozitif tespit edildi. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürü örneklerinin 10 tanesinde (%20) güçlü biyofilm oluşumu, 24 tanesinde (%48) orta derece biyofilm oluşumu toplam 34 tanesinde (%68) biyofilm oluşumu pozitif saptandı. Yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşların, 14 tanesinde (%28) güçlü biyofilm oluşumu, 21 tanesinde (%42) orta derece biyofilm oluşumu toplam 35 tanesinde (%70) biyofilm oluşumu pozitif saptandı.
3. Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm ile mikrotitrasyon plak yöntemi arasındaki uyum McNemar testi ile karşılaştırıldığında yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ($p<0.05$).
4. Antibiyotik direnç oranlarında en yüksek direnç seftazidimde (%20) ve imipenemde (%19) görüldü. Yoğun bakım ünitelerinden gönderilen örneklerden izole edilen suşlarda yoğun bakım dışından gönderilen örneklerden izole edilen suşlardaki antibiyotik dirençlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).

5. Biyofilm oluşturan suşlarda sefepim, seftazidim, imipenem, piperasilin-tazobaktam direncinin biyofilm oluşturmeyan gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).
6. Çalışmada *pslA* geni varlığı 100 suşun tamamında (%100), 99'unda (%99) *pelA* geni, 99'unda (%99) *ppyR* geni pozitif saptandı.
7. *pslA* geni pozitif suşlarda en yüksek direnç oranı pozitif suşlarda suşlarda antibiyotik dirençleri gen negatif suş sayısı az olması sebebiyle tüm suşların antibiyotik sonuçlarına benzer Şekilde seftazidime (%20) ve sırasıyla imipenem (%19), piperasilin-tazobaktam (%18) ve sefepime (%17) karşı görülmüştür. *pelA* ve *ppyR* genindeki pozitiflik durumlarına göre antibiyotik direnç dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).
8. Çalışmada 100 suştan 88'inde (%88) *exoS* geni, tamamında (%100) *exoY* ve *exoT* geni, 27'sinde (%27) *exoU* geni pozitif saptandı.
9. Kongo kırmızısı agar besiyerinde değerlendirilen biyofilm oluşumu ile *exoS*, *exoU* genleri arasındaki farklılıklar incelendiğinde incelemeler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).
10. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile *exoS* ve *exoU* dağılımını incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).
11. *exoS*, *exoU* biyofilm oluşturan izolatlarda oluşturmeyan izolatlara göre daha fazla oranda pozitif tespit edilmiştir.

12. *exoS*, *exoU* ve *pelA*, *ppyR* genlerinin dağılımına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).
13. *exoS* negatif hastalarda siprofloksasin direnci pozitiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
14. *exoU* pozitif hastalarda levofloksasin direnci negatiflere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ($p<0.05$).
15. Biyofilm oluşturan suşlarda biyofilm genlerinden en az biri pozitif saptanmıştır. Biyofilm genleri pozitif saptanan suşlarda Tip-3 sekresyon sistemi genlerinden en az biri saptanmıştır. Biyofilm oluşumu ile tip 3 sekresyon sistemi virülans faktörlerinin klinik anlamda ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca *P. aeruginosa*'da biyofilm ve T3SS antibiyotik direncine katkı sağlayan önemli virülans faktörlerindedir.

KAYNAKLAR

1. Bahador N, Shoja S, Faridi F, Dozandeh-Mobarrez B, Qeshmi FI, Javadpour S, Mokhtary S. Molecular detection of virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from different clinical specimens in Bandar Abbas. Iran J Microbiol 2019;11(1):25-30.
2. Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Habibi A. Association of the Exotoxin A and Exoenzyme S with antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains. Arch Iran Med 2016;19(5):353-8.
3. Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes *fliC*, *toxA* and *phzS* are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. Infect Dis (Lond) 2018;50(4):273-9.
4. Azimi S, Kafil HS, Baghi HB, Shokrian S, Najaf K, Asgharzadeh M, et al. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. GMS Hyg Infect Control 2016;11:Doc04.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002;15(2):167-93.
6. Tolker-Nielsen T. Biofilm development. Microbiol Spectr 2015;3(2):MB-0001-2014.
7. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi: Etkenlere Göre Enfeksiyonlar. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri 2008: 2175-8.

8. Karballaei Mirzahosseini H, Hadadi-Fishani M, Morshedi K, Khaledi A. Meta-analysis of biofilm formation, antibiotic resistance pattern, and biofilm-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Microb Drug Resist* 2020;26(7):815-24.
9. Erdem B. Pseudomonaslar. Editör: Ustaçelebi S ve ark, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Günes Kitabevi, 1999:551-66.
10. Bilgehan H. Non-fermentatif gram olumsuz basiller. Editör: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2000:175-97.
11. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2008;38(1):42-51.
12. Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha)* 2018;63(4):413-32.
13. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017;71(0):78-91.
14. Pournajaf A, Razavi S, Irajian G, Ardebili A, Erfani Y, Solgi S, et al. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infez Med* 2018;26(3):226-36.
15. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci* 2020;21(22):8671.

16. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 2004;72(7):4275-8.
17. Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. (Çev. Şener B) *Pseudomonas*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. eds. (Başustaoğlu A. Çev Ed.), Ankara:Atlas Kitapçılık, 2009:734-43.
18. Marquart ME, Caballero AR, Chomnawang M, Thibodeaux BA, Twining SS, O'Callaghan RJ. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(10):3761-8.
19. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant Protein-A. *PLoS One* 2011;6(11):1-14.
20. Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 2004;279:30871-9.
21. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs* 2018;8(1):31-40.
22. Foulkes DM, McLean K, Haneef AS, Fernig DG, Winstanley C, Berry N, Kaye SB. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. *Microorganisms* 2019;7(12):707.

23. 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;288:409-18.
24. Caballero A, Thibodeaux B, Marquart M, Traidej M, O'Callaghan R. *Pseudomonas* keratitis: Protease IV gene conservation distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):522-30.
25. 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;288:409-18.
26. Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 2004;53(4):1089-98.
27. 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(3):1352-8.
28. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AL, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C supresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 1999;67:2371-6.
29. Morris JD, Hewitt JL, Wolfe LG, Kamatkar NG, Chapman SM, Diener JM, Courtney AJ. Imaging and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* swarming and rhamnolipid production. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(23):8310-7.

30. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:1323-36.
31. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-90.
32. Temel A, Eraç B. Bakteriye biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2018;48(1):1-13.
33. Horsman SR, Moore RA, Lewenza S. Calcium chelation by alginate activates the type III secretion system in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* 2012;7(10):e46826.
34. Çalı A, Çelik C, Tutar U, Bakıcı MZ. Hastanede yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktiviteleri. *Kocaeli Med J* 2018;7;3:82-8.
35. Luo Y, Yang Q, Zhang D, Yan W. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms. *J Microbiol Biotechnol* 2021;31(1):1-7.
36. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci* 2021;22(6):3128.
37. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 2013;14(10):20983-1005.
38. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(3):236-41.

39. İlhan GÜN, İkinci FY Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. Gıda 2009;34(3):165-73.
40. 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;37:3235-8.
41. 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;186:2449-56.
42. Sakarya S. Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. In: Çavuşlu S, Oral Ö, editors. 12.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 16-20 Kasım 2005; Antalya-Belek. 3-8.
43. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318-22.
44. 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: 4759-66.
45. 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;70:2758-62.
46. Tran CS, Rangel SM, Almblad H, Kierbel A, Givskov M, Tolker-Nielsen T, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. PLoS Pathog 2014 ;10(11):e1004479.

47. Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. BMC Infect Dis 2016;16 (Suppl 1):92.
48. Nasirmoghadas P, Yadegari S, Moghim S, Esfahani BN, Fazeli H, Poursina F, et al. Evaluation of biofilm formation and frequency of multidrug-resistant and extended drug-resistant strain in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Isfahan. Adv Biomed Res 2018 Apr 24;7:61
49. Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. Biologicals 2014;42(1):1-7.
50. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol 2007;10(6):644-8.
51. Morris AJ, Jackson L, Cw Yau Y, Reichhardt C, Beaudoin T, Uwumarenogie S, et al. The role of Psl in the failure to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in children with cystic fibrosis. NPJ Biofilms Microbiomes 2021;7(1):63.
52. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl. Front Microbiol 2011;2:167.
53. Ghafoor A, Jordens Z, Rehm BH. Role of PelF in pel polysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 2013;79(9):2968-78.
54. Ünal D. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Candida* cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Ankara, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.

55. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(15):5238-46.
56. Tabor DE, Oganessian V, Keller AE, Yu L, McLaughlin RE, Song E, et al. *Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl, the molecular targets of bispecific antibody MEDI3902, are conserved among diverse global clinical isolates. *J Infect Dis* 2018;5;218(12):1983-94.
57. Jackson KD, Starkey M, Kremer S, Parsek MR, Wozniak DJ. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol.* 2004;186(14):4466-75.
58. Attila C, Ueda A, Wood TK. PA2663 (*PpyR*) increases biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 through the *psl* operon and stimulates virulence and quorum-sensing phenotypes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;78(2):293-307.
59. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* 2011;13(12):3128-38.
60. Zhang Y, Xia B, Li M, Shi J, Long Y, Jin Y, et al. HlgB reciprocally controls biofilm formation and the expression of type III secretion system genes through influencing the intracellular c-di-GMP level in *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)* 2018;10(11):424.
61. Bordi C, Lamy MC, Ventre I, Termine E, Hachani A, Fillet S, et al. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* 2010;76(6):1427-43.

62. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* 2004;7(5):745-54.
63. Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* 2011;6(12):e29113.
64. Yahr TL, Greenberg EP. The genetic basis for the commitment to chronic versus acute infection in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cell* 2004;16(4):497-8.
65. Brencic A, Lory S. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 2009;72(3):612-32.
66. Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, Fadel F, Filloux A, Sivaneson M, et al. The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 2016;12(5):e1006032.
67. Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 2009;23(2):249-59.
68. Kay E, Humair B, Déneraud V, Riedel K, Spahr S, Eberl L, et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006;188(16):6026-33.

69. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(1):171-6.
70. Khodayary R, Nikokar I, Mobayen MR, Afrasiabi F, Araghian A, Elmi A, Moradzadeh M. High incidence of type III secretion system associated virulence factors (exoenzymes) in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian burn patients. *BMC Res Notes* 2019;15;12(1):28.
71. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-65.
72. Maçin S. Pigmentli ve pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması (Uzmanlık Tezi). Ankara, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2014.
73. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2012;38(8):1192-7.
74. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* 2012;40(4):1157-63.
75. Hayashi N, Nishizawa H, Kitao S, Deguchi S, Nakamura T, Fujimoto A, Shikata M, Gotoh N. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett* 2015;2;589(8):890-6.

76. Hardy KS, Tessmer MH, Frank DW, Audia JP. Perspectives on the *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system effector ExoU and its Subversion of the host innate immune response to infection. *Toxins (Basel)*. 2021;13(12):880.
77. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care* 2014;18(6):668.
78. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 2006;62(3):631-40.
79. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 2005;73(3):1695-705.
80. Williams McMackin EA, Djapgne L, Corley JM, Yahr TL. Fitting pieces into the puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system gene expression. *J Bacteriol* 2019;201(13):e00209-19.
81. Lepanto P, Bryant DM, Rossello J, Datta A, Mostov KE, Kierbel A. *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a lyn-dependent mechanism. *Cell Microbiol* 2011;13(8):1212-22.
82. Laskowski MA, Kazmierczak BI. Mutational analysis of RetS, an unusual sensor kinase-response regulator hybrid required for *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Infect Immun* 2006;74(8):4462-73.
83. Hsu JL, Chen HC, Peng HL, Chang HY. Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* 2008;283(15):9933-44.

84. Kuchma SL, Connolly JP, O'Toole GA. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2005;187(4):1441-54.
85. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>."
86. Perez LR, Costa MC, Freitas AL, Barth AL. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. Braz J Microbiol 2011;42(2):476-9.
87. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis 2011;15(4):305-11.
88. Mustafi S, Veisaga ML, López LA, Barbieri MA. A Novel Insight into dehydroleucodine mediated attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence mechanism. Biomed Res Int 2015;2015:216097.
89. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 2011;(47):2437.
90. Aktas Z, Kipritçi Ö, Bakkaloglu H, Aydın AE, Bal Ç. Transplantasyon ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suslarının RAPD-PCR yöntemiyle tiplendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg 2006; 36: 88-93.
91. Haghi F, Zeighami H, Monazami A, Toutouchi F, Nazaralian S, Naderi G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. Microb Pathog 2018;115:251-6.

92. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3526-31.
93. Ghadaksaz A, Fooladi AAI, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *J Appl Biomed* 2015;13(1):61-8.
94. Ghanbarzadeh Corehtash Z, Khorshidi A, Firoozeh F, Akbari H, Mahmoudi Aznavah A. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(10):e22345.
95. Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58(4):428-39.
96. Deka N. Comparison of tissue culture plate method, tube method and congo red agar method for the detection of biofilm formation by coagulase negative *Staphylococcus* isolated from non-clinical isolates. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2014;3(10):810-5
97. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017;43(3):313-51.
98. Lima JLDC, Alves LR, Paz JNPD, Rabelo MA, Maciel MAV, Morais MMC. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva* 2017;29(3):310-6.

99. Abdel Halim RM, Kassem NN, Mahmoud BS. Detection of biofilm producing *Staphylococci* among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. Open Access Maced J Med Sci 2018;6(8):1335-41.
100. Samad A, Khan AA, Sajid M, Zahra R. Assessment of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and hydrodynamic evaluation of microtiter plate assay. J Pak Med Assoc 2019;69(5):666-7
101. Baselga R, Albizu I, De La Cruz, M, Del Cacho E, Barberan, M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. Infect Immun 1993; 61(11):4857-62.
102. 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;37:3235-8.
103. She P, Wang Y, Liu Y, Tan F, Chen L, Luo Z, Wu Y. Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. Microbiologyopen 2019;8(12):e933.
104. Russotto V, Cortegiani A, Graziano G, Saporito L, Raineri SM, Mamma C, Giarratano A. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. Infect Drug Resist 2015;8:287-96.
105. Yücesoy Dede B. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobilyallere duyarlılıkları (Uzmanlık Tezi). İstanbul, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2008.

106. Isik SA, Yenilmez E, Cetinkaya RA, Gorenec L, Kose S. A meta-analysis of antibiotic resistance rates in *Pseudomonas aeruginosa* isolated in blood cultures in Turkey between 2007 and 2017. *North Clin Istanbul* 2021;8(3):286-97.
107. Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Jones ME, Karlowsky JA, Sahn 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(7):2431-6.
108. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis*. 2019;6(2):109-19.
109. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-How *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front Microbiol* 2019;10:913.
110. Jeong SJ, Yoon SS, Bae IK, Jeong SH, Kim JM, Lee K. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;80(2):130-5.
111. Banar M, Emaneini M, Satarzadeh M, Abdellahi N, Beigverdi R, Leeuwen WB, Jabalameli F. Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *PLoS One* 2016;11(10):e0164622.

112. Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, Taherikalani M, Maleki A, Karimi S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iran J Microbiol 2014;6(3):133-9.
113. Zaranza AV, Morais FC, do Carmo MS, de Mendonça Marques A, Andrade-Monteiro C, Ferro T, et al. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to Hep-2 cells of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. J Biomater Nanobiotechnol 2013;4:98-106.
114. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environ Microbiol 2012;14(8):1913-28.
115. Dolatshah L, Tabatabaei M. A phenotypic and molecular investigation of biofilm formation in clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Biol Res Commun 2021;10(4):157-63.
116. Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Res Notes 2020;13(1):27.
117. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, Grattard F; Groupe d'Etudes des Septicémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. J Infect Dis 2003;188(4):512-8.

118. Yousefi-Avarvand A, Khashei R, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Emami A, Zomorodian K, Motamedifar M. The frequency of exotoxin A and exoenzymes s and u genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. *Int J Mol Cell Med* 2015;4(3):167-73.
119. Garey KW, Vo QP, Larocco MT, Gentry LO, Tam VH. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* 2008;20(6):714-20.
120. Thaden JT, Keller AE, Shire NJ, Camara MM, Otterson L, Huband M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic patients exhibit nonprotective antibody titers against therapeutic antibody targets prv and psl exopolysaccharide. *J Infect Dis* 2016;15;213(4):640-8.
121. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60(4):539-48.
122. Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int J Med Microbiol* 2007;297(4):227-34.
123. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis and burn wounds in Iran. *Microb Pathog* 2016;99:1-4.

124. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 2001;147:2659-69
125. Javadi A, Sharifi Y, Khodadadian R, Abbas FF, Morovvati, Abedzadeh A, et al. Comparison the presence of exotoxin A, T, S isolated from clinical and environmental sample of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals of Qom city. *Res J Fisheries Hydrobiol* 2015;10(10):709-13.
126. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun.* 2005;73(3):1706-13.
127. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Keshavarzi A, Rajaei M. A systematic review and meta-analysis on exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infect Genet Evol* 2019;75:104037.
128. Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D, Jabalameli L, Hashemi M, Beigverdi R, Jabalameli F. Molecular analysis and antimicrobial resistance pattern of distinct strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Iran. *Iran J Microbiol* 2019;11(2):98-107.
129. Ali FA. Association between biofilm formation gene *bla_{exoU}* and metallo and extend spectrum beta-lactamase production of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2021
130. Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, et al. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(4):330–6.

131. Sarges EDSNF, Rodrigues YC, Furlaneto IP, de Melo MVH, Brabo GLDC, Lopes KCM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system virulotypes and their association with clinical features of cystic fibrosis patients. *Infect Drug Resist* 2020;13:3771-81
132. Firouzi-Dalvand L, Pooladi M. Identification of *exoS*, *exoU* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Paramed Sci* 2014;5(4):89-95
133. Ryan Kaler KM, Nix JC, Schubot FD. RetS inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by disrupting the canonical histidine kinase dimerization interface of GacS. *J Biol Chem* 2021;297(4):101193.
134. Mikkelsen H, Bond NJ, Skindersoe ME, Givskov M, Lilley KS, Welch M. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2009;155(Pt 3):687-98.
135. DiGiandomenico A, Keller AE, Gao C, Rainey GJ, Warrener P, Camara MM, Bonnell J, et al. A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Transl Med.* 2014;6(262):262ra155.