

# Piperasilin/Tazobaktam ve Siprofloksasin Sub-minimal İnhibitör Konsantrasyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşumunun ve Quorum Sensing Genlerinin Araştırılması

## Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Quorum Sensing Genes in Piperacillin/Tazobactam and Ciprofloxacin Sub-minimal Inhibitory Concentrations

Berna ERDAL<sup>1</sup>(ID), Meltem YALINAY<sup>2</sup>(ID), Çiğdem ELMAS<sup>3</sup>(ID), Gülce Naz YAZICI<sup>4</sup>(ID)

<sup>1</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.

<sup>1</sup> Tekirdag Namik Kemal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Tekirdag, Turkey.

<sup>2</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>3</sup> Gazi University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Ankara, Turkey.

<sup>4</sup> Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.

<sup>4</sup> Erzincan Binali Yıldırım University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Erzincan, Turkey.

\* Bu çalışma, birinci yazarın "Antimikrobilyellerin subinhibitör konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa* virülansı üzerine etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesi, 2013" başlıklı Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Programı Doktora tez çalışmasıdır.

**Makale Atfı:** Erdal B, Yalınay M, Elmas Ç, Yazıcı GN. Piperasilin/tazobaktam ve siprofloksasin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm oluşumunun ve quorum sensing genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(4):547-558.

### ÖZ

*Pseudomonas aeruginosa*, doğada yaygın olarak bulunan, nonfermentatif, oksidaz testi pozitif, hareketli gram-negatif bir basildir. Minimal üreme koşullarında üreyebilmesi, doğada yaygın olarak bulunması, biyofilm oluşturma yeteneği gibi virülans faktörlerinin olması ve birden fazla antibiyotiğe geliştirdiği direnç mekanizmaları *P.aeruginosa*'yı oldukça önemli bir bakteri haline getirmektedir. Biyofilm oluşturma yetenekleri, etken oldukları hastalıkların semptomlarının daha şiddetli seyretmesine ve tedavi güçlüğüne neden olmaktadır. Bu çalışmada, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan piperasilin/tazobaktam (TZP) ve siprofloksasin (CIP) antibiyotiklerinin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) *P.aeruginosa*'nın biyofilm yapımı üzerine etkilerinin ve biyofilm oluşum şiddeti ile quorum sensing (QS) genleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 24 *P.aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Her izolat için TZP ve CIP antibiyotiklerinin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Antibiyotiksiz ortamda ve antibiyotiklerin sub-MİK (MİK/2, MİK/4 ve MİK/8) konsantrasyonlarındaki biyofilm tabakası taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Biyofilm özellikleri belirlenmiş 24 izolatın

**İletişim (Correspondence):** Dr. Öğr. Üyesi Berna Erdal, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye. Tel (Phone): +90 282 250 5586, E-posta (E-mail): berdal@nku.edu.tr

QS genleri (*lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhIR*) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile kromozomal DNA'nın amplifikasyonu yapılarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, iki antibiyotiğin de sub-MİK konsantrasyonlarında, antibiyotiksiz durum ile karşılaştırıldığında, biyofilm yapımını doz bağımlı olarak azalttığı ve en fazla biyofilm oluşumunun azaldığı konsantrasyonun MİK/2 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, SEM görüntülerine bakılarak da doğrulanmıştır. Çalışmada; orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm oluşturan toplam 19 izolatta *lasI*, *lasR* ve *rhlI* genleri tespit edilirken, *rhIR* geni, kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların altısında, orta kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların dördünde, zayıf biyofilm oluşturan izolatların ise üçünde tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *P.aeruginosa*'nın biyofilm yapımı üzerine etkilerinin araştırılması ve biyofilm yapımı ile ilişkili QS sistemlerinin araştırılarak daha iyi anlaşılması yeni tedavi yaklaşımlarının bulunmasına olanak sağlayacak ve yüksek morbidite ve mortaliteye sahip enfeksiyonlarla mücadelede farklı seçenekler sunabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyal; biyofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; sub-MİK; quorum sensing.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a non-fermentative, oxidase-positive, motile gram-negative bacillus widespread in nature. The virulence factors of *P.aeruginosa* including the ability to grow under minimal growth conditions, the widespread presence in nature, and the ability to form biofilms make *P.aeruginosa* a highly important bacterium along with its resistance mechanisms against many antibiotics. The ability to form biofilms increases the symptom severity in diseases caused by *P.aeruginosa* and causes difficulties in the treatment. The aim of this study was to investigate the effects of sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of piperacillin/tazobactam (TZP) and ciprofloxacin (CIP) which are used for the treatment of *P.aeruginosa* infections on biofilm formation and to investigate the relationship between the severity of biofilm formation and Quorum Sensing (QS) genes. The study included 24 *P.aeruginosa* isolates from the culture collection of Medical Microbiology Laboratory of Gazi University Faculty of Medicine. MIC values of TZP and CIP antibiotics were determined by the microdilution method. The biofilm layers in the antibiotic-free medium and in the sub-MIC (MIC/2, MIC/4 ve MIC/8) concentrations of antibiotics were visualized by using a scanning electron microscope (SEM). The QS genes (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, and *rhIR*) of the 24 isolates with known biofilm characteristics were identified via the amplification of chromosomal DNA by using PCR method. In the study, it was found that both antibiotics reduced biofilm formation in a dose-dependent manner in sub-MIC concentrations compared to the antibiotic-free condition and that MIC/2 was the concentration, which reduced the biofilm formation most. These results were further confirmed by viewing the SEM images. The QS genes *lasI*, *lasR*, and *rhlI* were detected in a total of 19 isolates with moderately strong and strong biofilm formation, the *rhIR* gene was detected in six of the strong biofilm-forming isolates, in four of the moderately strong biofilm-forming isolates, and in three of the weak biofilm-forming isolates, respectively. The investigation of the effects of sub-MIC concentrations of antimicrobials, used for the treatment of *P.aeruginosa* infections, on the biofilm formation of *P.aeruginosa* and the investigation and better understanding of the QS systems associated with biofilm production will allow for finding out new treatment approaches and offer different options in combating infections with high morbidity and mortality.

**Keywords:** Antimicrobial; biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; sub-MIC; quorum sensing.

## GİRİŞ

*Pseudomonas aeruginosa*, immün yetmezliği olan, uzun süre kemoterapi veya radyoterapi alan, metabolik veya malign hastalığı olan bireylerde, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde akut ve kronik enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Özellikle hastane enfeksiyonlarına yol açan patojenlerin başında yer almaktadır<sup>1,2</sup>.

*P.aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların kontrolü, antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkması nedeni ile güçleşmektedir. Beta-laktamaz üretimi gibi çeşitli mekanizmalar

sonucu, antibiyotiklere karşı hızla direnç kazanma yeteneğine sahip *P.aeruginosa*'nın tedavisinde ciddi sorunlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca artan antibiyotik direnci, hastalığın ortaya çıkma oranını ve *P.aeruginosa* enfeksiyonuna bağlı mortaliteyi artırmaktadır<sup>1,3</sup>. Beta-laktam grubu bir antibiyotik olan piperasilin, beta-laktamaz inhibitörü olan tazobaktam ile birlikte, beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa*'nın neden olduğu ağır enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır<sup>4</sup>. Aynı şekilde siprofloksasin (CIP) de *P.aeruginosa*'nın neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Sık kullanılmasına bağlı olarak CIP'ye dirençli *P.aeruginosa* izolatlarının oranı hızla artış göstermektedir<sup>2</sup>.

*P.aeruginosa*'nın pek çok virülans faktörü yanında, son yıllarda biyofilm yapma ve quorum sensing (QS) yeteneği önem kazanmıştır. Biyofilmler, antimikrobiyal ilaçlara dirence neden olmaları, sürekli enfeksiyon kaynağı olabilmeleri, patojen mikroorganizmaları barındırmaları, direnç plazmitlerinin karşılıklı olarak geçişine yol açmaları nedeni ile virülansın artışında etkin rol oynayan faktörlerden biridir.

*P.aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu da içeren birçok virülans faktörü üretiminin düzenlenmesinde QS'nin görev aldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, özellikle biyofilmin yapılanma, olgunlaşma ve dağılma aşamalarında QS sisteminin rolü açıkça gösterilmiştir<sup>5,6</sup>. Gen ekspresyon analizleri ile *P.aeruginosa*'daki çok sayıda genin QS sistemleri tarafından düzenlendiği görülmüştür. *P.aeruginosa*'da *las*, *rhl*, PQS ve entegre QS (IQS) olmak üzere dört tip QS sistemi bulunmaktadır. *Las* QS sistemi, sinyal sentaz *lasI* tarafından N-3-oksododekanoil homoserin laktonlarının (N-3-C12-HSL) üretiminde ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden sinyalin reseptör *lasR* tarafından algılanmasında rol oynar. *Rhl* QS sisteminde *rhlI*, N butanoil-L-homoserin laktonun (C4-HSL) sentezinde rol oynar ve sinyal reseptörü olan *rhlR*, C4-HSL ona bağlandığında hedef gen ekspresyonunu indüklemektedir<sup>1</sup>.

Bu çalışmada, *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan piperasilin/tazobaktam (TZP) ve CIP antibiyotiklerinin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) *P.aeruginosa*'nın önemli virülans faktörlerinden biri olan biyofilm yapımı üzerine etkilerinin araştırılması ve bu etkinin, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca biyofilm oluşumu ile ilişkili *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* QS genlerinin varlığının araştırılması ve biyofilm yapım şiddeti ile QS genleri arasında ilişki olup olmadığının gösterilmesi de çalışmanın ikinci amacı olarak belirlenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bakteri İzolatları

Çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan TZP ve CIP'ye duyarlı (sırasıyla, n= 15 ve n= 21) ve dirençli (sırasıyla, n= 9 ve n= 3) olarak saptanan 24 *P.aeruginosa* izolatı dahil edildi. İzolatlar özel bir hasta grubuna ait olmamakla birlikte, balgam (n= 2), endotrakeal aspirat (ETA) (n= 2), idrar (n= 5), yara (n= 6), kan, gaita (n= 9) gibi çeşitli klinik örneklerden izole edildi. Pozitif kontrol olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı. Bakterilerin tanımlanması, konvansiyonel yöntemler ve API 20 NE sistemi (BioMérieux, Fransa) ile yapıldı.

## Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan *P.aeruginosa* izolatlarının TZP ve CIP antibiyotik duyarlılıkları, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)] önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. TZP için inhibisyon zon çapı  $\geq 21$  mm olan izolatlar duyarlı,  $\leq 14$  mm olanlar dirençli; CIP için inhibisyon zon çapı  $\geq 21$  mm olan izolatlar duyarlı,  $\leq 15$  mm olanlar ise dirençli kabul edildi<sup>7</sup>.

## MİK ve Sub-MİK'lerin Belirlenmesi

TZP ve CIP antibiyotiklerinin her bir izolat için MİK değerleri, CLSI M100 rehberine göre önerilen mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak katyon eklenmiş Mueller Hinton buyyon (CAMHB, Fluka, İspanya) besiyeri kullanılarak saptandı<sup>7</sup>. CIP, 128-0.0625  $\mu\text{g/ml}$ , TZP 1024-0.5  $\mu\text{g/ml}$  MİK aralığında çalışıldı. 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklık standardındaki bakteri süspansiyonları hazırlanan plaklara uygun miktarda eklenerek 20 saat 37°C'de inkübasyon sonunda plaklar hem gözle hem de 450 nm'de spektrofotometrede (Biotek, ABD) okutuldu. Üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. Her izolatın MİK değerlerinin 1/2, 1/4 ve 1/8 konsantrasyonları sub-MİK değerleri olarak kabul edildi.

## Biyofilm Yapımının Değerlendirilmesi

Biyofilm yapımının değerlendirilmesinde mikrotitrasyon plak yöntemi kullanıldı. %1 glukoz içeren Luria Bertani buyyon (LB, Himedia, Hindistan) besiyeri içinde 0.5 McFarland ayarında bulanıklık olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından eşit miktarlarda 96 kuyucuklu mikropalak içerisine dağıtıldı. Hazırlanan her izolat için üç kuyucuk kullanıldı. Negatif kontrol olarak, bakteri içermeyen %1 glukoz içeren LB besiyeri kullanıldı. Mikropalaklar 37°C'de 24 saat aerop ortamda inkübe edildikten sonra tutunamayan bakterileri uzaklaştırmak için üç kez distile su ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa %0.1 kristal viyole çözeltilisinden eşit miktarlarda dağıtılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikropalaklar distile su ile tekrar üç kez yıkandı ve kurutuldu. Kuyucuk çeperine tutunan film tabaka, %95'lik etanol ilavesiyle 10 dakika çözdürülerek, 570 nm'de ELISA okuyucu (Biotek, ABD) ile okutuldu<sup>8</sup>. TZP ve CIP sub-MİK konsantrasyonlarında (MİK/2, MİK/4 ve MİK/8) biyofilm oluşumları da aynı yöntem ile belirlendi. Sonuçlar, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşunun absorbanans değerleri %100 kabul edilerek karşılaştırmalı olarak yorumlandı.

## Biyofilm Tabakasının Taramalı Elektron Mikroskop ile Görüntülenmesi

Her antibiyotik için kuvvetli biyofilm oluşturan birer izolat seçildi ve  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml bakteri süspansiyonları hazırlandı. Yirmi dört kuyucuklu hücre kültür plaklarına yerleştirilen "coverslip" (Erie Scientific, Amerika)'lerin üzeri eşit miktarlarda TSB (LAB M, İngiltere) besiyeri ile kaplandı. Antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarından ve hazırlanan bakteri süspansiyonlarından ilgili kuyucuklara eşit miktarlarda eklendikten sonra plaklar 37°C'de 20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklar üç kez distile su ile yıkandı. Sub-MİK konsantrasyonlarda oluşan biyofilm tabakalarını incelemek üzere "coverslip"ler, kritik nokta kurutma cihazında (Leica EM CPD030, Avusturya) kurutulduktan sonra alüminyum taşıma haznelerine sıvı gümüş ile yapıştırıldı ve kaplama cihazında (Denton vacuum,

LLC Desk V sputter/etch unit, Amerika) altın-paladyum (AuPd) ile kaplandı. Taramalı elektron mikroskopunda (Zeiss EVO LS 10, Almanya) incelenerek fotoğraflandı.

### DNA İzolasyonu

Biyofilm özellikleri belirlenmiş 24 izolatin QS genleri (*lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR*), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile kromozomal DNA'nın amplifikasyonu yapılarak saptandı. Bu yöntemde, DNA eldesi için ekstraksiyon kiti (Invitex GmbH, Berlin) ile üretici firmasının önerileri doğrultusunda tasarlanmış DNA ekstraksiyon protokolü kullanıldı. Elde edilen DNA örnekleri Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Örnekler kullanılana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. QS mekanizmasında rol alan *lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR* genleri için Tablo 1'de verilen oligonükleotit primerler kullanıldı<sup>9</sup>.

### "Quorum Sensing" Genlerinin Amplifikasyonu

5  $\mu\text{l}$  10 x amplifikasyon tampon çözeltisi, 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 5  $\mu\text{l}$  dNTP karışımı (2 mM), 0.26  $\mu\text{l}$  Taq DNA polimeraz (5 U) (Bioron, Almanya), her bir primerden 0.6  $\mu\text{l}$  (50 pmol), 32.54  $\mu\text{l}$  distile su ve 3  $\mu\text{l}$  DNA içeren amplifikasyon reaksiyonları toplam hacim 50  $\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlandı. Örneklerin amplifikasyonları; termal döngü cihazında (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) ön denatürasyon için  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika ve 34 döngü  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 30 saniye denatürasyon,  $50^{\circ}\text{C}$ 'de 30 saniye bağlanma,  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dakika uzama sonrası ardından  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika ek uzama aşaması olacak şekilde gerçekleştirildi. İstisna olarak *rhIR* geni için primer bağlanma aşaması,  $52^{\circ}\text{C}$ 'de 30 saniye şeklinde uygulandı.

Amplifikasyon ürünlerinin bant büyüklükleri; *lasI* geni: 605 baz çifti (bp), *lasR* geni: 725 bp, *rhII* geni: 625 bp, *rhIR* geni: 730 bp şeklinde tespit edildiğinde gen pozitifliği saptandı. Agaroz elektroforez sırasında PCR ile pozitif kontrol olarak çalışılan *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu ve DNA moleküler ağırlık belirteci (Seegene, Kore) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius, ABD) ile PCR ürünleri görüntüledi<sup>9,10</sup>.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde, IBM SPSS® 15 (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanıldı. Genel verilerinin değerlendirilmesinde ve biyofilm yapımı ile QS genlerinin karşılaştırılmasında ki-kare testi, antimikrobiyallerin biyofilm oluşumuna etkilerinin değerlendirilmesinde ise Friedman varyans analizi ve Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon W analiz testleri kullanıldı.  $p \leq 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo 1.** "Quorum Sensing" Gen Amplikonları İçin Kullanılan Primerler

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>lasI</i>	5'-ATG ATC GTA CAA ATT GGT CGG C-3'	5'-GTC ATG AAA CCG CCA GTC G-3'
<i>lasR</i>	5'-ATG GCC TTG GTT GAC GGT T-3'	5'-GCA AGA TCA GAG AGT AAT AAG ACC CA-3'
<i>rhII</i>	5'-CTT GGT CAT GAT CGA ATT GCT C-3'	5'-ACG GCT GAC GAC CTC ACA C-3'
<i>rhIR</i>	5'-CAA TGA GGA ATG ACG GAG GC-3'	5'-GCT TCA GAT GAG GCC CAG C-3'

## BULGULAR

*P.aeruginosa* izolatları, balgam (n= 2), ETA (n= 2), idrar (n= 5), yara (n= 6) ve kan, biyopsi, gaita vb. çeşitli klinik örneklerden (n= 9) elde edilmiştir. İzolatların 21'i CIP'ye duyarlı, üçü dirençli ve 15'i TZP'ye duyarlı, dokuzu dirençli bulunmuştur.

İzolatların beşinin zayıf, altısının orta kuvvetli, 13'ünün kuvvetli biyofilm oluşturdukları saptanmıştır. Diğer klinik örneklerden farklı olarak balgam (n= 2) ve ETA (n= 2) örneklerinin tamamının ATCC 27853'ten kuvvetli biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Biyofilm oluşumu ve örneklerin izole edildiği bölgeler karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız bulunmuştur (p= 0.166).

İzolatların biyofilm ölçümleriyle direnç durumları karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p<sub>CIP</sub>= 0.731; p<sub>TZP</sub>= 0.104). *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşuna oranla zayıf biyofilm oluşturan beş izolatın tamamının TZP'ye, dördünün ise CIP'ye duyarlı olduğu saptanmıştır (Tablo II).

*P.aeruginosa* izolatlarının MİK değerleri, CIP için 0.125-32 µg/ml, TZP için ise 2-256 µg/ml aralığında saptanmıştır. Zayıf biyofilm oluşturan beş izolatın her iki antibiyotik için MİK değerlerine bakıldığında kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların MİK değerlerine kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur. Tüm izolatlar için bulunan absorbans değerlerinin ortalamasına bakıldığında, CIP'nin MİK/2 konsantrasyonda, kontrol olarak kullanılan antibiyotiksiz kuyucuğun %18.2'si; MİK/4 konsantrasyonda %25.2'si; MİK/8 konsantrasyonda ise %26.8'i kadar absorbans verdiği saptanmıştır. TZP antibiyotiğinin ise MİK/2 konsantrasyonda kontrolün %15.2'si; MİK/4 konsantrasyonda %19.4'ü; MİK/8 konsantrasyonda ise %25'i kadar absorbans verdiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda, iki antibiyotiğin de sub-MİK konsantrasyonlarında, antibiyotiksiz durum ile karşılaştırıldığında, biyofilm yapımını doz bağımlı olarak azalttığı ve en fazla biyofilm oluşumunun azaldığı konsantrasyonun MİK/2 olduğu tespit edilmiştir.

Her iki antibiyotiğin MİK/2, MİK/4, MİK/8 konsantrasyonlarında biyofilm gelişimi üzerine etkileri karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p> 0.05).

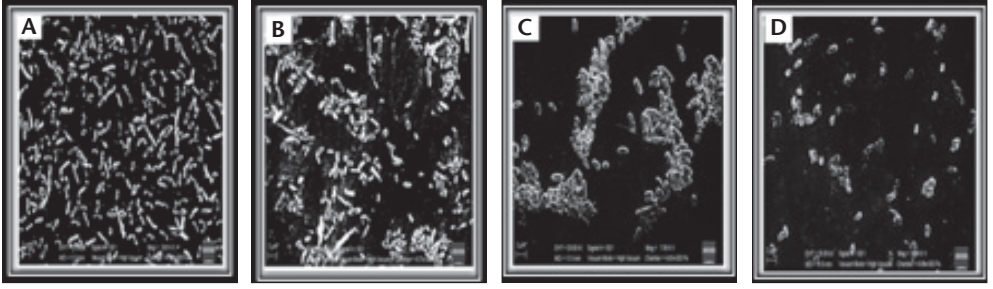
Biyofilm yapımının en fazla antibiyotiklerin MİK/2 konsantrasyonlarında azaldığı sonucu SEM görüntülerine bakılarak doğrulanmıştır (Resim 1,2).

**Tablo II.** Biyofilm Şiddeti ile Siprofloksasin ve Piperasilin/Tazobaktam Duyarlılıkları Arasındaki İlişki

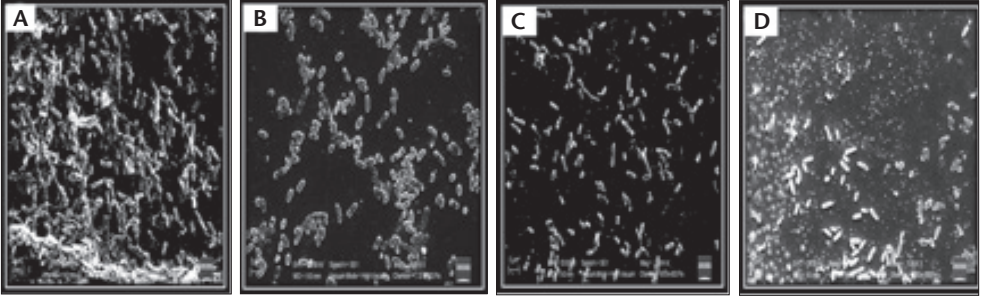
Biyofilm oluşumu	Siprofloksasin			Piperasilin/Tazobaktam		
	*R	*D	Toplam	*R	*D	Toplam
Kuvvetli (n)	1	12	13	7	6	13
Orta kuvvetli (n)	1	5	6	2	4	6
Zayıf (n)	1	4	5	0	5	5
Toplam (n)	3	21	24	9	15	24

\*R: Dirençli, \*D: Duyarlı.



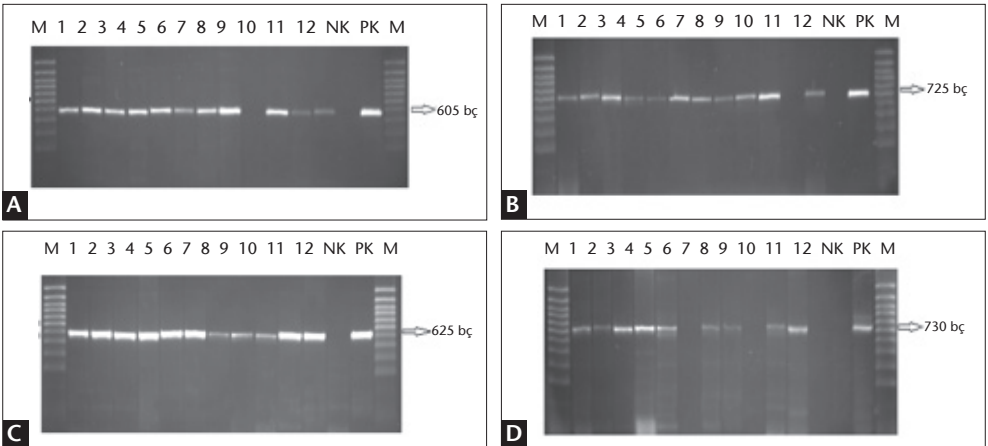


**Resim 1.** A. Antibiyotiksiz ortamda ve B. Piperasilin/tazobaktam MİK/8, C. MİK/4, D. MİK/2 konsantrasyonlarında *P.aeruginosa* biyofilm tabakasının SEM görüntüsü.



**Resim 2.** A. Antibiyotiksiz ortamda ve B. Siprofloksasin MİK/8, C. MİK/4 D. MİK/2 konsantrasyonlarında *P.aeruginosa* biyofilm tabakasının SEM görüntüsü.

Çalışmada incelenen 24 izolatın 23'ünde; *lasI* (605 bp) ve *lasR* (725 bp) genlerini belirten amplifikasyon ürünü saptanırken, bir izolatta *lasI* ve *lasR* gen amplifikasyon ürünü saptanmamıştır. *LasI* ve *lasR* genleri negatif olan izolatın, yara yerinden izole edilen aynı izolat olduğu görülmüştür. Çalışmada incelenen 24 izolatın hepsinde *rhlI* geni (625 bp), 13'ünde *rhlR* geni (730 bp) saptanmış, 11 izolatta ise *rhlR* geni saptanmamıştır. Bazı izolatların amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü Resim 3'te gösterilmiştir.



**Resim 3.** A. *lasI*, B. *lasR*, C. *rhlI* ve D. *rhlR* genlerinin jel görüntüsü.  
M: Moleküler ağırlık standardı, PK: *P.aeruginosa* ATCC 27853 NK: Negatif kontrol.

**Tablo III.** "Quorum Sensing" Gen Varlığının Biyofilm Düzeylerine Göre Dağılımı

	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhII</i>	<i>rhIR</i>
Kuvvetli biyofilm (n)	13	13	13	6
Orta kuvvetli biyofilm (n)	6	6	6	4
Zayıf biyofilm (n)	4	4	5	3
Toplam (n)	23	23	24	13

QS gen varlığının biyofilm düzeylerine göre dağılımı Tablo III'te verilmiştir. Zayıf, orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm oluşturan izolatlar arasında QS gen varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ).

## TARTIŞMA

*P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde biyofilm oluşumunun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarının artması ile birlikte biyofilm direncini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar önem kazanmıştır<sup>6,11</sup>.

2018 yılında yapılan bir çalışmada, 40 *P.aeruginosa* klinik izolatının %42.5'inin (n= 17) zayıf biyofilm, %27.5'inin (n= 11) orta kuvvetli biyofilm, %7.5'inin (n= 3) kuvvetli biyofilm oluşturduğu, ancak, %22.5'inin (n= 9) biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir<sup>12</sup>. Aynı araştırmacıların, ventilatör ilişkili pnömoni hastalarının ETA (n= 19) ve bronkoalveoler lavaj (n= 1) örneklerinden izole edilen toplam 20 klinik *P.aeruginosa* izolatının biyofilm üretimini kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki farklı yöntem kullanarak değerlendirdikleri başka bir çalışmada, kantitatif yöntem ile izolatların %75'inin biyofilm oluşturduğu (%25 biyofilm oluşturmayan, %40 zayıf, %25 orta ve %10 kuvvetli biyofilm oluşturan) bulunmuştur<sup>13</sup>. Bu çalışmada; klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının tamamının (n= 24) biyofilm üretme yeteneğinde olduğu, ancak biyofilm üretim oranlarında literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi farklılıklar görüldüğü tespit edilmiştir. Kuvvetli biyofilm üretiminin en fazla olduğu grubun, solunum yolu örnekleri olan ETA ve balgam örnekleri olduğu görülmüştür. Bu sonuç, *P.aeruginosa* izolatlarının kuvvetli biyofilm yapma yeteneklerinin ciddi solunum yolu enfeksiyonlarına yol açmasına zemin hazırlayan bir faktör olabileceği fikrini desteklemektedir.

*P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan CIP ve beta-laktamaz inhibitörü bir antibiyotik olan TZP direnciyle ilgili literatürde çok sayıda yayına rastlamak mümkündür<sup>14-16</sup>. Bu çalışmalara bakıldığında, *P.aeruginosa* izolatlarının direnç paternlerinin, çalışmanın yapıldığı yıl, bölge ve hastaneye göre değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmaya dahil edilen izolatların üçünün CIP'ye dirençli, 21'inin duyarlı; TZP'ye ise dokuzunun dirençli, 15'inin duyarlı olduğu bulunmuştur. TZP'nin direnç oranı, CIP'ye kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir.



Solunum yolu enfeksiyonları, dünya çapında yaygın morbidite ve mortalite nedenlerindedir. Özellikle alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarında çoklu antibiyotik direncine rastlanmaktadır<sup>17</sup>.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, *P.aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları değerlendirilmiş; yara (n= 38) ve idrar (n= 36) örneklerinden izole edilen izolatlarla kıyasla solunum sistemi izolatlarında (n= 52) TZP direnç oranının daha yüksek olduğu (n= 33, %63), CIP direnç oranının ise yara izolatlarında (n= 19, %50) daha yüksek olduğu (n= 30, %58) bulunmuştur<sup>18</sup>.

Gram-negatif bakterilerdeki antimikrobiyal direnç ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, balgam ve ETA gibi solunum yolu örneklerinden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının, kan ve idrar örneklerinden izole edilenlere göre daha fazla biyofilm oluşturduğu ve bu izolatların TZP ve CIP gibi antimikrobiyal ajanlara daha dirençli oldukları, biyofilm yapımı ile CIP direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (p= 0.041)<sup>19</sup>. Bu çalışmada, alt solunum yolu örneği olan ETA örneklerinden izole edilen iki izolatın da kuvvetli biyofilm yaptığı ve bu izolatların TZP'ye dirençli oldukları saptanmıştır. Bu sonuç, alt solunum yollarında kolonize olan *P.aeruginosa*'nın tedavisi güç, ağır klinik tablolara neden olabileceğini bir kez daha düşündürmektedir. Ayrıca çalışmada, bakterilerin biyofilm yapma yeteneklerinin azalması ile antimikrobiyallere olan duyarlılıklarında artış olabileceğini destekleyen bir sonuç olarak, *P.aeruginosa* ATCC 27853'e oranla daha az biyofilm oluşturan beş izolatın tamamının TZP'ye, dördünün ise CIP'ye duyarlı olduğu saptanmıştır.

Disk difüzyon yönteminin, sadece serbest bakterilerin direnç profilini yansıtması nedeni ile bu çalışmada, biyofilm oluşumunun antibiyotik direncine olan gerçek etkisini anlayabilmek için kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK dozlarda biyofilm yapımını nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Antibiyotiklerin sub-MİK'lerinin enfeksiyona karşı konakçı savunmasına yardım edecek antimikrobiyal etkiyi sağlayabildiği bildirilmiştir. Bu konsantrasyonların, bakteri hücre duvarında değişiklik, mikrobiyal aderansta ve biyofilm yapımında azalma, fagositer aktivitenin artışı, mikrobiyal toksinlerin salınımının azalması gibi etkiler yaparak mikroorganizmalar üzerine etki ettikleri gösterilmiştir<sup>20</sup>.

*P.aeruginosa*'ya karşı yüksek bakterisidal aktiviteye ve terapötik etkinliğe sahip olduğu bilinen CIP, birçok gram-negatif patojene karşı tercih edilen bir ilaçtır. *P.aeruginosa*'nın PAO1 standart suşu ve dört klinik izolatın dahil edildiği Hindistan'da yapılan bir çalışmada, CIP sub-MİK konsantrasyonunun (MİK/4) *P.aeruginosa* kayma, yüzme ve titreme hareketlerini, proteaz, elastaz, ramnolipid, aljinat ve siderofor gibi virülans faktörlerinin üretimini ve biyofilm yapımını anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (p< 0.05)<sup>21</sup>.

Literatürde sayılı çalışmalardan olan bir grup araştırmacının yapmış olduğu bir çalışmada; TZP sub-MİK'lerinin (MİK/2), *P.aeruginosa* fenotipine ve fizyolojik özelliklerine bağlı hareketini, morfolojik özelliklerini değiştirdiği ve biyofilm yapımını azalttığı bulunmuş-

tur<sup>22</sup>. Bu çalışmada ise CIP ve TZP'nin sub-MİK'lerde, *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu anlamlı olarak azalttığı ve bu azaltıcı etkinin doza bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Sub-MİK'lerde en belirgin azalma MİK/2 değerinde belirlenmiştir. Bu durum, biyofilm oluşumu üzerine her iki antibiyotiğin de aynı oranda etki ettiği sonucunu göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, enfeksiyon hastalıklarının doğru tedavisinde; uygun ajanın seçimi kadar en etkili dozun saptanmasının da önem arz ettiği sonucuna varılmaktadır<sup>20-22</sup>.

Bu çalışmanın sonuçları, sub-MİK'lerde kinolon grubu antibiyotiklerden CIP'nin ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarından olan TZP'nin biyofilm gelişimini azalttığını göstermektedir. Buna göre, CIP ve TZP'nin *P.aeruginosa* kaynaklı biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde iyi bir tercih olabileceği sonucuna varılabilmektedir.

Gelişen teknolojiyle beraber, deneysel biyofilm çalışmalarında kullanılan yöntemlerin sayısı da artmaktadır. Her geçen yıl geniş bir araştırmacı kitlesi, farklı görüntüleme yöntemlerini kullanarak, *P.aeruginosa* tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin sub-MİK'lerinde biyofilm yapısında meydana gelen değişiklikleri araştırmaktadır<sup>20,21</sup>.

Yapılan bir çalışmada, seftazidimin MİK/4 konsantrasyonu ile *P.aeruginosa* PAO1 standart suşunun 48 saat inkübasyonu sonunda biyofilm yapımındaki azalma konfokal lazer tarama mikroskopu kullanılarak belirlenmiştir<sup>20</sup>. Bu çalışmada, biyofilm oluşumunun en fazla her iki antibiyotiğin MİK/2 konsantrasyonlarında azaldığı SEM kullanılarak gösterilmiştir.

Bakteri popülasyonunun QS mekanizması aracılığı ile bir koordinasyon içinde davranıldığı düşünülmektedir. Biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere bakteriyel patojeniteyi destekleyen virülans faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyen sistemlerin arasında QS önemli bir rol oynamaktadır<sup>12</sup>.

2018 yılında bir grup araştırmacı tarafından farklı klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının biyofilm yapımı ve ilişkili QS genlerinin varlığının araştırıldığı bir çalışmada, izolatların %77.5'inin biyofilm oluşturduğu ve bu izolatların %100'ünde *lasR*, *rhII* ve *rhIR* genleri tespit edilirken, %97.5'inde *lasI* geni saptanmıştır. Biyofilm oluşturmaya dokuz izolatta tüm genlerin varlığı gösterilmiştir. Biyofilm üretmeyen dokuz izolatta üçünde bu genlerle ilgili amplikonlar sekanslanmış ve standart biyofilm üreten PAO1 suşu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, *lasR* proteininin sekanslanması sırasında valin amino asidinin eklenmesine neden olan üç nükleotidin (T, C ve G) insersiyonu gösterilmiştir<sup>12</sup>. Bu çalışma sonucunda; zayıf, orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm oluşturan tüm izolatlarda (n= 24) *rhII* geni tespit edilmiştir. Bu sonuca bağlı olarak *rhII* geninin biyofilm oluşumunun her aşamasında önemli bir rol aldığı söylenebilir. Orta kuvvetli ve kuvvetli biyofilm oluşturan izolatların tamamında (n= 19) *lasI/lasR* genlerinin saptanmış olması ayrıca dikkat çekici bir sonuçtur. Bu sonuç, olgun biyofilm yapısının oluşmasında *las* sisteminin gerekliliğini destekler nitelikte görünmektedir. *RhIR* geninin bazı izolatlarda gösterilememesi; *rhIR* gen bölgesi için tasarlanmış primerlerin, primer bağlanma bölgesindeki nokta mutasyon, baz kaybı gibi nedenlerle bağlanamaması sonucu amplifikasyonun gerçek-

leşemediği şekilde yorumlanabilir. Bu izolatlardaki mutasyon varlığının ileri moleküler incelemelerle aydınlatılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak; CIP ve TZP gibi *P.aeruginosa*'ya yönelik antimikrobiyallerin doz aralıklarının tekrar değerlendirilmesinin klinik uygulamalarda önemli olacağı düşünülmektedir. Klinik izolat sayısının az olması ve izolatların özel bir hasta grubuna ait olmaması çalışmanın kısıtlayıcı yanlarıdır. Bu nedenle, antimikrobiyallerin sub-MİK'lerinin *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavi sürecine olan katkıları hakkında yeterli bilgi sağlayabilmek amacıyla sonuçlarımızın, daha fazla sayıda izolata dahil edildiği geniş ölçekli çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca biyofilmde önemli rol aldığı düşünülen QS sisteminin moleküler yöntemlerle araştırılmasının etkin tedavi yaklaşımının planlanması açısından son derece önemli olacağı kanısına varılmıştır. *P.aeruginosa* virülans faktörlerinin hangi mekanizmalarla düzenlendiği ile ilgili bilgilerimizin artması, tedavide yeni gen hedeflerinin belirlenmesini, tedavi stratejilerini ve başarısını olumlu yönde etkileyecektir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayına gerek bulunmamaktadır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. J Microbiol Biotechnol 2017; 27(6): 1053-64.
2. Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. J Med Microbiol 2019; 68(1): 1-10.
3. Aykan ŞB, Çiftçi İH. Meta-Analiz: Türkiye'de *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının son 11 yıldaki antibiyotik direnç değişimi. Mikrobiyol Bul 2015; 49(3): 352-65.
4. Goel N, Bhambhwani V, Ghosh B. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis in a silicone oil-filled eye treated with piperacillin/tazobactam: report of a case and review of literature. Int Ophthalmol 2015; 35(4): 599-602.
5. Pérez-Pérez M, Jorge P, Rodríguez PG, Pereira MO, Lourenço L. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. Biofouling 2017; 33(2): 128-42.
6. Nicholas MM, Brahmchetna B, Ruxana TS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. Am J Respir Cell Mol Biol 2018; 58(4): 428-39.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017. 27th ed. Wayne, PA
8. Qu L, She P, Wang Y, Liu F, Zhang D, Chen L, et al. Effects of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. MicrobiologyOpen 2016; 5(3): 402-12.
9. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, et al. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 9): 841-53.
10. Senturk S, Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Yagci A. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. J Infect Dev Ctries 2012; 6(06): 501-7.
11. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv 2019; 37(1): 177-92.

12. Lima JLC, Alves LR, Jacomé PRLA, Neto JPB, Maciel MAV, Morais MMC. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz J Infect Dis* 2018; 22(2): 129-36.
13. Lima JLC, 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.
14. Pokharel K, Dawadi BR, Bhatt CP, Gupte S. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and its antibiotic sensitivity pattern. *J Nepal Health Res Counc* 2019; 17(1): 109-13.
15. Abuhussain SSA, Sutherland CA, Nicolau DP. Single  $\beta$ -lactams versus combinations as empiric therapy for infections with *Pseudomonas aeruginosa*: assessing the in vitro susceptibility. *Infect Dis* 2020; 52(1): 33-8.
16. Barrio-Tofiño ED, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(11): e01589-17.
17. Davis R, Brown PD. Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential in respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *J Med Microbiol* 2016; 65(4): 261-71.
18. Karakeçe E, Terzi HA, Çiftçi İH. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirmesi. *Medeniyet Med J* 2014; 29(1): 20-3
19. Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, et al. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Microb Drug Resist* 2019; 25(1): 72-9.
20. Otani S, Hiramatsu K, Hashinaga K, Komiya K, Umeki K, Kishi K, et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Infect Chemother* 2018; 24(6): 428-33.
21. Gupta P, Chhibber S, Harjai K. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res* 2016; 143(5): 643-51.
22. Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *J Appl Microbiol* 2007; 103(5): 1828-37.