



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen pseudomonas aeruginosa suşlarının virulans faktörlerinin incelenmesi

Investigation of virulence factors of pseudomonas aeruginosa strains isolated from various clinical samples

Salih Maçın¹, Fatma Nur Akdoğan Kıttana², Yakut Akyön Yılmaz²

¹Şırnak Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şırnak, Turkey

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, Turkey

Cukurova Medical Journal 2017;42(2):308-313

Abstract

Purpose: Pseudomonas aeruginosa is an aerobic, non-spore forming, straight or slightly curved, gram-negative bacilli and it can grow at 42 °C. Virulence factors of P. aeruginosa are various and its morbidity, mortality and antibiotic resistance rates are increasing constantly. The aim of this study was to examine the virulence factors of P. aeruginosa isolates that isolated from various sites of the body.

Material and Method: Isolates of patients that were identified as P. aeruginosa were included into the study (n:258). Identification was done in Hacettepe University Hospital Microbiology Laboratory. DNase, protease, elastase, pyocyanin, mucoid phenotype, haemolysis and motility tests were performed as phenotypic tests.

Results: Positivity rates of the virulence factors are; 190 (73.6%) elastase, 170 (65.9%) protease, 222 (86%) motility, 56 (21.7%) pyocyanin, 205 (79.5%) hemolysis, 67 'si (26%) DNase and 53 (20.5%) mucoid phenotyp, respectively.

Conclusion: Since the diversity of virulence factor produced by P. aeruginosa and antibiotic resistance rate increase, it causes difficult to treat infections. The data will provide an insight into new approaches to treatment.

Key words: Pseudomonas aeruginosa, virulence factors, bacteraemia.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa); aerob, sporsuz ve oksidaz pozitif Gram negatif bir basildir. Sağlıklı bireylerin normal florasında bulunan P. aeruginosa en sık gastrointestinal sistem, boğaz, burun mukozası ile koltuk altı, perine gibi nemli deri

Öz

Amaç: Pseudomonas aeruginosa aerob, sporsuz, düz veya hafif kıvrımlı, 42 C° de üreyebilen Gram negatif basillerdir. P. aeruginosa; ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız çeşitli klinik örneklerden izole edilen P. aeruginosa suşlarının virulans faktörlerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hastalara ait örneklerden izole edilen ve P.aeruginosa olarak tanımlanan 258 suş çalışmaya dahil edildi. Fenotipik testler olarak DNaz, proteaz, elastaz, piyosiyanın, mukoid fenotip, hemoliz ve hareket testi çalışıldı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen suşların 190'ı (%73.6) elastaz, 170'i (%65.9) proteaz, 222'si (%86) hareket, 56'sı (%21.7) piyosiyanın, 205'i (%79.5) hemoliz, 67'si (%26) DNaz, 53'ü (%20.5) mukus varlığı açısından pozitif saptanmıştır.

Sonuç: P. aeruginosa ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve artan antibiyotik direnç oranlarıyla tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Elde edilen verilerin yeni bir tedavi stratejisine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Pseudomonas aeruginosa, Virulans faktörleri, bakteriyemi.

yüzeylerinde kolonize olur. P. aeruginosa sağlıklı kişilerde hastalık oluşturmazken, konak savunmasının bozulduğu durumlarda çeşitli virulans faktörlerinin etkisiyle ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Çok çeşitli virulans faktörlerinin de katkısı ile septisemi, üriner enfeksiyon, akut ve kronik akciğer enfeksiyonları, endokardit, dermatit ve

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Salih Maçın, Şırnak Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Şırnak, Turkey E-mail: salihmacin@hotmail.com
Geliş tarihi/Received: 03.09.2016 Kabul tarihi/Accepted: 12.10.2016

osteokondrit gibi enfeksiyon hastalıklarına yol açar¹. *P. aeruginosa* özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan majör patojendir ve dünya genelinde nozokomiyal enfeksiyonların % 10-15'inden sorumludur².

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogeneğinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Bakterinin virulans faktörleri hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenebilir. Virulans faktörlerinin salınımı; üremenin olduğu, hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar. Virulans faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi karmaşık bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır. Virulans faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı özgül virulans faktörleri kodlayan gendeki yeniden düzenlemeleri, promotör veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir³.

P. aeruginosa çeşitli genler aracılığı ile hücre dışı proteinler ile ilişkili virulans faktörleri salgılar. Adezinler, pyosiyinin, elastaz, proteazlar, hemolizinler, ekzotoksin ve ekzoenzim *S. P. aeruginosa* suşlarında tanımlanmış virulans faktörleridir. Bu çalışmadaki amacımız, çeşitli vücut bölgelerinde enfeksiyon hastalığına yol açan *P. aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerini incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

P. aeruginosa Suşları

Çalışmamıza çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları (n:258) dahil edilmiştir. Çalışmaya herhangi bir vücut bölgesinden alınan örnekten izole edilen *P. aeruginosa* suşları dahil edilmiş olup hiçbir hastalık grubu veya örnek çeşidi dışlanmamıştır. Bakterilerin tanımlama işlemleri "Phoenix" (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Fenotipik testler

Her hastadan sadece tek klinik örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) suşu kullanılmıştır. Elastaz ve proteaz testlerinde pozitif kontrolün yanısıra negatif kontrol olarak *Pseudomonas*

aeruginosa PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları da kullanılmıştır.

Elastiyolitik aktivitenin araştırılmasında "Elastin Congo red" (ECR) ölçüm yöntemi uygulandı. Tüm klinik suşlar, *P. aeruginosa* PAO1, PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları luria bertani broth (LBB) içinde 37° C'de bir gece inkübe edildi. Yarı nicel olarak elastaz üretiminin saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* suşları (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1, PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları için hazırlanan bakteri süspansiyonları soğutmalı santrifüjde çevrilerek, elde edilen süpernatantlardan 0,5 ml, 1 ml 30 mM Tris ve 10 mg elastin kongo kırmızısı (pH: 7,2) içeren tüplere eklendi. Tüm suşlar 37°C'de 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra tüpler 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve her bir suş için ikişer kuyucuğa 200 ml süpernatant koyularak absorbans değerleri 495 nm'de optik okuyucu ile ölçüldü. Her suş için iki kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla elastaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları ile yapılan çalışmaların ortalamalarına iki standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değeri 0,474 olarak belirlendi, 495 nm'de absorbans değeri >0.474 saptanan suşlar elastaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi.

Alkali proteaz aktivitesinin değerlendirilmesi için BHI içinde %3 "skim milk", %1.5 agar olacak şekilde hazırlanan "skim-milk" agar (SMA) kullanıldı. Klinik örneklerden izole edilen bakteri süpernatantının 20 µl'si SMA'da steril pastör pipeti aracılığı ile hazırlanmış olan kuyucuklar içine kondu. Besiyeri 25°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri konan kuyucukların etrafında şeffaflaşma zonu görülmesi proteaz aktivitesi pozitif olarak yorumlandı⁵.

Bakterilerin %5 koyun kanlı agara ekimleri yapıldı ve 37 °C de 24 saat inkübasyondan sonra hemoliz oluşumu belirlendi. Hareket (Twitching) testi için suşlar, hareket besiyerinin dibine kadar iğne öze ile batırılarak ekildi. Kültürler 37 °C' de 24-48 saat inkübe edildi. Ekim yapılan alandan çevreye doğru üremeler ve sisli zon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Kanlı agarda üremiş olan bakteriden steril bir öze yardımıyla alınan koloniler DNaz agar test besiyeri üzerine çizgi şeklinde inoküle edildi. Plaklar 18 ila 24 saat boyunca aerobik olarak 37 °C'de inkübe

edildi. Bakteri kolonileri etrafında herhangi bir berraklaşma saptanmaması DNaz negatif olarak kabul edildi. Bakterilerin ekim çizgisinin etrafında açık zonlar oluşması ise DNaz pozitif kabul edildi. Mukoid koloni oluşturan suşların saptanması amacıyla tüm klinik örneklerin Mueller Hinton agar ekimleri yapıldı ve 24 saat 37 °C de inkübe edildi. Piyosyanin pigmentinin tespiti amacıyla, Pseudomonas agar P (King A) besiyeri yüzeyine, Pseudomonas suşlarından ekim yapıldı. 18-24 saat inkübasyondan sonra UV ışık altında incelendi. Mavimsi yeşil ya da mavi renkte oluşumlar piyosyanin pigment olarak değerlendirildi.

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'nun onayı (20.02.2013 tarihli ve 17388665/285 sayılı) alınmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme yapılırken tanımlayıcı istatistikler yüzde ve sıklık olarak verildi. Tüm analizler, IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistics 21.0 programından yararlanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada izole edilen 258 P. aeruginosa suşunun 93'ü balgam, 69'u kan, 32'si derin trakeal aspirat (DTA), 22'si idrar, 17'si pü, 15'i yanık yarası, 5'i bronkoalveolar lavaj (BAL), 4'ü dren ve 1'i konjonktiva örneğinden izole edilmiştir (Tablo 1). Hastaların ortalama yaşı 38.17 (± 27.2) olup, en genci bir, en yaşlısı 92 yaşındadır.

Tablo 1. P. aeruginosa izolatlarının izole edildikleri klinik örnekler göre dağılımı (n:258)

Klinik Örnek	Sayı	Yüzde (%)
Balgam	93	36
Kan	69	26.7
Derin Trakeal Aspirat	32	12.4
İdrar	22	8.5
Pü	17	6.5
Yanık yarası	15	5.8
Bronkoalveolar lavaj sıvısı	5	1.9
Dren	4	1.5
Konjonktiva	1	0.4

Tablo 2. P. aeruginosa suşlarının izole edildikleri bölgelere göre sahip oldukları virulans faktörlerinin dağılımı

Virulans Faktör	Balgam	Kan	DT A	İdrar	Pü	Yanık yarası	BAL	Dren	Konjonktiva	Toplam
Elastaz	73 (%78.5)	43 (%62.3)	24 (%75)	16 (%72.7)	14 (%82.4)	13 (%86.6)	4 (%80)	2 (%50)	1 (%100)	190 (%73.6)
Proteaz	61 (%65.6)	37 (%53.6)	20 (%62.5)	19 (%86.4)	17 (%100)	9 (%60)	5 (%100)	1 (%25)	1 (%100)	170 (%65.9)
Hareket	83 (%89.2)	53 (%76.8)	30 (%93.7)	20 (%90.1)	15 (%88.2)	14 (%93.3)	5 (%100)	1 (%25)	1 (%100)	222 (%86)
Piyosyanin	19 (%20.4)	21 (%30.4)	9 (%28.1)	3 (%13.6)	3 (%17.6)	1 (%6.6)	0	0	0	56 (%21.7)
Hemoliz	72 (%77.4)	53 (%76.8)	25 (%78.1)	19 (%86.4)	17 (%100)	10 (%66.6)	5 (%100)	3 (%75)	1 (%100)	205 (%79.5)
DNaz	20 (%21.5)	19 (%27.5)	16 (%50)	5 (%22.7)	2 (%11.8)	5 (%33.3)	0	0	0	67 (%26)
Mukus	24 (%25.8)	21 (%30.4)	1 (%3.1)	2 (%9.1)	2 (%11.8)	1 (%6.6)	1 (%20)	1 (%25)	0	53 (%20.5)

Çalışmaya dahil edilen 258 P. aeruginosa suşunun 190'ı (%73.6) elastaz, 170'i (%65.9) proteaz, 222'si (%86) hareket, 56'sı (%21.7) piyosyanin, 205'i (%79.5) hemoliz, 67'si (%26) DNaz, 53'ü (%20.5)

mukus varlığı açısından pozitif saptanmıştır (Tablo 2). Püydten izole edilen suşların tamamında proteaz ve hemoliz varlığı saptanmıştır. Tüm klinik örneklerde mukus varlığı düşük oranlarda bulunurken, suşların çoğunun hareketli olduğu saptanmıştır. En fazla balgam örneklerinde mukoid yapı saptanmıştır (%25.8). Piyosiyanın pigmenti ise en sık kan kültürlerinden izole edilen suşlarda saptanmıştır (%30.4).

TARTIŞMA

P. aeruginosa son yıllarda yükselen insidansı, ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği nedeniyle sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkenidir. Genellikle sağlıklı kişilerde hastalık oluşturmamasına rağmen bağışık yanıtın yetersiz olduğu durumlarda salgıladığı çeşitli virulans faktörlerinin etkisi ile hayatı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Özellikle kistik fibrozis, kanser, yanık, immünsüpresif ve travmatik yararı olan hastalarda mortalite ve morbiditesi yüksek, ciddi enfeksiyonlar oluşturmaktadır.

Akciğer dokusuna yerleşme ve yayılımda, elastaz ve proteaz üretiminin önemli bir virulans faktörü olduğu bilinmektedir. Elastaz, elastin proteinini harap eder. Elastin insan akciğer dokusunun majör elamanıdır, ekspansiyon ve kontraksiyondan sorumludur. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastaz mikroorganizmanın doğal bariyerlerinin bütünlüğünü bozarak doku invazyonu yapar⁶. Ayrıca alkali proteazın da elastaz gibi silyalı solunum yolu epiteli üzerine yıkıcı özelliği olduğu gösterilmiştir⁷. Alkali proteaz enzimi karaciğer, kornea ve deride nekroz oluşturur. Proteazlar doku harabiyeti oluşturdukları için aynı zamanda bakterinin dokular arasında yayılımını kolaylaştırır. Bu nedenle bakterinin patogeneziinde önemli rol oynayan virulans faktörlerinin daha iyi anlaşılmasının özellikle sürekli ventilatöre bağlı ve pnömoni riski taşıyan süregen hastalarda ve immün sistemin baskılandığı durumlarda tedavinin düzenlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalarla virulans faktörleri ile *P. aeruginosa*'nın izole edildiği vücut bölgeleri arasında ki ilişki incelenmiş ve *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çıragil ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının elastaz, proteaz ve alginat özellikleri çalışılmıştır Alkali proteaz varlığını alt

solunum yolu izolatlarında %61 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise balgam örneklerindeki proteaz pozitifliği % 65.6 olarak bulunmuştur. Elastaz üretiminde ise vücut bölgelerine göre istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır⁸. Alt solunum yolu örneklerinde %73, idrar örneklerinde %76 ve kan örneklerinde %84 oranında elastaz pozitif bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da izolatların çoğu elastaz pozitif (%73.6) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşlardaki elastaz üretimi %77.7, idrar örneklerinde %72.7 ve kan örneklerinde ise % 62.3 olarak saptanmıştır.

Piyosiyanın *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan mavi yeşil renkli pigment olup memeli hücrelerini ve bakterileri öldürebilen redoks-aktif fenazin bileşiğidir. *Pseudomonas* türleri arasında sadece *P. aeruginosa* piyosiyanın üretmektedir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen birçok virulans faktörünün yanında piyosiyanınin tespitinde yaşana zorluklar nedeniyle piyosiyanınin çoğul hücresele fonksiyonları ile ilişkisi in vitro olarak yapılan çalışmalarla gösterilmesine rağmen klinik olarak enfeksiyonlardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır⁹. Piyosiyanınle ilgili yapılan çalışmalarda solunum yollarındaki epitelyal hücrelerde silyal fonksiyonları inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁰. Çalışmamızda balgam örneklerinde %20.4, derin trakeal aspirat örneklerinde ise %28.1 olarak bulunmuş olup toplam %21.7 oranında saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada idrar örneklerinde piyosiyanın üretimini yara örneklerine göre daha fazla olduğu bulunmuştur¹¹. Bizim çalışmamızda da idrar örneklerinde saptanan piyosiyanınin üretimi (%13.5) yara örneklerinden (%6.6) daha fazla bulunmuştur.

Hareket sayesinde bakteri besin elde eder ve toksik maddelerden kaçır. Hareket özelliği sayesinde *P. aeruginosa* konak hücresine translokasyon yapar, oluşturduğu koloni içerisinde yer değiştirir ve biyofilm içinde hareket eder. *P. aeruginosa* suşları genellikle hareketli olarak bilinmesine karşın özellikle kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında hareket özelliği daha az saptanmaktadır¹². Çalışmamızda ise 258 suşun 222'si (%86) hareketli olarak bulunmuştur. DNaz varlığı özellikle şiddetli *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında daha sık görülmektedir. Fegan ve arkadaşları kistik fibrozis hastalarının virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmalarında; 206 *P. aeruginosa* suşunu incelemiş ve DNaz varlığını %63.3 olarak saptamışlardır¹³. Çalışmamızda ise en yüksek DNaz varlığı DTA

(%50) ve yanık yarası (%33.3) örneklerinden saptanmıştır. Toplam DNaz varlığı ise %26 olarak saptanmıştır. Aradaki fark araştırmacıların kistik fibrosis gibi kronik hasta grubuyla çalışması ile açıklanabilir. Araştırmacılar hemoliz varlığını %74.7 oranında saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da uyumlu şekilde %79.5 olarak saptanmıştır. En yüksek hemoliz oranları pü (100%) ve BAL (100%) örneklerinde saptanmıştır. Mukoid fenotipe dönüşüm başta alt solunum yolu enfeksiyonlarında olmak üzere birçok vücut bölgesinde görülebilen bakterinin en önemli adaptasyonlarından biridir¹². Çalışmamızda en yüksek mukoid fenotip kan (%30.4) ve balgam (%25.8) örneklerinde saptanmıştır.

Çalışmamızda konjoktivadan izole edilen *P. aeruginosa* suşu elastaz, proteaz, hareket ve hemoliz gibi virulans faktörlerine sahip olduğu saptanmıştır. Esterellas ve ark yaptığı çalışmada göz örneklerinde alkali proteaz varlığı saptanmıştır¹⁴. Başka bir çalışmada da gözden alınan bir örnekten *P. aeruginosa*'nın virulans faktörleri çalışılmış bizim sonuçlarımıza benzer şekilde DNaz aktivitesi gösterilememiştir¹⁵.

Araştırmada incelenen *P. aeruginosa* suşlarının birçoğunun vücut bölgesi ayırtılmaksızın elastaz proteaz ve hemoliz enzimlerini ürettikleri saptanmıştır. Bakteriyemiye neden olan suşlarda ise hareket özelliği daha az fakat mukoid yapı ise diğer bölgelere nazaran daha fazla saptanmıştır. Bakterinin mukoid yapıdaki kapsüllü formunun kan örneklerinde daha fazla saptanması, kanda bulunan vücudun savunma hücrelerinden korunmak için bir adaptasyon yöntemi olduğu söylenebilir. Tahrip olmuş dokulardaki nükleik asitleri parçalamaya yarayan DNaz enziminin, yanık hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında yüksek bulunması da dikkat çekicidir. Çalışmamızın kısıtlılığı olarak; *P. aeruginosa*'nın virulans faktörleriyle ilişkili genlerinin genotipik düzeyde de incelenememesi gösterilebilir.

P. aeruginosa suşlarının vücudun birçok bölgesinde enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir. *P. aeruginosa* ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve yerleştiği vücut bölgesine adaptasyonu sebebiyle tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle bakterinin patogenezinde önemli rol oynayan virulans faktörlerinin daha iyi anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Elde edilen veriler; günümüzde bazı suşları çoğul antibiyotik dirençli ve hatta pan-rezistan olan *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu, (özellikle persistan ve kronik olmak üzere)

enfeksiyonların tedavisindeki yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Palleroni NJ. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology-Sgm*. 2003;149:1-7.
2. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bile J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*. 1998;4:242-7.
3. Woods DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*. 2004;12:437-9.
4. Petermann SR, Doetkott C, Rust L. Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:632-6.
5. Burke V, Robinson JO, Richardson CJL, Bundell CS. Longitudinal-studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic-fibrosis. *pathology*. 1991;23:145-8.
6. 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.
7. Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML. Disruption of respiratory cilia by proteases including those of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1986;54:379-85.
8. Çırağil P, Söyletir G. Çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aljinat elastaz ve alkali proteaz üretimleri. *Mikrobiyol Bül*. 2004;38:341-7.
9. Lau GW, Hassett DJ, Ran HM, Kong FS. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004;10:599-606.
10. Ohfujii K, Sato N, Hamada-Sato N, Kobayashi T, Imada C, Okuma H et al. Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosens Bioelectron*. 2004;19:1237-44.
11. 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;53:841-53.
12. Cullen L, McClean S. Bacterial adaptation during chronic respiratory infections. *Pathogens*. 2015;4:66-89.
13. Fegan M, Francis P, Hayward AC, Davis G, Fuerst JA. Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1143-6.

14. Estrellas PS, Alionte LG, Hobden JA. A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Contact Lens-Induced Acute Red Eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr Eye Res.* 2000;20:157-65.
15. Finlayson EA, Brown PD. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Med J.* 2011;60:24-32.