

SIĞIR KARKASLARINDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİ İLE QUORUM SENSING VE MAJOR KARBAPENEMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Tolga UYANIK^{1*}, Ayşegül BÖLÜKBAŞ¹, Ali GÜCÜKOĞLU¹,
Özgür ÇADIRCI¹, Merve Gizem SEZENER KABAY²**

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş/Received: 08.04.2024; Kabul /Accepted: 23.07.2024; Online baskı /Published online: 27.07.2024

Uyanık, T., Bölükbaş, A., Gücükoğlu, A., Çadircı, Ö., Sezener Kabay, M. G. (2024). Sığır karkaslarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri ile quorum sensing ve major karbapenemaz genlerinin araştırılması. GIDA (2024) 49 (4) 730-740 doi: 10.15237/gida.GD24043

Uyanık, T., Bölükbaş, A., Gücükoğlu, A., Çadircı, Ö., Sezener Kabay, M. G. (2024). Assessment of biofilm formation, quorum sensing and major carbapenemase genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cattle carcasses. GIDA (2024) 49 (4) 730-740 doi: 10.15237/gida.GD24043

ÖZ

Bu çalışma mezbahalardaki sığır karkaslarından izole edilen ve fenotipik olarak karbapenem direnci gösteren *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerini kalitatif ve kantitatif yöntemlerle araştırmak, karbapenem direncinden sorumlu major karbapenemaz ve ayrıca quorum sensing (*lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR*) genlerinin varlığı belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her biri farklı bir sığır karkas yüzeyinden izole edilen ve moleküler yöntemlerle doğrulanmış 13 *P. aeruginosa* suşu materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada tüm *P. aeruginosa* suşlarının test edilen karbapenemlerden en az birine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Karbapenemaz genleri (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}*) hiçbir izolatta tespit edilememiştir. Karbapenem direnci gösteren tüm izolatların kantitatif olarak güçlü biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. PCR analizleri doğrultusunda analiz edilen 13 izolattan 12'sinin (%92.3) *lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR* genlerinin tümünü içerdiği tespit edilmiştir. Bir izolatanın (%7.69) sadece *lasR* ve *rhIR* genlerini içerdiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile hayvansal orijinli *P. aeruginosa* suşlarında karbapenem direncinin ve biyofilm üretiminin birbirleriyle ilişki içerisinde olduğu belirlenmiştir. Halk sağlığının korunması açısından çiğ etlerden kaynaklanabilecek kontaminasyona karşı dikkatli olunması tavsiye edilmektedir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, biyofilm, karbapenem, karkas, mezbaha

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: tolga.uyanik@omu.edu.tr

☎: (+90) 362 312 1919-3541

☎: (+90) 362 457 6622

Tolga Uyanık; ORCID no: 0000-0002-3181-3878

Ayşegül Bölükbaş; ORCID no: 0000-0002-5516-3689

Ali Gücükoğlu; ORCID no: 0000-0002-8465-7768

Özgür Çadircı; ORCID no: 0000-0003-2018-2545

Merve Gizem Sezener Kabay; ORCID no: 0000-0003-0487-7515

ASSESSMENT OF BIOFILM FORMATION, QUORUM SENSING AND MAJOR CARBAPENEMASE GENES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM CATTLE CARCASSES

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the biofilm formation capacity of carbapenem resistant *P. aeruginosa* strains isolated from cattle carcasses by using qualitative and quantitative methods, and also to determine the presence of major carbapenemase and quorum sensing genes. In the study, 13 *P. aeruginosa* strains, each isolated from a different cattle carcass surface and confirmed by molecular methods, were used as materials. Determination of carbapenem resistance was carried out by disk diffusion method. The presence of *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, and *bla*_{IMP} genes was investigated by PCR. Biofilm production was determined by qualitative and quantitative methods. In order to detect quorum sensing systems, the presence of *lasI*, *lasR*, *rbII*, and *rbIR* genes was investigated by PCR. In the study, all *P. aeruginosa* strains were found to be resistant to at least one of the carbapenems tested. Carbapenemase genes could not be detected in any isolate. All isolates showing carbapenem resistance were found to be quantitatively strong biofilm producers. According to PCR analyses, 12 of the 13 isolates analyzed (92.3%) were found to contain all *lasI*, *lasR*, *rbII* and *rbIR* genes. It was determined that one isolate (7.69%) contained only *lasR* and *rbIR* genes. With this study, it was determined that carbapenem resistance and biofilm production in *P. aeruginosa* strains of animal origin are related.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, biofilm, carbapenem, carcass, slaughterhouse

GİRİŞ

İnsanoğlunun varoluşundan bu yana beslenmede kritik öneme sahip olan kırmızı et, yüksek kaliteli protein kaynağı olmasının yanında içerdiği esansiyel aminoasit, yağ asitleri, vitamin ve mineraller dolayısıyla beslenmede önemli rol oynamaktadır (Wyness, 2016). Dünya çapında kırmızı ete karşı artan talep ile beraber, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2023 yılında kişi başı kırmızı et tüketimi 25,5 kg olarak bildirilmiştir (USDA, 2023). Ülkemiz verilerine göre 2022 yılında kişi başı kırmızı et tüketimi 18,44 kg iken, 2023 yılı için bu miktarın 19,64 kg olacağı öngörülmektedir (TEPGE, 2023). Kırmızı etin dengeli diyetin bir parçası olarak yeterli miktarlarda tüketilmesi esansiyel besin maddelerinin vücuda alınmasına katkı sağlamaktadır (McAfee vd., 2010). Beslenme açısından üstün özelliklerinin yanı sıra kırmızı et, aynı zamanda gerek patojen gerekse bozulmaya neden mikroorganizmaların gelişimi için oldukça elverişli bir ortam olarak ön plana çıkmaktadır.

Sığır karkasları mikrobiyotasında bulunan başlıca bakteri familyaları *Pseudomonaceae*, *Burkholderiaceae*, *Moraxellaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* ve *Listeriaceae* olarak bildirilmektedir (Botta vd., 2023). Bununla beraber karkasta

bozulmaya sebep olan başlıca bakterilerin ise *Enterobacteriaceae* familyası, laktik asit bakterileri, *Brochothrix thermosphacta* ve *Pseudomonas* spp. olduğu ortaya konmuştur. Bu bakteriler arasında özellikle *Pseudomonas*'lar oksijene olan affiniteleri, hızlı çoğalabilmeleri ve düşük sıcaklıklarda üreyebilmelerinden dolayı aerobik koşullarda depolanan etlerin bozulmasından sorumlu tutulmaktadır (McSharry vd., 2021). *Pseudomonas* cinsi içerisindeki bakteriler, gıdalarda bozulmaya sebep olmalarının yanında nozokomiyal pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları ve kistik fibrozis gibi vakalarda fırsatçı patojenler olarak görülmektedir (Reynolds ve Kollef, 2021). *Pseudomonas aeruginosa*, bu cins içerisinde yer alan çeşitli virülans faktörlere sahip, biyofilm oluşturabilen ve çoklu antibiyotik direnci gösteren en önemli tür olarak ön plana çıkmaktadır (Li vd., 2023). Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri'nin (CDC) 2022 yılı raporuna göre en önemli antimikrobiyal direncine sahip mikroorganizmalardan biri olarak kabul edilen *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, 2020 yılında bir önceki yıla göre %32 artış göstermiştir (CDC, 2022).

P. aeruginosa, virülans faktörlerinin ekspresyonunda ve biyofilm oluşumunda

Quorum Sensing (QS) sistemini kullanan en yaygın bakterilerden biridir. ‘Çoğunluk algılama’ olarak da adlandırılan ‘Quorum Sensing’, otoindüktörler olarak bilinen hücre dışı sinyal moleküllerinin üretimini, tespitini ve bu moleküllere karşı oluşturulan yanıtı içeren bir bakteriyel hücre-hücre iletişim sistemidir (Miller ve Bassler, 2001). Bakteri popülasyonundaki yoğunluk arttıkça otoindüktörler çevrede birikmekte ve bakteriler kolonizasyonlarını kontrol etmek ve toplu olarak gen ifadelerini değiştirmek için bu iletişim yolundan yararlanmaktadır (Ng ve Bassler, 2009). QS ve biyofilm oluşumu arasındaki bağlantıyı incelemek için *P. aeruginosa* model bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir. Günümüzde *P. aeruginosa*’da *las*, *rhl*, PQS ve IQS olmak üzere dört farklı QS sistemi bildirilmiştir (Lee ve Zhang, 2015). Biyofilm formasyonu ile beraber aralarında elastaz, proteazlar, piyosiyenin, lektin, ekzotoksin A ve rhamnolipidlerin de bulunduğu pek çok virülans faktörün QS sistemi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Rutherford ve Bassler, 2012). Literatürde klinik *P. aeruginosa* suşlarında görülen karbapenem direnci ve biyofilm oluşturma özelliği arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli araştırmalara (Gonçalves vd., 2017; Viducic vd., 2017; El-Mahdy ve El-Kannishy, 2019; El Askary, 2020) rastlanılmasına rağmen, hayvansal kökenli *P. aeruginosa* suşlarının karbapenem direnci ve biyofilm oluşturma yeteneği ile bilgilerin sınırlı olduğu görülmüştür.

Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada Samsun ilindeki mezbahalardaki sığır karkaslarından izole edilen ve fenotipik olarak karbapenem direnci gösteren *P. aeruginosa* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri kalitatif ve kantitatif yöntemlerle, karbapenem direncinden sorumlu major karbapenemaz (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}*) ve ayrıca quorum sensing (*las* ve *rhl*) genlerinin varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın ilk etabında her biri farklı bir sığır karkas yüzeyinden (tüm numuneler kesim işlemi takiben derinin yüzülmesi aşamasının hemen ardından toplanmıştır) izole edilmiş, biyokimyasal

ve moleküler yöntemlerle (*oprI* geninin PCR ile tespiti ile) (De Vos vd., 1997) doğrulanmış 70 *Pseudomonas* spp. suşunun tür bazında identifikasyonu gerçekleştirildi. *P. aeruginosa* identifikasyonu De Vos vd. (1997) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı. Bu amaçla *oprI* geninin tespitine yönelik PCR çalışmaları gerçekleştirildi. PCR çalışmalarında kullanılan primerler Çizelge 1’de gösterildi. PCR çalışmaları doğrultusunda her biri farklı bir sığır karkas yüzeyinden izole edilen 70 *Pseudomonas* spp. suşunun 13’ü *P. aeruginosa* olarak belirlenerek çalışmada materyal olarak kullanıldı.

Karbapenem direncinin belirlenmesi

Fenotipik karbapenem direncinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. İzolatların meropenem (10 µg, CT0774B, Oxoid), imipenem (10 µg, CT0455B, Oxoid), ve doripenem (10 µg, CT1880B, Oxoid) karşı olan duyarlılıkları EUCAST (2024) talimatları doğrultusunda Mueller-Hinton Agar (CM0337B, Oxoid) kullanılarak tespit edildi. Antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları ölçüldü ve elde edilen sonuçlar EUCAST (2024) dökümanına göre yorumlandı ve izolatların direnç (R) ve duyarlılık (S) durumları belirlendi.

Major karbapenemaz genlerinin PCR ile belirlenmesi

Literatürde büyük beşli olarak adlandırılan ve karbapenem direncinden sorumlu tutulan KPC, OXA-48, NDM, VIM ve IMP karbapenemazlarının belirlenmesi amacıyla *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* genlerinin tespitine yönelik PCR çalışmaları her bir gen için tekli olarak gerçekleştirildi. PCR çalışmalarında kullanılan primerler Çizelge 1’de gösterildi. Her bir gen için ayrı olarak hazırlanan toplam 25 µL hacimdeki PCR miksi içeriği belirtildiği şekilde hazırlandı: 12,5 µL PCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, K0171), 0,4 mM her bir primer ve 1 µL kalıp DNA. Amplifikasyon koşulları 95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon; 35 siklus boyunca 95 °C’de 30 saniye denatürasyon, 55 °C’de 30 saniye primer bağlanması (*bla_{KPC}* için 58 °C, *bla_{VIM}* için 52 °C ve *bla_{IMP}* için 49 °C), 72 °C’de 30 saniye primer uzaması ve son olarak 72 °C’de 8 dakika son uzama olarak uygulandı.

P. aeruginosa suşlarında karbapenem direnci ve biyofilm üretimi

Çizelge 1. PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri
Table 1. Primer sequences used in PCR assays

Primer / Primer	Sekans (5' - 3') / Sequence (5' - 3')	Gen / Gene	Ürün / Product	Kaynak / Reference
oprI-F	ATGAACAACGTTCTGAAATTTCTCTGCT	<i>oprI</i>	249 bp	(De Vos vd., 1997)
oprI-R	CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG			
oprL-F	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC	<i>oprL</i>	504 bp	(De Vos vd., 1997)
oprL-R	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG			
lasI-F	GTGTTCAAGGAGCGCAAAGG	<i>lasI</i>	238 bp	(Hemati vd., 2014)
lasI-R	AACGGCTGAGTTCCCAGATG			
lasR-F	TCGAACATCCGGTCAGCAAA	<i>lasR</i>	128 bp	(Hemati vd., 2014)
lasR-R	GTTACATTGGCTTCCGAGC			
rhII-F	CCGTTGCGAACGAAATAGCG	<i>rhII</i>	308 bp	(Hemati vd., 2014)
rhII-R	CAGTTCGACCATCCGCAAAC			
rhIR-F	TCGCTCCAGACCACCATTTTC	<i>rhIR</i>	284 bp	(Hemati vd., 2014)
rhIR-R	GACGGAGGCTTTTTGCTGTG			
KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTC	<i>bla_{KPC}</i>	902 bp	(Endimiani vd., 2008)
KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCC			
OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla_{OXA-48}</i>	743 bp	(Poirel vd., 2012)
OXA-48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
NDM-F	GGTTTGCGGATCTGGTTTTC	<i>bla_{NDM}</i>	621 bp	(Poirel vd., 2011)
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
VIM-F	AGTGGTGAGTATCCGACAG	<i>bla_{VIM}</i>	261 bp	(Gröbner vd., 2009)
VIM-R	ATGAAAGTGCGTGGAGAC			
IMP-F	GTTTATGTTTCATACWTCG	<i>bla_{IMP}</i>	432 bp	(Hujer vd., 2006)
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCAC			

Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

Karbapenem direnci gösteren izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespiti amacıyla Kongo kırmızısı agar (KKA) yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Christensen yöntemi) ve mikropalak yöntemi olmak üzere üç farklı metot kullanıldı. Bu şekilde izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri hem kalitatif hem de kantitatif olarak tespit edildi. KKA yönteminde Kongo kırmızısı agara pasajlanan izolatlar 37

°C'de 24 saat inkübe edildi. Siyah koloni oluşumu biyofilm pozitif, kırmızı-pembe kolonilerin oluşması biyofilm negatif olarak değerlendirildi (Freeman vd., 1989). Modifiye tüp aderans yönteminde izolatlar %3 glikoz içeren Tryptone Soy Broth (TSB, NCM0019A, Neogen) içerisinde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından tüpler boşaltılarak fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkandı ve %0.1'lik kristal viyole ile 30 dakika muamele edildi. Tüplerdeki aderasın

dercesine göre biyofilm oluşumu negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak değerlendirildi (Christensen vd., 1982). Kantitatif olarak biyofilm oluşumu belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu polisteren plakalarda mikropalak yöntemi uygulandı (Stepanović vd., 2007). Negatif kontrol olarak sadece TSB içeren kuyucuklar baz alındı. Cutoff OD değeri (OD_c), negatif kontrolün ortalama değeri olarak belirlendi (OD ≤ OD_c = biyofilm negatif, OD_c < OD ≤ 2 × OD_c = zayıf biyofilm, 2 × OD_c < OD ≤ 4 × OD_c = orta düzey biyofilm, OD > 4 × OD_c = güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlendi). Testler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Quorum Sensing genlerinin PCR ile belirlenmesi

Las ve rhl QS sistemlerinin araştırılması amacıyla *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin tespitine yönelik PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılan primer dizileri Çizelge 1’de gösterildi. Her bir gen için ayrı olarak hazırlanan toplam 25

µL hacimdeki PCR miks final konsantrasyonları: 1X Taq buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP miks, 0.2 µM her bir primer, 0.5 U Taq polimeraz ve 1 µL kalıp DNA olarak hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon; 33 siklus boyunca 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, 61 °C’de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama olarak uygulandı.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada analiz edilen 13 *P. aeruginosa* suşunun tümünün analiz edilen karbapenemlerden en az birine karşı dirençli olduğu tespit edildi. En yüksek direncin meropenem (%100) karşı olduğu belirlenirken bunu imipenem (%38.4) takip ettiği görüldü. En düşük direnç doripenem (%23) karşı belirlendi. İki izolatin analiz edilen üç farklı karbapenem karşı dirençli olduğu tespit edildi. İzolatların karbapenemlere karşı duyarlılıklarına ilişkin veriler Çizelge 2’de gösterildi.

Çizelge 2. *P. aeruginosa* izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri
Table 2. Phenotypic and genotypic characteristics of *P. aeruginosa* isolates

Tür / Species	Antibiyotik direnci / Antibiotic resistance			Quorum sensing / Quorum sensing				Biyofilm / Biofilm			Karbapenemaz genleri / Carbapenemase genes
	M	İ	D	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	KKA	MTA	MY	
1 <i>P. aeruginosa</i>	R	R	S	+	+	+	+	+	+++	1,073	*
2 <i>P. aeruginosa</i>	R	R	S	+	+	+	+	+	+++	0,524	*
3 <i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	-	+	-	+	+	+++	1,092	*
4 <i>P. aeruginosa</i>	R	R	S	+	+	+	+	+	+++	1,002	*
5 <i>P. aeruginosa</i>	R	R	R	+	+	+	+	+	+++	0,838	*
6 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	1,081	*
7 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	R	+	+	+	+	+	+++	0,802	*
8 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	1,069	*
9 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	1,077	*
10 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	1,045	*
11 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	0,834	*
12 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	1,071	*
13 <i>P. aeruginosa</i>	R	S	S	+	+	+	+	+	+++	0,930	*

M: Meropenem, İ: İmipenem, D: Doripenem, KKA: Kongo kırmızısı agar, MTA: Modifiye tüp aderans, MY: Mikroplak yöntemi (OD₅₀₀ değerleri), Negatif kontrol OD_c = 0.08, R: Dirençli, S: Duyarlı, +: pozitif, -: negatif, +++: Modifiye tüp aderans yöntemine göre güçlü biyofilm üreticisi, *: major karbapenemaz genleri hiçbir izolatta tespit edilemedi

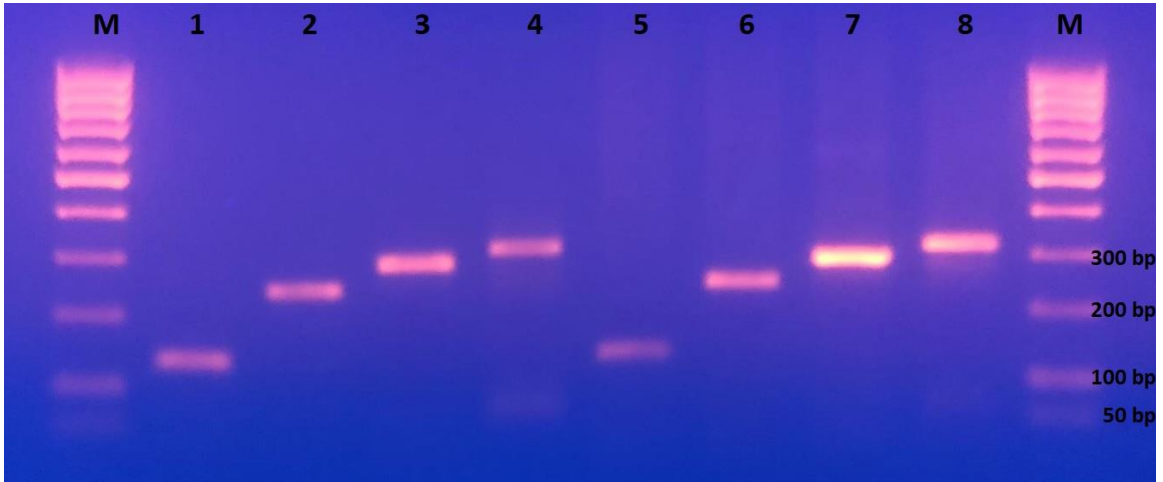
M: Meropenem, İ: Imipenem, D: Doripenem, KKA: Congo red agar, MTA: Modified tube adherence, MY: Microplate method (OD₅₀₀ values), Negative control OD_c = 0.08, R: Resistant, S: Susceptible, +: positive, -: negative, +++: strong biofilm producer according to the modified tube adherence method, *: major carbapenemase genes could not be detected in any isolates

En az bir karbapeneme karşı dirençli olduğu tespit edilen 13 *P. aeruginosa* izolatu major karbapenemaz genlerinin tespiti amacıyla *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* ve *bla_{MIP}* genlerinin tespitine yönelik PCR çalışmalarına tabi tutuldu. Yapılan analizler doğrultusunda izolatların hiçbirinde *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* ya da *bla_{MIP}* genleri tespit edilemedi.

Çalışmada 13 *P. aeruginosa* suşu kalitatif biyofilm üretimi açısından iki farklı yöntemle değerlendirildi. Analiz sonuçlarına göre tüm izolatların hem Kongo red agarda hem de modifiye tüp aderans yöntemiyle biyofilm üreticisi olduğu tespit edildi. Kalitatif olarak biyofilm üreticisi olan tüm suşlar kantitatif olarak analiz

edildi. Mikroplak yöntemine göre kalitatif olarak biyofilm ürettiği tespit edilen izolatların OD₅₀₀ değerleri hesaplandı ve bu suşlar güçlü biyofilm üretici olarak tespit edilerek biyofilm üretimi kantitatif olarak doğrulandı. İzolatların kantitatif ve kalitatif biyofilm üretimine ilişkin veriler Çizelge 2’de gösterildi.

Çalışmada kalitatif ve/veya kantitatif olarak biyofilm ürettiği tespit edilen tüm izolatlarda *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin varlığı araştırıldı. PCR analizleri doğrultusunda analiz edilen 13 izolatın 12’sinin (%92.3) *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin tümünü içerdiği tespit edildi (Şekil 1). Bir izolatu (%7.69) sadece *lasR* ve *rhlR* genlerini içerdiği belirlendi (Çizelge 2).



Şekil 1. *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin UV-transilluminatör altındaki görüntüsü M: 50 bp DNA ladder, Lane 1: *lasR* (128 bp) pozitif kontrol, Lane 2: *lasI* (238 bp) pozitif kontrol, Lane 3: *rhlR* (284 bp) pozitif kontrol, Lane 4: *rhlI* (308 bp) pozitif kontrol, Lane 5-8: Çalışmada *lasR*, *lasI*, *rhlR* ve *rhlI* pozitif olarak tespit edilen bir izolata ait bantlar

Figure 1. Image of *lasI*, *lasR*, *rhlI* and *rhlR* genes under UV-transilluminator M: 50 bp DNA ladder, Lane 1: *lasR* (128 bp) positive control, Lane 2: *lasI* (238 bp) positive control, Lane 3: *rhlR* (284 bp) positive control, Lane 4: *rhlI* (308 bp) positive control, Lane 5-8: Bands belonging to a *lasR*, *lasI*, *rhlR* and *rhlI* positive isolate

P. aeruginosa las ve rhl olmak üzere iki temel QS sistemini içermektedir. Her sistem otoindüktör sentaz *lasI* [N-(3-oksododekanoyl)-L-homoserin lakton] ve *rhlI* (N-bütiril-L-homoserin lakton) ve aynı kökenli transkripsiyonel düzenleyiciler (*lasR* ve *rhlR*) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır (Lee ve Zhang, 2015). *P. aeruginosa* suşlarında farklılaşmış ve güçlü biyofilm yapısının oluşmasında las ve rhl QS sistemlerinin etkili olduğu bildirilmiştir (De Kievit, 2009). Bu

çalışmada *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerini içeren tüm suşların (%92.3) güçlü biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Yalnızca analiz edilen bir izolatu *lasR/rhlR* genlerini içerirken *lasI/rhlI* genlerini içermediği belirlenmiş ve bu izolatu güçlü biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Yapılan literatür taramalarında çalışma bulgularına benzer şekilde *P. aeruginosa* suşlarında *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* genlerinin birlikte bulunma oranları Perez vd. (2013) tarafından yapılan

çalışmada %90.1, Faisal vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada %85, Uzunbayır Akel vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada %68.4, Karatuna ve Yagci (2010) tarafından yapılan çalışmada %62.5 olarak bildirilmiştir.

Çalışmada tüm *P. aeruginosa* suşlarının analiz edilen karbapenemlerden en az birine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın suşların hiçbirinde major karbapenemaz genleri tespit edilememiştir. Karbapenem direnç mekanizmaları arasında major karbapenemazların üretimi, bu enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin plazmitler ve integronlar gibi mobil genetik elemanlar vasıtasıyla taşınmasından ve bakteri türleri arasında aktarılmasından dolayı belirgin bir öneme sahiptir (Halat ve Moubareck, 2020). Ancak *P. aeruginosa* suşlarında gözlenen karbapenem direnci daha yaygın olarak intrinsik faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN gibi efluks pompalarının aşırı ekspresyonu, OprD porininin kaybı ya da ekspresyonunda azalma, veya artmış kromozomal sefalosporinaz aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Meletis vd., 2012). Bununla beraber GES (Guiana extended spectrum), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase) ve SPM (Sao Paulo metallo- β -lactamase) enzimleri de *P. aeruginosa* suşlarında karbapenemleri hidrolize edici aktivite göstermektedir (Cayci vd., 2022). Bu nedenle bu çalışmada KPC, OXA-48, NDM, IMP ve VIM enzimlerinden bağımsız olarak gözlenen karbapenem direncinin yukarıda bahsedilen faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Biyofilmler gıda üretim tesislerinde bir veya birden fazla tür mikroorganizma tarafından oluşturulan karmaşık mikrobiyal ekosistemlerdir. Gıda işletmelerinde oluşan biyofilmler; artan temizlik maliyetleri, artan enerji tüketimi, yüzey korozyon hızını artırması, gıdaların raf ömrünü azaltması gibi ekonomik etkilerin yanı sıra, gıda kaynaklı enfeksiyonların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (Gürlük vd., 2022). Konu ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalarda mezbaha ortamlarından izole edilen *Listeria* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp. ve *E. faecalis* gibi patojen bakterilerin çeşitli düzeylerde (%53-%87.5) biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Gündoğ

vd., 2023; Güngör vd., 2023). Bunun yanı sıra Akyol vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada kasap ve şarküteri ortamlarından izole edilen *S. aureus* suşlarının tamamının biyofilm üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Buna karşın yapılan literatür taramalarında mezbaha ortamlarında *P. aeruginosa*'nın biyofilm üretimine ilişkin verilerin sınırlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada mezbahalardaki sığır karkas yüzeylerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının tamamının (%100) mikropalak yöntemiyle güçlü biyofilm üreticisi olduğu ortaya konmuştur. *Pseudomonas* spp. suşlarında biyofilm üretiminin diğer gıda kaynaklı patojenlere göre daha yaygın olmasının bu sonucun ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Analiz sonuçlarına göre bu çalışmada karbapenem direnci gösteren tüm *P. aeruginosa* izolatlarının aynı zamanda güçlü biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. *Pseudomonas* suşları tarafından oluşturulan biyofilmlerin, antibakteriyel duyarlılığın azalmasına yol açarak enfeksiyonların tedavisinde daha yüksek konsantrasyonda antibiyotik kullanılmasına yol açtığı bildirilmektedir (Karami vd., 2020). Yapılan literatür taramalarında enfeksiyonlardan izole edilen karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm üretmeye daha yatkın olduğu ve bu izolatlarda güçlü biyofilm formasyonunun daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Ochoa vd., 2013; Gonçalves vd., 2017; Cho vd., 2018; Heidari vd., 2022). Günümüzde, *P. aeruginosa* izolatlarında gözlenen karbapenem direnci ve biyofilm oluşumu ilişkisi mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulmamasına da, direnç ve biyofilm oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmektedir (Wang vd., 2023). Biyofilm oluşturma kapasitesi, virülans faktörü ekspresyonu ve çoklu antibiyotik direnci fenotipi birbirleriyle bağlantılı unsurlar olarak kabul edilmektedir (Choy vd., 2008; Abidi vd., 2013). Literatürdeki bilgilere paralel olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda hayvansal gıdalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında da karbapenem direnci ve biyofilm oluşturma yeteneğinin birbiriyle bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada sığır karkaslarının *P. aeruginosa* ile kontaminasyonunun mezbaha ortamında kesimi takiben derinin yüzülmesi aşamasından itibaren gerçekleştiği ortaya konmuştur. Hayvansal orjinli *P. aeruginosa* suşlarında karbapenem direncinin ve biyofilm üretiminin birbirleriyle ilişki içerisinde olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *P. aeruginosa* suşlarının hem karbapenemlere karşı dirençli olması hem de biyofilm üretmesi halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm üretiminde las ve rhl QS sistemlerinin etkili olduğu belirlenirken, karbapenem direncinin major karbapenemazlardan bağımsız olarak oluştuğu gözlemlenmiştir. İleride yapılacak olan çalışmalarla izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının karbapenem direnç mekanizmalarının ortaya konması planlanmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu araştırma makalesinde herhangi bir kişi ve/veya kurum ile çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

YAZAR KATKILARI

Tolga UYANIK çalışma dizaynı, laboratuvar analizleri, bulguların değerlendirilmesi ve makale yazımı; Ayşegül BÖLÜKBAŞ laboratuvar analizleri; Ali GÜCÜKOĞLU bulguların değerlendirilmesi ve süreç yönetimi; Özgür ÇADIRCI metodoloji ve makalenin yazımı; Merve Gizem SEZENER KABAY laboratuvar analizleri konularında katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

Abidi, S.H., Sherwani, S.K., Siddiqui, T.R., Bashir, A., Kazmi, S.U. (2013). Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmology*, 13: 1-6.

Akyol, N., Gündoğ, D.A., Özkaya, Y., Güngör, C., Onmaz, N.E. (2023). Kasap dükkanları ve şarküterilerde gıda ile temas eden yüzeylerden elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin fenotipik ve genotipik karakterizasyonu. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3): 198-205.

Botta, C., Franciosa, I., Coisson, J., Ferrocino, I., Colasanto, A., Arlorio, M., Cocolin, L., Rantsiou, K. (2023). Beef carcass microbiota after slaughtering and primary cooling: A metataxonomic assessment to infer contamination drivers. *Food Research International*, 174: 113466.

Cayci, Y.T., Biyik, I., Birinci, A. (2022). VIM, NDM, IMP, GES, SPM, GIM, SIM metalloβ-lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Turkish university hospital. *Journal of Archives in Military Medicine*, 10(1): e118712.

CDC 2022. COVID-19: U.S. impact on antimicrobial resistance, special report 2022. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/covid-19-impact-report-508.pdf> (Erişim tarihi: 23.04.2024)

Cho, H.H., Kwon, K.C., Kim, S., Park, Y., Koo, S.H. (2018). Association between biofilm formation and antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 48(3): 363-368.

Choy, M.H., Stapleton, F., Willcox, M.D., Zhu, H. (2008). Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens-and non-contact lens-related keratitis. *Journal of Medical Microbiology*, 57(12): 1539-1546.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, 37(1): 318-326.

De Kievit, T. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11(2), 279-288.

De Vos, D., Lim Jr, A., Pirnay, J.P., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A., Cornelis, P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6): 1295-1299.

- El-Mahdy, R., El-Kannishy, G. (2019). Virulence factors of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in hospital-acquired infections in Mansoura, Egypt. *Infection and Drug Resistance*, 12: 3455-3461.
- El Askary, S.A. (2020). Relation between biofilm formation, quorum sensing genes (RhII-LasI) and carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 29(2): 1-9.
- Endimiani, A., Carias, L.L., Hujer, A.M., Bethel, C.R., Hujer, K.M., Perez, F., Hutton, R.A., Fox, W.R., Hall, G.S., Jacobs, M.R. (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7): 2680-2682.
- EUCAST (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org> (Erişim tarihi: 23.04.2024)
- Faisal, A.J., Ali, M.R., Said, L.A. (2020). Co-existence of lasI, rhI, and *Pseudomonas aeruginosa* signal quorum-sensing genes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 10: 338-343.
- Freeman, D., Falkiner, F., Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8): 872-874.
- Gonçalves, I.R., Dantas, R.C.C., Ferreira, M.L., Batistão, D.W.D.F., Gontijo-Filho, P.P., Ribas, R.M. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48: 211-217.
- Gröbner, S., Linke, D., Schütz, W., Fladerer, C., Madlung, J., Autenrieth, I.B., Witte, W., Pfeifer, Y. (2009). Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of Medical Microbiology*, 58(7): 912-922.
- Gündoğ, D.A., Güngör, G., Güngör, C., Onmaz, N.E., Gönülalan, Z. (2023). Çeşitli gıda kaynaklı patojenik bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespitinde kongo kırmızısı agar'ın etkinliğinin değerlendirilmesi. *Bozok Veterinary Sciences*, 4(1): 18-26.
- Güngör, C., Gündoğ, D.A., Onmaz, N.E. (2023). Mezbahta ortamından izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi ve biyofilm ile ilişkili virülans genlerin varlığı. *Bozok Veterinary Sciences*, 4(1): 12-17.
- Gürlük, N., Koluman, A., Kahraman, T. (2022). Gıda işletmelerinde biyofilm sorunu ve gümüş nanopartikül uygulamaları. *Aydın Gastronomy*, 6(1): 51-63.
- Halat, D.H., Moubareck, C.A. (2020). The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 9(4): 186.
- Heidari, R., Sheikh, F.A., Hashemzadeh, M., Farshadzadeh, Z., Salmanzadeh, S., Saki, M. (2022). Antibiotic resistance, biofilm production ability and genetic diversity of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from nosocomial infections in southwestern Iran. *Molecular Biology Reports*, 49(5): 3811-3822.
- Hemati, S., Azizi-Jalilian, F., Pakzad, I., Taherikalani, M., Maleki, A., Karimi, S., Monjezei, A., Mahdavi, Z., Fadavi, M.R., Sayehmiri, K. (2014). 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*. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(3): 133.
- Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12): 4114-4123.
- Karami, P., Khaledi, A., Mashoof, R.Y., Yaghoobi, M.H., Karami, M., Dastan, D., Alikhani, M.Y. (2020). The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports*, 18: 100561.

- Karatuna, O., Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12): 1770-1775.
- Lee, J., Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1): 26-41.
- Li, X., Gu, N., Huang, T.Y., Zhong, F., Peng, G. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: a typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1114199.
- McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M., Bonham, M.P., Fearon, A.M. (2010). Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84(1), 1-13.
- McSharry, S., Koolman, L., Whyte, P., Bolton, D. (2021). The microbiology of beef from carcass chilling through primal storage to retail steaks. *Current Research in Food Science*, 4: 150-162.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., & Diza, E. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303.
- Miller, M.B., & Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1): 165-199.
- Ng, W.L., Bassler, B.L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43: 197-222.
- Ochoa, S.A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L.B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R. (2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 70(2): 136-150.
- Perez, L.R.R., Machado, A.B.M.P., Barth, A.L. (2013). The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Current Microbiology*, 66: 418-420.
- Poirel, L., Potron, A., Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7): 1597-1606.
- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1): 119-123.
- Reynolds, D., Kollef, M. (2021). The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs*, 81(18): 2117-2131.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11): a012427.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8): 891-899.
- TEPGE (2023). Durum ve tahmin kırmızı et 2023. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/> (Erişim tarihi: 23.04.2024)
- USDA (2023). 2023 U.S. livestock and poultry outlook. <https://www.usda.gov/sites/default/files/documents/2023aof-Choe.pdf> (Erişim tarihi: 23.04.2024)
- Uzunbayır-Akel, N., Tekintaş, Y., Yılmaz, F.F., Öztürk, İ., Okeer, M., Aydemir, S.Ş., Çilli, F. F., Hoşgör-Limoncu, M. (2019). Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(4): 395-404.
- Viducic, D., Murakami, K., Amoh, T., Ono, T., Miyake, Y. (2017). Role of the interplay between quorum sensing regulator VqsR and the *Pseudomonas* quinolone signal in mediating carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 168(5): 450-460.

Wang, X., Gao, K., Chen, C., Zhang, C., Zhou, C., Song, Y., Guo, W. (2023). Prevalence of the virulence genes and their correlation with carbapenem resistance amongst the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a tertiary hospital in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(12): 1395-1406.

Wyness, L. (2016). The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits. *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(3): 227-232.