

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Homoserin Lakton Üretimi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması

Seyhan ULUSOY¹, Gülgün BOŞGELMEZ-TINAZ¹

Özet

N-açıl-homoserin lakton molekülleri (AHLs), birçok Gram-negatif bakteride popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonunu düzenleyen küçük sinyal molekülleridir. Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinin çeşitli ünitelerinden izole edilen 50 adet *P. aeruginosa* izolatı kullanılmıştır. Bu izolatlar tarafından *N*-açıl-homoserin lakton moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak araştırılmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının tamamı *A. tumefaciens* NT1 kullanılarak yapılan testlerde pozitif sonuçlar vermesine karşın literatürdeki bilgilerin aksine bu izolatların tümü, *C. violaceum* CV026 kullanılarak yapılan testlerde negatif sonuç vermiştir. Ayrıca bu suşlara National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2005)'e göre sefaperazon (CFP) (Oxoid;75µg), imipenem (IPM) (Oxoid;10µg), gentamisin (CN) (Oxoid;10µg), siprofloksasin (CIP) (Oxoid;5µg) ve gatifloksasin (GTX) (Oxoid;5 µg) antibiyotikleri için disk difüzyon testi uygulanarak AHL molekülü üretimindeki eksikliğin antibiyotik duyarlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, *N*-açıl-homoserin lakton, Antibiyogram, Çevreyi algılama.

1 Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü, Isparta

ABSTRACT

N-acyl-homoserine lactones (AHLs) are small signalling molecules that regulate gene expression in response to population density in many Gram negative bacteria. Fifty *P. aeruginosa* strains isolated from Intensive Care Units at Süleyman Demirel University Hospital were used in this study. These isolates were tested for production of AHLs by using indicator strains *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1. Positive reactions were recorded for all *P. aeruginosa* isolates with *A. tumefaciens* NT1. However, these isolates gave negative results with *C. violaceum* in contrast to previous reports. In addition, disk diffusion susceptibility testing was performed for cephoperazon (CFP) (Oxoid; 75 mg), imipenem (IPM) (Oxoid; 10 mg), gentamicin (CN) (Oxoid; 10 mg), ciprofloxacin (CIP) (Oxoid 5mg) and gatifloxacin (GTX) (Oxoid; 5mg) by the method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2005) to investigate the effect of lack of AHL production on antibiotic susceptibility.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *N*-acyl-homoserine lactone, Antibiogram, Quorum-sensing

1. Giriş

Pek çok patojen bakteri, hücreler arası sinyal mekanizmasını populasyon yoğunluğuna bağlı olarak özel genlerin ekspresyonunu düzenlemek için kullanır. Bu tip gen regülasyonu, çevreyi çevreyi algılama sistemi (Quorum sensing) (Fuqua vd., 1994) olarak adlandırılır. Gram-negatif bakterilerin pek çoğu, küçük difüze olabilen açıl homoserin lakton (AHL) moleküllerini, çevreyi algılama sisteminde sinyal molekülü olarak kullanırlar (Pesci, vd., 1997; Fuqua vd, 2001; Whitehead vd., 2001). Bu küçük sinyal molekülleri, bakteri hücrelerinden difüze olarak çeşitli fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamak üzere ortamda birikirler. Belli bir populasyon yoğunluğuna ulaşıldığında, ortamda birikmiş olan AHL molekülleri, bir dizi hedef genin ekspresyonunu tetikler (Whitehead, 2001).

Bugüne kadar AHL molekülüne dayalı çevreyi algılama sistemini kullanan ve en çok çalışılmış Gram-negatif bakterilerden birisi de *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*; kanser ve AIDS hastalarında veya kistik fibrozisli hastalarda; ayrıca immün sistemi cerrahi olarak, yanıkla veya sitotoksik ilaçlarla baskılanmış hastalarda enfeksiyona sebep olan, fırsatçı bir insan patojenidir. Ayrıca *P. aeruginosa*, kataterler, kalp kapakları ve diş protezleri gibi vücut içi tıbbi cihazlarda da kolonize olurlar (de Kievit, 2001). *P. aeruginosa*'nın başarılı bir fırsatçı patojen olmasının nedenlerinden birisi, oldukça geniş yelpazede ürettiği virülens faktörleridir. Bu virülens faktörleri arasında elastaz, alkalın proteaz, hemolzin, siyanid, piyosiyenin ve ekzotoksin A sayılabilir.

Özellikle kistik fibrozisli hastaların bu mikroorganizma ile kolonizasyonunun önlenmesi imkansızdır. Yine kistik fibrozisli hastaların akciğerleri, Pseudomonasların alginat üretilen biyofilm oluşturarak, bakterilerin antibiyotiklerden korunması için iyi bir ortam sağladığı için, bu hastalarda Pseudomonas enfeksiyonlarını tedavi etmek oldukça zordur. Çünkü bu patojenin sebep olduğu enfeksiyonlarda uzun süre ve tekrarlı antibiyotik tedavisi uygulanması dirençli suşların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Ciofu

vd.,1994). Bu nedenle, bu patojenin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi açısından antibiyotik duyarlılıklarının bilinmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, *P. aeruginosa* klinik izolatlarında sinyal molekülü üretimindeki bozukluk ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinin çeşitli kliniklerinden izole edilmiş 50 adet *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır. Tüm suşlar, %1.2 agar ilavesiyle katılaştırılmış Luria Broth (LB) besiyerinde üretilmiştir. AHL moleküllerinin tespiti, *C. violaceum* CV026 (McClellan vd., 1997) ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. N-açıl yan zincirinde 4 ile 8 arası karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 kullanılmıştır. Ortamdaki mevcut kısa zincirli AHL molekülleri, *C. violaceum* CV026 mutant suşunda mor bir pigment olan viyolasin'in üretimi uyarır (McClellan vd., 1997). Diğer bir indikatör olarak, pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılmıştır (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001). Bu suş, ortamda X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) varlığında, N-açıl yan zincirinde 6 ile 12 arası karbona sahip uzun zincirli AHL moleküllerinin indüklemesi sonucunda mavi renk meydana getirir. Bu suşlar, %1.2 agar ilavesiyle katılaştırılmış ve uygun antibiyotik ilavesi yapılmış (*A. tumefaciens* NT1 Gentamisin 20 μ g/mL; *C. violaceum* CV026 Kanamisin 20 μ g/mL), LB(%1 tripton,%0.5 yeast extract,%0.5 NaCl) besiyerlerinde üretilmiştir.

2.1. AHL Moleküllerinin Tespiti İçin Çapraz Doğrulama Testi

Çalışılan suşlarda AHL moleküllerinin üretimi, her iki biyosensör suş (CV026 ve NT1) ile besiyeri üzerinde paralel çizilerek test edilmiştir.

2.2. Agar Difüzyon Testi

5mL LB (%0.3, w/v) sıvı kültürüne, 50 μ L *C. violaceum* CV026 kültürü ilave edilmiştir. Agar-kültür karışımı hızlı bir şekilde LB petrilere (100mm x 100mm) dökülmüştür. Steril pastör pipeti ile besiyerinde açılmış kuyucuklara, test edilecek izolatin süpernatantından 100 μ L'ye kadar pipetle eklenmiştir. Petriler 30°C'de gece inkübe edilmiş ve pigment üretimi açısından suşlar değerlendirilmiştir.

2.3. Disk Difüzyon Testi

İncelenen izolatlar, antibiyotik hassasiyetleri açısından National Committee for Clinical Laboratory Standards'a göre disk difüzyon yöntemi uygulanarak test edilmişlerdir (CLSI, 2005). Kullanılan antibiyotik diskleri: sefaperazon (Oxoid;75 μ g),

imipenem (Oxoid;10µg), gentamisin (Oxoid;10µg), siprofloksasin (Oxoid;5µg) ve gatifloksasin (Oxoid;5 µg) şeklindedir. Mc Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu, Muller Hinton agar besiyeri bulunan petrilere yayılmıştır. Sonra antibiyotik diskleri, besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. İnhibisyon zonlarının çapları 35 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonucunda milimetrik cetvel ile ölçülerek, sonuçlar duyarlı, dirençli ve orta derecede duyarlı olarak CLSI’in kriterlerine göre değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (CLSI, 2005).

3. BULGULAR

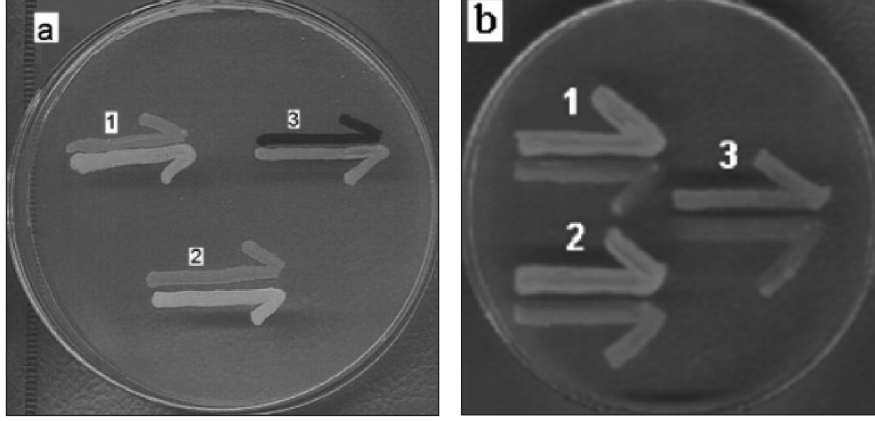
Sinyal molekülü üretimi ve antibiyotik duyarlılıkları açısından test edilen izolatların orjinleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Sinyal molekülü üretimi ve antibiyotik duyarlılıkları açısından test edilen suşların orjinleri

İzole edildiği klinik	İzole edildiği Materyal	İzole edilen Suş Sayısı
Yoğun bakım	Kan	10
Dahiliye	İdrar	7
Göğüs	Balgam	10
Yeni Doğan	Yara	6
Pediatri	İdrar	6
KBB	Yara	2
Acil	Periton mayı	3
Genel Cerrahi	Vücut sıvısı	6

C. violaceum CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak, tüm klinik izolatlarda AHL moleküllerinin üretimi araştırılmıştır.

Çalışmanın sonunda, *P. aeruginosa* klinik izolatlarının tamamı *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu ile AHL pozitif sonucu vermiştir. Ancak bu izolatlar, AHL moleküllerinin üretimi açısından, N-açıl yan zincirinde 4 ile 8 arası karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 indikatör suşu ile test edildiğinde; kısa zincirli AHL moleküllerinin varlığı tespit edilememiştir (Şekil 1a-b).



Şekil 1.a., 1-2Bütanoyil Homoserin Lakton (BHL) sinyal molekülünü üretmeyen suşlar, 3-PAO1 kontrol suşu 1.b.,Okzododekanoyil Homoserin Lakton (OdDHL) sinyal molekülünü üreten suşlar, 1, 2 klinik izolat, 3-PAO1 kontrol suşu.

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinin zor olmasında önemli rol oynayan özelliklerinden birisi de, farklı antibiyotiklere karşı çoklu direnç taşımasıdır. Çalışma sırasında klinik izolatların antibiyotik direnç profilleri, sefaperazon (Oxoid;75µg), imipenem (Oxoid;10µg), gentamisin (Oxoid;10µg), siprofloksasin (Oxoid;5µg) ve gatifloksasin (Oxoid;5 µg) antibiyotikleri için disk difüzyon testi uygulanarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda tüm klinik izolatlar siprofloksasine, gentamisine ve gatifloksasine duyarlı olarak bulunmuştur. Sefaperazona bir izolat dirençli, yedi izolat orta derecede duyarlı ve diğer izolatlar duyarlı olarak bulunmuştur. İmipeneme ise altı izolat dirençli, bir izolat orta derecede duyarlı, diğer izolatlar ise duyarlı olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışma sırasında kullanılan 50 *P. aeruginosa* klinik izolatının antibiyotikler için duyarlılıkları

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Orta Derecede Duyarlı (%)	Dirençli (%)
Cefaperazon	84	14	2
İmipenem	86	2	12
Gentamicin	100	–	–
Ciprofloxacın	100	–	–
Gatifloxacın	100	–	–

4. TARTIŞMA

Bu çalışma SDÜ Tıp Fakültesi hastanesinin çeşitli ünitelerinden izole edilmiş *P. aeruginosa* klinik izolatlarının tamamının OdDHL sinyal moleküllerini üretebildiğini, BHL sinyal moleküllerini üretmediğini göstermiştir (Boşgelmez- Tınaz vd., 2005).

Birçok insan patojeni, çevreyi algılama sistemini virülens faktörlerinin üretimini düzenlemek için kullanırlar bu nedenle, bu sisteminin bloke edilmesi bakterinin çeşitli virülens faktörlerini üretmesini engellemek için imkan sağlar. *P. aeruginosa* patojeninin önemli virülens özelliklerinden birisi de farklı antibiyotiklere karşı çoklu ilaç pompalarıyla sağladığı dirençtir.

Ancak çalışma sonucunda, tüm izolatlar BHL sinyal molekülünü üretememelerine rağmen, antibiyotik duyarlılıkları arasında büyük farklılıklar saptanamamıştır. Bu durum, bir hastanın farklı seviyede sinyal molekülü üreten çoklu *P. aeruginosa* suşuyla enfekte olmuş olmasına bağlanabilir (Shaber vd, 2005). Daha önce yapılmış çalışmalarda antibiyotik tedavisi uygulama süresinin *P. aeruginosa*'da çeşitli virülens faktörlerinin üretimini etkilediği ortaya konmuştur (Griswold vd., 2001).

Çalışılan izolatlar arasında antibiyotik direncine sahip fazla sayıda izolat bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmanın sonucu, klinik izolatların sebep olabileceği hastalıkların tedavisi açısından önem taşımaktadır. Zira çoklu dirence sahip patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi mortalite, zaman ve maliyet açısından büyük kayıplara neden olduğu için oldukça sorun oluşturmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1094-D05 no'lu ve TÜBİTAK TBAG-HD/79 no'lu projeler ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Boşgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Arıdoğan, B., Eroğlu, F. and Kaya, S. N-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit. *Microbiological Research*, 160, (2005), pp.399-403.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 'Production of acyl-homoserine lactone signals by gram-negative plant-associated bacteria', *Mol Plant-Microbe Interact*, 11, (1998), pp. 1119-1129.
- Ciofu O., Giwereman B., Pedersen S.S., Hoiby N., 'Development of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* during two decades of antipseudomonas treatment at the Danish CF center', *APMIS*, 102, (1994), pp.274-280.
- CLSI,2005, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. (CLSI) document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9].Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Walley Road, Suite 1400,Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
- De Kievit, T. R., Parkins, M.D., Gillis, R.J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B.H., Storey, D.G., 'Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *P. aeruginosa* biofilms', *Antimicrob Agents Chemother*, 45, (2001), pp. 1761–1770.
- Fuqua, C., Winans, S. C., Greenberg, E. P., 'Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators', *J Bacteriol*, 176, (1994), pp.269–275.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E.P., 'Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing', *Annu Rev Genet*, 35, (2001), pp.439–468.
- Griswold, J., Hamood, A. N., Colmer-Hamood, J. A. & Methani, A., 'Length of antibiotic treatment influences risk of repeated *Pseudomonas aeruginosa* infections', *Curr Opin Clin Exp Res*, 3, (2001), pp.186–195.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 'Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of *N*-acylhomoserine lactones', *Microbiology*, 143, (1997), pp. 3703-3711..
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., Iglewski, B.H., 'Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *P. aeruginosa*', *J. Bacteriol*, 179, (1997), pp.3127–3132.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., Gram, L., 'Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics', *Journal of Microbiological Methods*, 44, (2001), pp.239-251.
- Schaber J. A., Carty N. L., McDonald N. A., Graham E. D., Cheluvappa R., Griswold J. A. and Hamood A. N., 'Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Journal of Medical Microbiology*, 53, (2004), pp. 841–853.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L. vd., 'Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography', *Proc Natl Acad Sci. USA*, 94, (1997), pp. 6036-6041.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P., 'Quorum-sensing in Gram-negative bacteria', *FEMS Microbiol Rev*, 25, (2001), pp.365–404.