

# Deneysel Mikroçevre Modelleme Çalışması: *Pseudomonas aeruginosa*'nın Farklı Hücre Dizilerinde Çoğunluğu Algılama ve Biyofilm Yanıtları

## Experimental Microenvironment Modeling Study: Quorum Sensing and Biofilm Responses of *Pseudomonas aeruginosa* in Different Cell Lines

Vahide BAYRAKAL,<sup>a</sup>  
Dr. Hüseyin BASKIN,<sup>a</sup>  
Dr. İ. Hakkı BAHAR<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 27.06.2008  
Kabul Tarihi/Accepted: 10.12.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Hüseyin BASKIN  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
İzmir,  
TÜRKİYE/TURKEY  
huseyin.baskin@deu.edu.tr

**ÖZET Amaç:** *Pseudomonas aeruginosa*, mikroçevre koşullarına “uygun” patoloji gösterebilir. Biyofilm oluşturabilmesi, önemli patojenite kriterlerinden biridir. Bu çalışmada, aminoglikozit uygulamalarının *P. aeruginosa*'da biyofilm yapımını uyarıp uyarmadığı ve uyarım varsa çoğunluğu algılama ile ilgisi sorgulanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Farklı hücre dizileri (VERO, HEp-2, RD), klinikten izole edilen iki *P. aeruginosa* kökeni (K1, K2) ve ATCC 27853 *P. aeruginosa* kökeni ile enfekte edilmiştir (“multiplicity of infection” m.o.i 50:1). Daha sonra sırasıyla supra-minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), MİK ve %50 MİK yoğunluklarda gentamisin, netilmisin ve amikasin ile karşılaştırıldıktan sonra, hücreler patlatılarak bakteriler alınmış, biyofilm ve çoğunluğu algılama (ÇA) yanıtları değerlendirilmiştir. **Bulgular:** VERO ve HEp-2 hücre dizilerinde, üç *P. aeruginosa* kökeninde, her üç antibiyotiğin supra-MİK, MİK ve %50 MİK yoğunluklarında las ve rhl ÇA sistemlerinin çalıştığı görüldü. Bundan farklı olarak RD hücre dizisinde, ATCC 27853 *P. aeruginosa* kökeninin; diğer hücre dizilerinde (VERO, HEp-2) yapılan deneylerin bulgularına paralel olarak her iki ÇA sisteminin çalıştığı görüldü. K1 ve K2 kökenlerinin gentamisin yoğunluklarının etkisinde ÇA sistemlerinin çalışmadığı belirlendi. Aynı hücre dizisinde amikasin yoğunluklarının etkisinde K2 kökeninin sadece rhl ÇA sistemi çalışırken, K1 kökeninin sadece las sisteminin çalıştığı ve netilmisin etkisinde iki kökenin de ÇA sistemlerinin çalıştığı gösterildi. **Sonuç:** *P. aeruginosa* farklı mikroçevre koşullarında farklı davranabilmektedir. Farklı hücre dizilerinde üç *P. aeruginosa* kökeni için, antibiyotiklerin tüm yoğunluklarında biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Epitel hücrelerinde, kas hücrelerinden farklı ÇA yanıtı saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın uyum yeteneğini gösteren bu karşılaştırmalı modelleme, *P. aeruginosa*'ya karşı klinik tedavilerde başarı sağlayacak antibiyotiklerin geliştirilmesinde kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*; çoğunluğu algılama; hücre dizisi; biyofilmler

**ABSTRACT Objective:** *Pseudomonas aeruginosa* may show adaptive pathogenicity according to microenvironment conditions. Biofilm formation is an important virulence characteristic. In this study, effect of aminoglycoside treatment on biofilm formation and its relation with quorum sensing (QS) in *P. aeruginosa* were questioned. **Material and Methods:** Three different cell lines (VERO; HEp-2, RD) were infected with *P. aeruginosa* [multiplicity of infection (m.o.i): 50:1] and were treated with three different aminoglycosides in supra-MIC (minimum inhibitory concentration), MIC, 50% MIC concentrations. Following antibiotic treatments, QS responses were determined by micro AHL method and biofilm formation was evaluated spectrophotometrically. **Results:** Three aminoglycosides stimulated biofilm formation in *P. aeruginosa* in each cell line. In VERO and HEp-2 cell lines, QS systems of ATCC 27853, C1 and C2 strains were active under all antibiotic concentrations. In RD cell line, las and rhl systems of *P. aeruginosa* ATCC 27853 were active; however, las and rhl systems of C1 and C2 strains were not active under gentamicin effect. las system of C1 and rhl system of C2 were active under amikacin effect, and all QS systems of C1 and C2 worked under netilmicin effect. **Conclusion:** *P. aeruginosa* may “behave” in different patterns in different microenvironments. For three *P. aeruginosa* strains, biofilm formation was detected in all cell lines. In epithelial cell lines, QS response was different from the response in muscle cell line. This comparative modeling may be useful for the development of new antimicrobials against *P. aeruginosa*.

**Key Words:** *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing; cell line; biofilms

Zor koşullar altında canlı kalabilen ve fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*; kistik fibrozis, yanık enfeksiyonu ve HIV hastaları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, tedavisi zor enfeksiyonlara neden olabilir.<sup>1,2</sup> *P. aeruginosa*, bulunduğu mikroçevre koşullarına çok iyi uyum gösterir ve bulunduğu ortamda “çoğunluğu algılama (ÇA) (quorum sensing)” sistemlerini kullanarak patojenite özelliklerini düzenleyebilir.<sup>3</sup>

*P. aeruginosa*'da tanımlanan; birbiriyle ilişkili “*las*”, “*rhl*” ve “kinolon” olmak üzere üç ÇA sistemi vardır.<sup>4</sup>

Sinyal molekülü olarak uzun zincirli AHL (3-oxo-C12-HSL-L)'yi kullanan “*las* sistemi”; biyofilm oluşumunu ve Las B elastaz, Las A proteaz, ekzotoksin A gibi diğer hücre dışı virülans faktörlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder. Rhl AB operonunun yapımını kontrol eden “*rhl* sistemi” ise, rhamnolipid üretimi için gerekli olan “rhamnosyltransferase” enziminin sentezlemesini ve Las B elastaz, Las A proteaz, piyosiyanın, siyanid ve alkalin proteazın üretimini düzenler; haberleşme molekülü olarak da kısa zincirli AHL'yi (C4-HSL) kullanır.<sup>5-7</sup>

*P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, bakteri üzerindeki “gerçek etkileri” ni saptamak amacıyla çeşitli klinik suşların in vitro ve ex vivo mikroçevrelerde sınanması ve değişen mikroçevreye adaptasyonda etkin olan patojenite özelliklerini düzenleyen ÇA sistemlerinin belirlenmesi, klinik başarı açısından yol gösterici olabilir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### SUŞLAR

Klinik örneklerden izole edilen iki *P. aeruginosa* ve standart *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır. ÇA yanıtlarını göstermek için rhl sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Choromobacterium violaceum* (CV026) ve las sisteminin çalıştığını gösteren suş olan *Agrobacterium tumefaciens* (A136) suşları kullanılmıştır.

### ANTİBİYOTİKLER

Çalışmada aminoglikozid grubu antibiyotiklerden amikasin, gentamisin ve netilmisin kullanılmıştır.

### HÜCRE DİZİLERİ

Farklı mikroçevre yanıtını değerlendirmek için epitelyal hücre dizileri olan insan kökenli, kaynak organ HeLa bulaşı olan HEp-2 hücreleri; Afrika yeşil maymun böbrek kökenli VERO hücreleri ve insan kas kökenli rabdomiyosarkom dokusundan elde edilen RD hücreleri kullanılmıştır.

### HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ

HEp-2, VERO ve RD hücre dizileri RPMI 1640 medium, %2 fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edilerek, ertesi gün tripsinizasyon sonrası pasajlanmıştır. Pasajlanan hücreler 96'lık plaktaki kuyucukları %80 yoğunlukta (8 x 10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) kaplayacak şekilde dağıtılmıştır.

### MİKRO DİLUSYON YÖNTEMİ İLE MİK'LERİN BELİRLENMESİ

Her suş için gentamisin, amikasin ve netilmisin antibiyotiklerinin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, mikrodilüsyon yöntemi ile katyon eklenmiş Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde saptanmıştır. Bakteriler McFarland 0.5 (1.5 x 10<sup>8</sup> hücre/mL)'e eşit bulanıklıkta hazırlanmıştır. ELISA mikro plaklarındaki kuyucuklara önce MHB besiyerinden eşit miktarlarda dağıtılıp, daha sonra antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları ve son olarak da bakteri süspansiyonu dağıtılmıştır. Plaklar 18 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.<sup>8</sup>

### ENFEKSİYON MODELİ

*P. aeruginosa* ATCC 27853, K1 ve K2 suşları McFarland 0.5 (1.5 x 10<sup>8</sup> hücre/mL) bulanıklığında hazırlanmış, “multiplicity of infection (m.o.i)” 50:1 olacak şekilde sulandırılarak hücrelere eşit oranlarda dağıtılmıştır.<sup>8</sup> Hücreler bakteri süspansiyonları ile 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre içine girmeyen bakterileri ortamdan uzaklaştırmak için üç kez PBS ile hücreler yıkanmıştır.

Enfekte hücrelere antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin ve netilmisin) her suş için farklı olan supra-MİK (MİK'ten bir önceki antibiyotik yoğunluğu), MİK ve %50 MİK yoğunlukları eklenerek 18 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.<sup>9</sup> İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki antibiyotik dilüsyonları

ile karşılaştırılmış enfekte hücreler, hücre içindeki bakterileri elde etmek için distile su ile patlatılmış, patlatılan hücrelerden toplanan bakteriler santrifüjlenerek ayrılmıştır.

### ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA YANITLARI

Ayrıştırılan bakterilerin ÇA yanıtları “mikro AHL” yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma için hazırlıklar şu şekilde yapılmıştır: İki ayrı ELISA mikro plağının her kuyucuna eşit miktarda Luria Bertani Agar (LBA) dağıtılıp oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan bu iki ayrı mikropaktan birine, Luria Bertani Broth (LBB)’da 30°C’de inkübe edilip, McFarland 0.5 bulanıklığında ayarlanan *C. violaceum* (CV026) süspansiyonu rhl sistemini görüntülemek için ve diğerine de *A. tumefaciens* (A136) süspansiyonu las sistemini göstermek için ekilmiştir. Santrifüjden sonra toplanan bakteriler ise paralel olarak iki ayrı plağa ekilmiştir. AHL varlığı 37°C’de 36 saat inkübe edildikten sonra makroskobik olarak değerlendirilmiş ve her iki plakta da “mavi-yeşil” renk görülmesi pozitif olarak kabul edilmiştir.<sup>10,11</sup>

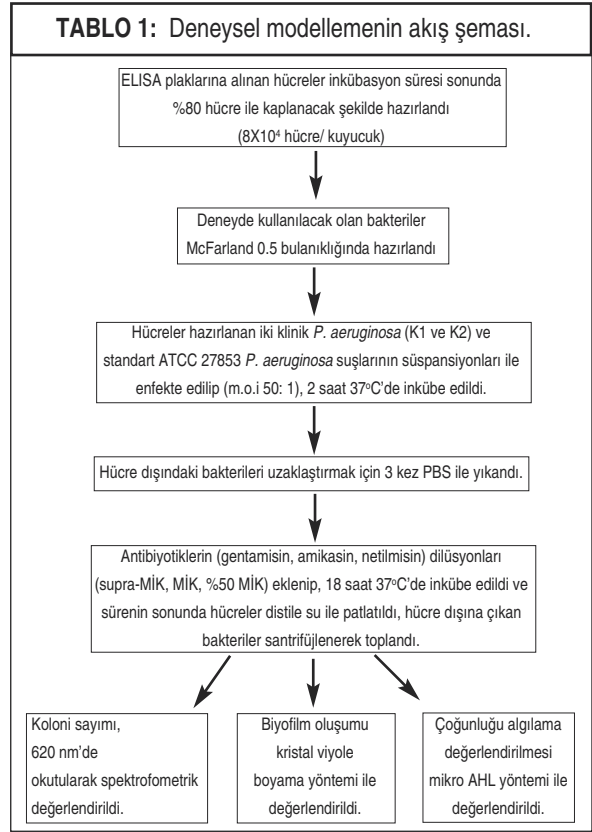
### BİYOFİLM DEĞERLENDİRİLMESİ

Hücre plaklarına eşit miktarlarda MHB eklenerek 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda önce spektrofotometrede 620 nm dalga boyunda okutularak koloni sayımı yapılmış, takiben biyofilm oluşumu, kristal viyole boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa eşit miktarlarda %1’lik kristal viyole boyası dağıtılıp, 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bağlanmayan kristal viyole boyasını uzaklaştırmak için üç kez distile su ile yıkayıp, %95’lik etanol dağıtılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Plaklar, daha iyi sonuç verdiğini belirlediğimiz 492 nm’de değerlendirilip, absorbansın iki kat olarak belirlendiği çukurlar, biyofilm oluşumu yönünden pozitif kabul edilmiştir.<sup>12,13</sup> Deneysel modelleme için kullanılan yöntemlerin özeti Tablo 1’de verilmiştir.

### BULGULAR

VERO; RD ve HEp-2 olmak üzere üç farklı hücre dizisinde yapılan çalışmada; antibiyotiklerin (gen-

**TABLO 1:** Deneysel modellemenin akış şeması.



tamisin, amikasin ve netilmisin) supra-MİK; MİK ve %50 MİK yoğunlukları ile karşılaşan K1, K2 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarında biyofilm oluştuğu gözlemlendi.

VERO ve HEp-2 hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda ise üç *P. aeruginosa* suşunda her üç antibiyotiğin supra-MİK, MİK ve %50 MİK yoğunluklarında, las ve rhl ÇA sistemlerinin çalıştığı gözlemlendi. Bu iki hücre dizisinde elde edilen ÇA yanıtları aynı bulundu.

RD hücre dizisinde, diğer hücre dizilerinden farklı olarak, K1 ve K2 suşlarının gentamisin etkisinde ÇA sistemlerinin çalışmadığı belirlendi. Amikasin etkisinde K2 suşunun sadece rhl ÇA sistemi çalışırken, K1 suşunun sadece rhl sisteminin çalıştığı gösterildi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun ise; diğer hücre dizilerinde (VERO, HEp-2) yapılan deneylerin bulgularına paralel olarak her iki ÇA sisteminin de çalıştığı belirlendi (Tablo 2).

**TABLO 2:** Antibiyotiklerin (gentamisin, amikasin ve netilmisin) supra-MİK, MİK ve %50 MİK yoğunluklarında ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, K1 ve K2 suşlarının RD hücre dizisinde çoğunluğu algılama yanıtları.

Suşlar	ÇA	Gentamisin			Amikasin			Netilmisin		
		Supra-MİK	MİK	%50 MİK	Supra-MİK	MİK	%50 MİK	Supra-MİK	MİK	%50 MİK
ATCC	CVO26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	A136	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K1	CVO26	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	A136	-	-	-	-	-	-	+	+	+
K2	CVO26	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	A136	-	-	-	+	+	+	+	+	+

CVO26: *Chromobacterium violaceum* (rhl sisteminin çalıştığını gösteren suş); A136: *Agrobacterium tumefaciens* (las sisteminin çalıştığını gösteren suş). ATCC: standart ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*. K1 ve K2: Klinikten izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşları. ÇA: Çoğunluğu algılama sistemleri.

## TARTIŞMA

Bilimsel çalışmalar ancak pratiğe aktarıldıklarında verimli ve tamamlanmış sayılabilirler. Bir temel bilim laboratuvar tezgâhında moleküler ve/veya hüresel düzeyde başlayan bir çalışma, hasta yatağına kadar ulaşır veya hasta yatağından laboratuvar tezgâhına doğru bir yol izler. Geçen on yıllar içinde klinik ve temel araştırmalar arasında önemli engeller doğmuş, bilimsel verilerin karşılıklı aktarımı sorun olmuştur. Tıbbi aktarım araştırmaları bu boşluğu aşacak bir köprü görevini üstlenecektir. Klinik problemin tanımlanması; araştırma hipotezinin oluşturulması; *in vitro* sonuçlar; *in vivo* sonuçlar; işe yarar bilginin tanımlanması; rastgele klinik denemelerin yapılması; endüstri ve toplumla paylaşım; pratiğe aktarım şeklinde tanımlanabilecek basamaklar içinde “deneysel modelleme çalışmaları” önemli bir aşamadır.<sup>14</sup> Bu noktada oluşturulacak bilgi havuzları, deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesinde ve bir sonraki aşamada da tıbbi aktarımda yol gösterici olabilir.

Farklı yerlerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında, ÇA sistemleri (las, rhl) ile üretimi kontrol edildiği bilinen alkalen proteaz, elastaz, biyofilm oluşumu, ... gibi patojenite yanıtlarının farklı olduğu gösterilmiştir.<sup>12,15-18</sup> Las/Rhl sistemlerine bağlı patojenite yanıtlarının farklı olabilmesi, mikroçevrenin bakteri üzerindeki etkisinin bir göstergesi olabilir.<sup>19</sup> Ayrıca, las ve rhl sistemleri değişen mikroçevreye uyum amacıyla hem birbiriyle ilişkili hem de birbirinden bağımsız çalışabilmektedir.

Daha önce yaptığımız bir çalışmada *in vitro* koşullarda farklı anatomik bölgelerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının, farklı antibiyotiklerin etkisi altında farklı ÇA sistemlerinin (las/rhl) çalıştığını göstermiştik.<sup>20</sup>

Bu çalışmada *ex vivo* mikroçevre etkisini sorgulamak için 3 farklı hücre dizisi kullandık. Çalışmamızda kullandığımız 3 hücre dizisi de adheran hücre dizileri olup farklı mikroçevreleri temsil ederler: Sırasıyla RD hücreleri insan kökenli olup rabdomyosarkom gelişmiş kas dokusundan elde edilmiştir. HEp-2 hücreleri, insan kökenli bir epitelyal hücre hattı olup kaynak organ HeLa bulaşdır.<sup>21</sup> VERO hücreleri; Afrika yeşil maymun kökenli böbrek epitelyal hücreleridir.<sup>22</sup> Çalışmaların sonucunda; her üç mikroçevrede, klinik ve standart ATCC 27853 *P. aeruginosa* suşlarının aminoglikozidlerin (gentamisin, amikasin ve netilmisin) supra-MİK, MİK ve %50 MİK yoğunluklarının etkisi altında iken biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Bakterinin bulunduğu mikroçevreye uyumunda etkin olan ve bu amaçla patojenite özelliklerini düzenleyen las ve rhl ÇA sistemlerinin VERO ve HEp-2 hücre dizilerinde, üç *P. aeruginosa* suşunda da test edilen antibiyotiklerin farklı yoğunluklarında çalıştığı belirlenmiştir. RD hücre dizisinde ise; *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunda üç antibiyotiğin etkisinde, K1 ve K2 suşlarında da sadece netilmisin etkisinde her iki ÇA sisteminin çalıştığı; K1 ve K2 suşlarının gentamisin etkisinde iki ÇA sisteminin de çalışmadığı belirlenmiştir. İlginç olarak, sadece amikasin etkisinde K1 suşunun rhl sisteminin, K2 suşunun da las sisteminin çalıştığı görülmüştür.

Aynı hücre dizisinde (mikroçevrede); amikasinin farklı yoğunluklarında klinik *P. aeruginosa* suşlarının farklı ÇA sistemleri farklı çalışmaktadır. Bu bulgu; in vitro koşullarda gösterdiğimiz *P. aeruginosa* suşlarının, farklı antibiyotiklerin etkisi altında farklı ÇA sistemlerinin (las/rhl) çalışmasının ex vivo mikroçevrede de meydana geldiğini göstermektedir.<sup>20</sup> Bu sonuçlar literatürde, antibiyotiklerin etkisi altındaki ÇA sistemlerinin birbirlerini etkilediğini gösteren çalışmalarla uyumlu görünmektedir.<sup>23,24</sup>

Bundan sonraki çalışmalarda farklı m.o.i değerlerinde (10:1; 5:1; 3:1;... gibi) ve farklı zaman dilimlerinde değerlendirmeler yaparak bu modelleme daha da ileriye taşınabilir. Sonuç olarak *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı davranışlarının değerlendirilebileceği deneysel mikroçevreler; hem bu bakterinin farklı mikroçevrelerde değişebilen davranışlarının çözümlenmesinde hem de uygulanacak antibiyotiklerin konak ve bakteri üzerindeki etkilerini değerlendirmede yardımcı olabilir.

## SONUÇ

Epitel hücreleri aynı canlı türünden köken almasa da (VERO: Afrika yeşil maymun kökenli, HEp-2: insan kökenli), epitel hücrelerinde kas hücrelerinden (RD) farklı bir ÇA yanıtı ortaya çıkmıştır. İlginç olan, her üç hücre dizisinde biyofilm yanıtlarının ortak olduğudur. Bu sonuçlara bakarak, farklı mikroçevre koşullarının ÇA yanıtı üzerine etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

ÇA yanıtı *P. aeruginosa*'nın virülans özelliklerinin bir bölümünü kontrol etmektedir. Ancak bu bölümüyle bile, farklı bakteri sayılarının kullanılacağı (farklı m.o.i değerleri ile) in vivo deneysel hücre dizisi çalışmalarının bir sonraki aşamada, hayvan deneylerine aktarılabilmesi ile klinikte görülen akut ve/veya kronik enfeksiyonların tanısında ve tedavisinde çok önemli yol gösterici olacak (multiple predictive marker) çoklu kestirim göstergesi eldesi mümkün olabilir.

## KAYNAKLAR

- Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. Pseudomonas aeruginosa chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr* 2007;19(1):83-8.
- Uğur Özçelik H. [Antibacterial therapy in lung infections in cystic fibrosis]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(14):30-5.
- Dunny GM, Brickman TJ, Dworkin M. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays* 2008;30(4):296-8.
- Martin CA, Hoven AD, Cook AM. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(8):635-42.
- Girard G, Bloemberg GV. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in Pseudomonas aeruginosa. *Future Microbiol* 2008;3(1):97-106.
- Duan K, Surette MG. Environmental regulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol* 2007;189(13):4827-36.
- Wagner VE, Li LL, Isabella VM, Iglewski BH. Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in Pseudomonas aeruginosa. *Anal Bioanal Chem* 2007;387(2):469-79.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 16th informational supplement. CLSI document. M100-S16, CLSI, Wayne Penn 2006.
- Baskin H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N. Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of Escherichia coli. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19(1):79-82.
- Vivas J, Razquin BE, López-Fierro P, Naharro G, Villena A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an Aeromonas hydrophila aro-A live vaccine. *Vet Microbiol* 2004;101(3):167-76.
- Bayrakal V, Baskin H, Bahar İH. [The comparison of two methods in order to show the quorum sensing responses]. *Turk Microbiol Soc* 2008; 38(2):52-5.
- Zhu H, Thurutylil SJ, Willcox MDP. Production of N-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clic Exoper. Ophthal* 2001;29(3):150-2.
- Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, et al. Increased biofilm formation in Escherichia coli isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28 Suppl 1:S21-5.
- Keramaris NC, Kanakaris NK, Tzioupis C, Kontakis G, Giannoudis PV. Translational research: from benchside to bedside. *Injury* 2008;39(6):643-50.
- Zhu H, Bandara R, Conibear TC, Thurutylil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, et al. Pseudomonas aeruginosa with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1897-903.
- Oldak E, Trafny EA. Secretion of proteases by Pseudomonas aeruginosa biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3281-8.
- Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):155-66.
- Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5783-92.

19. Wagner VE, Gillis RJ, Iglewski BH. Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 2004;22 Suppl 1:S15-20.
20. Doğan Y, Bayrakal V, Baskın H, Bahar İH. [Relation of quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* strains in presence of gentamisin]. *Turk Microbiol Soc* 2007; 37(3):134-7.
21. Johnston SL, Siegel CS. Presumptive identification of enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK cell lines. *J Clin Microbiol* 1990;28(5): 1049-50.
22. Freshney RI. Maintenance of the culture-cell lines. *Culture of Animal Cells*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: AR Liss, Inc; 1988. p.128-30.
23. Nalca Y, Jänsch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Häussler S Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(5): 1680-8.
24. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(10):3648-63.