

T.C.  
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GALLERIA MELLONELLA MODELİ KULLANILARAK  
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA KLİNİK  
İZOLATLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

AYDAN ATALAR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. CANAN KÜLAH

ZONGULDAK

2019

T.C.  
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GALLERIA MELLONELLA MODELİ KULLANILARAK  
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA KLİNİK  
İZOLATLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

AYDAN ATALAR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. CANAN KÜLAH

ZONGULDAK

2019

**KABUL VE ONAY:**

**“GALLERİA MELLONELLA MODELİ KULLANILARAK STENOTROPHOMONAS MALTOPHİLİA KLİNİK İZOLATLARINDA VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI”** başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

04.11.2019

**Başkan: Prof. Dr. Canan KÜLAH**

**Üye: Prof. Dr. Füsün CÖMERT**

**Üye: Prof. Dr. Cihadiye Elif ÖZTÜRK**

**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

**TARİH: 04.011.2019**

**Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ**  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, her zaman bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, sevgisi ve neşeli kişiliği ile daima bana destek olan ve tez çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren tez danışmanım değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan KÜLAH'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini aktaran, her türlü konuda her zaman yardımcı olan, değerli hocam Prof. Dr. Füsun CÖMERT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim sırasında derslerini severek dinlediğim İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. İshak Özer TEKİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde yer alan *Galleria mellonella* larvalarının temininde yardımcı olan Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ulya NURULLAHOĞLU'na ve Uzman Biyolog Gamze Gül DURULAR'a teşekkürlerimi sunarım.

*Galleria mellonella* larvalarının yetiştirilmesinde her türlü bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ZBEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim Üyesi Prof. Dr. Ender BÜYÜKGÜZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan, başta Uzman Biyolog Gülhan AVCI ve Biyolog Eldan SUBAŞI olmak üzere herbiri çok değerli olan tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatım boyunca üzerimde emeği olan sevgili aileme, son olarak her zaman yanımda olan en büyük destekçim yol arkadaşım sevgili eşim Kerem ATALAR'a ve canım oğlum Mustafa Ant ATALAR'a çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Atalar A., *Galleria mellonella* Modeli Kullanılarak *Stenotrophomonas maltophilia* Klinik İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Araştırılması, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.**

**Amaç:** Bu çalışmada *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarının virülans özelliklerinin araştırılması, deney hayvanı modeli olarak *Galleria mellonella* larvalarının yetiştirilerek üretilmesi ve ilgili modelin patogenez ve tedavi çalışmalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya dahil edilen 20 *S. maltophilia* izolatının antibiyotiklere duyarlılık durumları MicroScan Neg MIC Panel Type 44 kiti ile üretici talimatlarına göre çalışılarak belirlendi. Biyofilm oluşumu, spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile seçirme Müller Hinton besiyerinde, yayılma Luria Bertani besiyerinde değerlendirildi. *Galleria mellonella* larvaları, projemiz kapsamında, ZBEÜ Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında yetiştirildi. Larvaların melanizasyon ve mortalite hızları, enjeksiyondan sonra 24. ila 144. saatler arasında izlendi.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen toplam 20 *S.maltophilia* izolatının antibiyotik duyarlılık profillerine bakıldığında; trimetoprim sülfometaksazol ile minosikline tüm izolatların duyarlı olduğu, seftazidime %50'sinin duyarlı, %15'inin orta duyarlı ve %35'inin ise dirençli olduğu; levofloksasin ve kloramfenikole ise %90'ının duyarlı ve %10'unun orta duyarlı olduğu görülmüştür. İzolatların %90'ının güçlü biyofilm oluşturduğu ve %10'unun ise biyofilm oluşturmadığı görülmüştür. *G.mellonella* enfeksiyon modelinde ilk 24 saatte ortalama larva ölüm oranının %28,5 olduğu 144. saatte bu oranın %73'lere çıktığı gözlenmiştir.

**Sonuç:** *G. mellonella* larvalarının *S.maltophilia* virülans çalışmalarında deneysel enfeksiyon modeli olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Stenotrophomanas maltophilia*, virülans faktörleri, *Galleria mellonella*, model organizma

## ABSTRACT

**Atalar A., Investigation of Virulence Factors in Clinical Isolates of *Stenotrophomonas Maltophilia* Using *Galleria Mellonella* Model, Zonguldak Bulent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology, M.Sc. Thesis, Zonguldak, 2019**

**Aim:** In this study, it was aimed to investigate the virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates, to grow and produce *Galleria mellonella* larvae as experimental animal model and to show the usefulness of this model in pathogenesis and treatment studies.

**Materials and Methods:** Antibiotic susceptibility status of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates included in the study were determined using MicroScan Neg MIC Panel Type 44 kit according to the manufacturer's instructions. Biofilm formation was evaluated by spectrophotometric microplate method on twitching Müller Hinton medium and spreading on Luria Bertani medium. *Galleria mellonella* larvae were grown and produced in Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Medical Microbiology laboratory within the scope of our project. The melanization characteristics and mortality rates of the larvae were monitored between 24 and 144 hours after injection.

**Results:** Antibiotic susceptibility profiles were examined; trimetoprim sulfometaxazole and minocycline were susceptible to all isolates, 50% susceptible to ceftazidime, 15% were moderately susceptible and 35% were resistant; levofloxacin and chloramphenicol were found to be 90% sensitive and 10% moderate. It was seen that 90% of the isolates formed strong biofilms and 10% did not form biofilms. In *Galleria mellonella* infection model, the average larval mortality rate in the first 24 hours was 28.5% and this rate increased to 73% at 144th hours.

**Conclusion:** *Galleria mellonella* larvae in *Stenotrophomonas maltophilia* virulence study concluded can be used as model experimental infection.

**Keywords:** *Stenotrophomanas maltophilia*, virulence factors, *Galleria mellonella* infection model, model organism

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

KABUL VE ONAY:.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ .....	ix
TABLO DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Taksonomi ve Tarihçe .....	3
2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler .....	3
2.3. Yapısal Özellikler.....	5
2.4. Epidemiyoloji .....	5
2.5. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	6
2.6. Tedavi.....	7
2.7. Patogenez ve Virulans Faktörleri .....	8
2.7.1. Hücre dışı virulans faktörleri .....	9
2.7.2. Hücre ile ilişkili virulans faktörleri.....	12
2.8. <i>In Vivo</i> Enfeksiyon Modelleri .....	16
2.8.1. <i>G. mellonella</i> enfeksiyon modeli .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	22
3.1. <i>Stenotrophomanas maltophilia</i> İzolatları .....	22
3.2. Mikroorganizmaların Tanımlanması .....	22
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	22
3.4. Biyofilm Oluşturma.....	22
3.5. Hareket Testi .....	23
3.5.1. <i>Galleria mellonella</i> üretimi .....	24
3.5.2. <i>Galleria mellonella</i> larvaları.....	24
3.5.3. Larvalara enjeksiyon yapılması .....	26

4. BULGULAR .....	27
4.1. İzolatların Genel Özellikleri .....	27
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Profilleri.....	27
4.3. <i>Galleria mellonella</i> Enfeksiyon Modeli .....	27
4.4. Biyofilm Oluşumu .....	29
4.5. Hareket .....	30
5. TARTIŞMA .....	33
6. SONUÇLAR .....	38
7. KAYNAKLAR .....	39
8. EKLER .....	47
EK 1: Etik Kurul Kararı .....	47
9. ÖZGEÇMİŞ .....	48



## SİMGELER VE KISALTMALAR

C	: Kloramfenikol
CAZ	: Seftazidim
CFU	: Coloni forming unit (Koloni oluşturan ünite)
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
Dk	: Dakika
DNaz	: Deoksiribonükleaz,
DSF	: Diffusal signal factor
EMB	: Eozin Metilen Blue
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
gr	: Gram
ISCR	: İnsertion sequence common region
LB	: Luria Bertani
LEV	: Levofloksasin
LPS	: Lipopolisakkarid
M	: Minosiklin
MDR	: Çok ilaca dirençli
MHA	: Mueller Hinton agar
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
OD	: Optik dansite
QS	: Quarum sensing
Ribonükleaz	: RNaz
Sn	: Saniye
TMP-SXT	: Trimetoprim-sülfametaksazol
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
KF	: Kistik fibroz

## ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'da virulans faktörleri .....	8
Şekil 2: Biyofilm oluşum aşamaları.....	15
Şekil 3: Fare, <i>Drosophila</i> ve <i>Galleria mellonella</i> modellerinin avantaj ve dezavantajları.....	17
Şekil 4: Enfeksiyon açısından memeliler ve böcekler arasındaki benzerlikler (a) Enfeksiyon süresince patojenler salgıladıkları proteazlar ile böceklerde kütikül tabakasındaki, memelilerde epidermisteki protein komponentlerini parçalar. (b) Toksinler etkilerini, memelilerin veya böceklerin bağırsak mikrovilluslarındaki reseptörlere bağlanarak gösterir (c) Patojen mikroorganizmalar, memelilerde dolaşımdaki makrofajlar tarafından, böceklerde ise hemolenfte bulunan granüler hücreler tarafından fagosite edilir.....	18
Şekil 5: <i>G. mellonella</i> 'da; A. Sağlıklı larva, B. Melanizasyon, C. Koza formasyonu ..	21
Şekil 6: a) <i>G.mellonella</i> yumurtası. b) <i>G.mellonella</i> yumurtalarının mikroskopik görünümü.....	25
Şekil 7: a) Parçalanmış petek üzerine bırakılmış yumurtalar b) İnkübasyon.....	25
Şekil 8: a) Erişkin larvalar b) Bakteri enjeksiyonu öncesi gruplandırılan larvalar .....	25
Şekil 9: a) Larva enjeksiyonu öncesi hazırlık, b) Larva enjeksiyonu .....	26
Şekil 10: Enfeksiyonun 144. saatinde tam melanize ölü larvalar .....	28
Şekil 11: a) Larvada kısmi pupa oluşumu b) Melanize ölü larva ve ölü larva.....	28
Şekil 12: A, Tüm izolatlarda larva ölüm oranı; B, CAZ duyarlı izolatlarda larva ölüm oranı; C, CAZ orta duyarlı larva ölüm oranı; D, CAZ dirençli izolatlarda larva ölüm oranı; E, Standart ATCC 13637 numaralı <i>S.maltophilia</i> suşu ile enfekte edilen larvalarda ölüm oranı .....	29
Şekil 13: Mikroplakta biyofilm oluşumunun gösterilmesi .....	30
Şekil 14: Seğirme hareketinin değerlendirilmesinde kullanılan %0.1'lik kristal viyole ile boyanmış besiyerleri.....	30
Şekil 15: Seğirme hareketinin değerlendirilmesi için çap ölçümü.....	31
Şekil 16: Yayılma hareketi oluşumu .....	31

## TABLO DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın bazı biyokimyasal özellikleri.....	4
Tablo 2: <i>S. maltophilia</i> için CLSI. (2017) zon çapları değerlendirme standartları ile MIC değerlendirme kriterleri .....	7
Tablo 3: <i>S. maltophilia</i> için EUCAST zon çapı değerlendirme standartları ile MIC değerlendirme kriterleri.....	7
Tablo 4: <i>Galleria mellonella</i> 'nın bazı yapısal özellikleri ve yaşam süreleri.....	19
Tablo 5: <i>G. mellonella</i> larvasının sağlık skorlama indeksi.....	20
Tablo 6: Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları .....	27
Tablo 7: İzolatların örnek tipi, Seftazidime duyarlılık durumu, biyofilm ve hareket virulans faktörlerine ait sonuçlar .....	32

## 1. GİRİŞ

*Stenotrophomonas maltophilia*, Gram negatif, hareketli, aerob bir basil olup *Pseudomonadeceae* ailesinde yer alan *Stenotrophomonas* cinsinin tek üyesidir. Latince üremesi için çok az besine ihtiyaç duyan ve malt seven bakteri anlamına gelen *S. maltophilia* ilk kez 1943 de J. L. Edwards tarafından plevral sıvıdan izole edilmiştir (1).

*Stenotrophomonas maltophilia* çevresel ortamda yaygın olarak bulunur ve toprak, su, bitki ve hayvansal kaynaklardan izole edilebilirler. Ayrıca hastane ortamında nozokomiyal infeksiyonlarla ilişkili olarak gözlenmektedirler. *S. maltophilia* için başlıca nozokomiyal kaynaklar arasında nebulizatörler, diyaliz makineleri, kateterler, kan gazı cihazları, ventilatörler, termometreler ve hastane personelinin elleri sayılabilir (2). *S. maltophilia* suşlarının neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlara bağlı olarak görülen bakteriyemilerde mortalite oranı % 26,7 olarak verilmekte olup, bu oran diğer fırsatçı mikroorganizmalara bağlı olarak gelişen bakteriyemilerde gözlenen mortalite oranlarına yakın olarak bulunmuştur (3).

*S. maltophilia*'da virulans faktörleri, hücre dışı ve hücre ilişkili virulans faktörleri olarak ayrılır. Hücre dışı virulans faktörleri ekstrasellüler enzimler, hemolizinler, sitotoksinler ve sideroforlardır. Hücre ilişkili virulans faktörleri ise lipopolisakkarid (LPS), pili (fimbria), pilus yapısında olmayan adezinler ve flajelladır (4). Özellikle flagella ve fimbrial adezinler biyofilm oluşumu ile ilişkilidir. Yapılan araştırmalar *S.maltophilia*'nın sentetik yüzeylere adere olabilmemesinin, özellikle immünsuprese hastalarda ve nozokomiyal enfeksiyonlarda fırsatçı patojen hale gelmesinde önemli olduğunu vurgulamaktadırlar (3). Biyofilm üreten *S.maltophilia* suşları fagositlere ve antibiyotiklere daha dirençli olurken aynı zamanda plastik yüzeylere tutunabilme yeteneği kazanırlar. Bunun sonucu olarak da solunum cihazları, kateterler ve protezler gibi tıbbi cihazlarda kolonize olarak enfeksiyonlara neden olabilirler (5).

Günümüze kadar *S. maltophilia* izolatlarıyla yapılan az sayıda çalışmaların çoğu antibiyotik direnci, tedavi protokolleri ve epidemiyolojik veriler üzerine odaklanmasına karşın bu bakterinin virülans faktörleriyle ilgili çalışmalar çok nadirdir (6). Halen, bu mikroorganizmaya karşı daha etkili kontrol ve tedavi

stratejileri geliştirebilmek için virulans faktörlerinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılması, bu hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların virulans faktörlerinin belirlenmesi ve etkili tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasında in vivo modeller geçmişten beri tercih edilmektedir. Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında daha çok fare, kobay ve sıçan gibi memeli hayvanlar kullanılmaktadır. Ancak günümüzde memeli hayvanların kullanımını kısıtlayan bazı faktörler söz konusudur. Bu faktörler arasında memeli hayvan kullanımında yasal düzenlemelerin zorlaştırılması, hayvan kullanımına yönelik hassasiyet artışı sayılabilir (7). Ayrıca memeli modellerin kullanımı için gelişmiş laboratuvarlar, deneyimli teknik personel ve veteriner hekimlere ihtiyaç duyulmakta olup Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası zorunluluğu bulunmaktadır. Belirtilen kısıtlamalara bağlı olarak alternatif omurgasız hayvan modellerinin kullanımı gündeme gelmiştir (8). Omurgasız modeller arasında sıklıkla tercih edilen *G. mellonella* larvalarının bağışıklık sistemi memeliler ile benzerlik gösterir ve bu durum enfeksiyon sürecinin izlenmesinde avantaj sağlar. Bu larvalar oldukça hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir ve yetiştirilmeleri oldukça kolay olup maliyetleri düşüktür. Boyutları büyük olduğundan (~2-4 cm) enfeksiyon etkenleri ve çeşitli antimikrobiyal ajanların enjeksiyonuna olanak sağlar (9). Ayrıca 15-37°C'da yaşayabilme yeteneğinden dolayı özellikle insan sağlığını tehdit eden tıbbi öneme sahip birçok patojen mikroorganizmanın virulans faktörlerinin araştırılmasına olanak sağlar (10). Belirtilen avantajlar göz önüne alınarak çalışmamızda enfeksiyon modeli olarak *G. mellonella* seçilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Taksonomi ve Tarihçe

*Stenotrophomonas maltophilia*, Gram negatif, hareketli, aerob bir basıl olup *Pseudomonadeceae* ailesinde yer alan *Stenotrophomonas* cinsinin tek üyesidir.

Latince üremesi için çok az besine ihtiyaç duyan ve malt seven bakteri anlamına gelen *S. maltophilia* ilk kez 1943 de J. L. Edwards tarafından plevral sıvıdan izole edilmiş ve “Bacterium bookeri” olarak adlandırılmıştır. 1958 yılında Hugh tarafından oral karsinomalı bir olguda tespit edilerek ‘*Pseudomonas maltophilia*’ adı verilmiştir. 1981 yılında ise Swings ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda ‘*Xanthomonas*’ cinsine ait olduğu belirlenmiş ancak 1993 yılında Palleroni ve Braudbury tarafından yapılan çalışmalarda ise genomik farklılıklar nedeniyle bakterinin '*Pseudomonas*' ve '*Xanthomonas*' cinsine ait olmadığı gösterilmiştir. Böylece *Stenotrophomonas* olarak yeni bir cins tanımlanmıştır (1).

### 2.2. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

*Stenotrophomonas maltophilia* düz ya da hafif kıvrık şekilli, 0.5-1.5 µm uzunluğunda, gram negatif bir basıldır. Spor oluşturmaz ve flajelası ile hareketlidir (11). Koloni morfolojilerine bakıldığında kanlı agarda parlak, pürüzsüz ve sarı beyaz şekilli koloniler oluştururlar ve beta hemoliz yapmazlar. Koyun kanlı agarda (%5) açık sarı ya da lavanta yeşili; Eozin Metilen Blue (EMB) agar ve MacConkey agar gibi besiyerlerinde laktoz negatif olmalarından dolayı şeffaf, Mueller Hinton agar (MHA) da ise kahverengimsi pigmentli düzgün kenarlı, parlak koloniler oluştururlar (1). *S. maltophilia* zorunlu aerob bir bakteridir. Sıcaklık üreme üzerine etkilidir; 5°C'nin altında ve 40°C'nin üzerinde üreyemez, üreme için en iyi sıcaklık 35°C'dir. Biyokimyasal özelliklerine bakıldığında *S. maltophilia* maltozdan asit yapabiliyor olmasına rağmen glukozu fermente edemez, bu nedenle non fermenter bir bakteridir. Katalaz testi pozitif olup eskülin hidrolizi yapar ve DNaz üretir. Oksidaz, fenillalanin deaminaz, indol, metil red ve üreaz testleri ise negatiftir (11). Biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1:** *Stenotrophomonas maltophilia* 'nın bazı biyokimyasal özellikleri

Test	Reaksiyon
İndofenol oksidaz	-
Katalaz	+
Üreme	5 °C
	18 °C
	37 °C
Hareket	18 °C
	37 °C
İndol	-
Lizin dekarboksilaz	+
Ornitin dekarboksilaz	-
Metil red	-
Hidrojen sülfid	-
Nitrat redüksiyonu	D
Sitrat	D
Hidroliz	Eskülin
	Jelatin
	Tween 80
	DNA
Karbon Kaynağı	Nişasta
	Adonitol
	Arabinoz
	β hidroksibütirat
	sellobioz
	Dulsitol
	Glukoz

(+), suşların %85'inden fazlası için pozitif; (v), suşların %16-85'i arası için pozitif; (-), suşların %15'inden azı için pozitif anlamına gelmektedir.

### 2.3. Yapısal Özellikler

*S. maltophilia*'da epidemiyolojik çalışmalarda tiplendirmede kullanılan yapısal olarak somatik O antijenleri ile flajellar H antijenleri tanımlanmıştır. En sık görülen O3 antijeni olmak üzere 31 O antijeni tanımlanmıştır. Konak hücrelere invazyon ve kolonizasyondan önce epitel hücrelerine adezyon tanımlanmıştır. Bakterinin kolonizasyonu, fimbrial adezinlerle doğrudan bağlanma ya da çapraz bağ oluşturarak dolaylı bağlanma şeklinde meydana gelir. Klinik izolatlara ile yapılan bazı çalışmalarda SMF-1 adı verilen fimbrialar tespit edilmiştir (12). *S. maltophilia* yapısal özelliklerinden biri ve aynı zamanda direnç mekanizması olan efluks pompasıdır. Efluks pompası mekanizması ile antimikrobikler dahil olmak üzere istenmeyen bazı maddeleri dışarı atar. Bu mekanizma ilk kez SmeDF ismiyle tanımlanmıştır. Ayrıca SmeABC, SmeT, SmeRV, SmeYZ, SmeZ gibi bir çok efluks pompa sistemi de tanımlanmıştır. Bu efluks pompalarının *S. maltophilia*'nın çeşitli antibiyotiklere direncinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (13).

### 2.4. Epidemiyoloji

*Stenotrophomonas maltophilia* çevresel ortamda yaygın olarak bulunur ve toprak, su, bitki ve hayvansal kaynaklardan izole edilebilirler. Ayrıca hastane ortamında nozokomiyal infeksiyonlarla ilişkili olarak gözlenmektedirler. *S. maltophilia* için başlıca nozokomiyal kaynaklar arasında nebulizatörler, diyaliz makineleri, kateterler, kan gazı cihazları, ventilatörler, termometreler ve hastane personelinin elleri sayılabilir (2). *S. maltophilia*'nın kistik fibrozisli hastalardan da sıklıkla izole edildiği bilinmektedir (14). Periton dializi almakta olan hastalarda meydana gelen peritonitlerde de etken olarak *S. maltophilia* izole edilebilmektedir (15). *S. maltophilia* suşlarının neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlara bağlı olarak görülen bakteriyemilerde mortalite oranı % 26,7 olarak verilmekte olup, bu oran diğer fırsatçı mikroorganizmalara bağlı olarak gelişen bakteriyemilerde gözlenen mortalite oranlarına yakın olarak bulunmuştur (3)

*S. maltophilia* enfeksiyonları için immün sistemin baskılanması predispozan bir faktör olarak bilinmektedir. Özellikle uzun süre hastanede yatış, kemoterapi, malignite, trakeostomi ve nötrojeni *S. maltophilia* ile enfeksiyon gelişiminde etkilidir (16) Yapılan çalışmalarda santral venöz kateter varlığının enfeksiyonları



artırdığı ve kaynak oluşturduğu belirtilmiştir (17) Yapılan bir çalışmada mekanik ventilatör ihtiyacının ve trakeostominin *S. maltophilia* pnömonisi riskini artırdığı gözlenmiştir (2). Daha önceden uygulanan antibiyotik tedavisinin (karbapenemler, aminoglikozitler, florokinolonlar, geniş spektrumlu sefalosporinler) hastalığa yatkınlığı artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (17).

## 2.5. Antibiyotik Duyarlılığı ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

*S. maltophilia* beta-laktam, aminoglikozid ve tetrasiklin gibi pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe farklı mekanizmalar geliştirerek direnç kazanabilmektedir. Bu mekanizmalar arasında dış membran geçirgenliğinde azalma, efluks pompası, çeşitli enzimlerin üretimi sayılabilir. Bu durum özellikle tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır (18). *S. maltophilia*'da Trimetoprim-sulfametoksazol direnci sul1 taşıyan sınıf 1 integronlarla ve sul2 taşıyan ISCR (insertion sequence common region) elementine bağlı oluşmaktadır. Kullanımının artmasıyla ISCR elementleri ve sınıf 1 integronlarda sul gen aktivitesinin artacağı düşünülmektedir (11). Beta laktam direnci ise L1 ve L2 beta laktamaz enzimlerine bağlı şekillenmektedir. Kinolonlara dirençte öncelikle efluks pompa ekspresyonu (özellikle SmeDEF) ve dış membran permeabilitesinin düşük geçirgenliği rol oynar. Ayrıca topoizomeraazların mutasyonu da *S. maltophilia* için kinolon direncinde rol oynamaktadır. Aminoglikozid direnci ise aminoglikozid modifiye edici enzimler, efluks pompası ve dış membran proteinleri aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca bu bakteride, mutasyonla veya türler arasında genetik materyal aktarımı yoluyla da antibakteriyellere direnç gelişmektedir (11). CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)' da tikarsilin-klavulanik asit, seftazidim, minosiklin, levofloksasin ve kloramfenikol için broth dilüsyon yöntemi ile MIC sınır değeri ve trimetoprim-sülfametaksazol, levofloksasin ve minosiklin için disk difüzyon sınır değerleri belirlenmiştir. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 'e göre seftazidim intrensek dirençli olarak kabul edilmiştir. *S. maltophilia* için CLSI'a (2017) göre zon çapı ve MİK yorumlama standartları Tablo 2'de verilmiştir Ayrıca günümüzde *S. maltophilia* için EUCAST sınır değerine sahip tek antibiyotik trimetoprim-sülfametoksazoldur (SXT). EUCAST'e göre SXT zon çapı ve MİK yorumlama standartları Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 2:** *S. maltophilia* için CLSI. (2017) zon çapları değerlendirme standartları ile MIC değerlendirme kriterleri (19).

Antibiyotik	Zon çapı sınır değerleri (mm)			MİK değerlendirme kriteri (µg/ml)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
<b>Tikarsilin-klavulonat</b>	-	-	-	≤16/2	32/2-64/2	>128/2
<b>Seftazidime</b>	-	-	-	≤8	16	≥32
<b>Minosiklin</b>	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
<b>Levofloksasin</b>	≥17	14-16	≤14	≤2	4	≥2
<b>Trimetoprim-sülfametaksazol</b>	≥16	11-15	≤14	≤2/38	-	≥4/76
<b>Kloramfenikol</b>	-	-	-	≤8	16	≥32

**Tablo 3:** *S. maltophilia* için EUCAST zon çapı değerlendirme standartları ile MIC değerlendirme kriterleri.

Antibiyotik	MİK sınır değeri (mg/L)		Zon çapı sınır değeri (mm)	
Trimetoprim-sülfametaksazol	S≤	R>	S≥	R<
	4	4	16	16

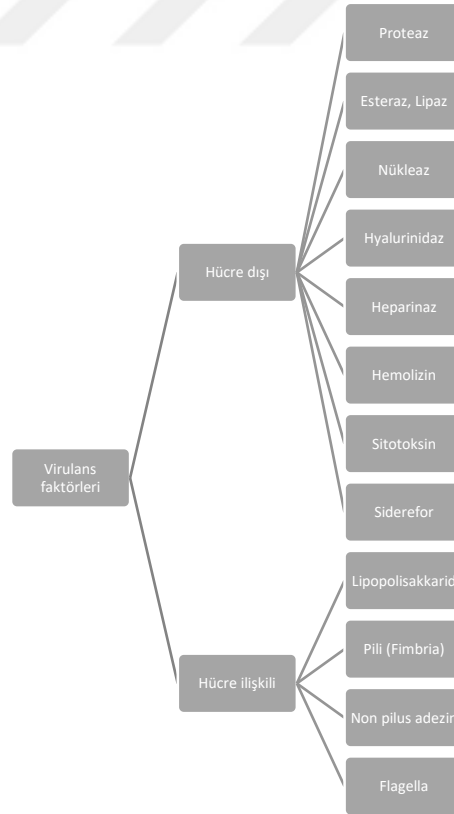
## 2.6. Tedavi

*S. maltophilia* mevcut geniş spektrumlu antibiyotiklere doğal dirençlidir. *S. maltophilia* hemen hemen tüm  $\beta$  laktamlara, 3.kuşak sefalosporinlere, karbapenemlere dirençli kabul edilir. Aminoglikozid ve kinolonlara ise değişken duyarlılıktadırlar (2). Trimetoprim-sülfametoksazol *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olarak önerilir. Kinolonlar da *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Yeni nesil kinolonların ise tedavide daha etkili olduğu bildirilmiştir (20). Zer ve ark.(21) tarafından yapılan bir araştırmada hastanede yatmakta olan hastalardan izole edilmiş *S. maltophilia* suşları çalışmaya alınmış ve çalışmaya alınan suşların (%97.3) trimetoprim-sülfametoksazole (TMP-SXT), (%90.5) siprofl oksasine, (%82.4)

tikarsilin-klavunata, (%78.4) amikasine ve (%66.2) imipeneme duyarlı olarak bulunmuştur. Suşların %90'dan fazlası üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim, seftriakson ve seftazidime dirençli bulunmuştur. Sonuç olarak en etkili antibiyotik olarak, TMP-SXT belirlenmiş ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin tedavide yeri olmayacağı sonucuna varılmıştır. Yapılan başka bir çalışmada, *S. maltophilia* suşlarının kalp kapağı replasmanı yapılan hastalarda gelişen endokardit nedeniyle yapılan kan kültürlerinde her iki hastada da *S. maltophilia* ürediği ve hastaların tikarsilin-klavulanat – trimetoprim sulfametoksazol kombinasyonu ile başarıyla tedavi edildikleri bildirilmiştir (22).

## 2.7. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Virulans faktörleri, bakteri hücreleri tarafından üretilen yapılar veya moleküllerdir. *S. maltophilia*'da virulans faktörleri, hücre dışı ve hücre ilişkili virulans faktörleri olarak ayrılır. Hücre dışı virulans faktörleri ekstrasellüler enzimler, hemolizinler, sitotoksinler ve sideroforlardır. Hücre ilişkili virulans faktörleri ise lipopolisakkarid (LPS), pili (fimbria), pilus yapısında olmayan adezinler ve flajellardır.



Şekil 1: *Stenotrophomonas maltophilia*'da virulans faktörleri (14).

*S. maltophilia*'nın enzim aktivitesinin araştırılması 1970'lerde başlamıştır. Proteaz, lipaz, esteraz deoksiribonükleaz (DNaz), ribonükleaz (RNaz) ve hyaluronidaz üretimi enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynar. Bunların dışında *S. maltophilia* klinik izolatlarının karşılaştırmalı çalışmaları farklı hücre dışı enzimlere sahip olası suşların ortaya konulmasını sağlayarak bu türlere özgü virulans faktörlerin belirlenmesini sağlayacaktır (4).

### 2.7.1. Hücre dışı virulans faktörleri

#### Proteazlar

Proteazların (proteolitik enzimler) esas fonksiyonu bakteri için gerekli olan serbest aminositlerin hücre içine alınmasını sağlamaktır. Ancak enfekte konak hücrede virulans faktörü olarak da rol oynadıklarına dair kanıtlar da vardır (23). *S. maltophilia* ayrıca bu proteolitik enzimleri, büyüme, olumsuz ortam şartlarında canlılığını sürdürme amaçlı da üretebilir. Nozokomiyal *S. maltophilia* izolatlarında ekstraselüler serin proteazlar bulunmuştur. Bu enzimler özellikle kollajen ve fibronektini etkileyerek bağ doku hasarına sebep olurlar (24). *S. maltophilia*'nın proteolitik aktivitesi özellikle immünsuprese hastalarda fulminan hemorajik pnömoniye sebep olarak ölümcül sonuçlar doğmasına sebep olabilir (23). Başlıca ekstraselüler proteaz olan alkalın serin proteaz, *StmPr1* geni tarafından kodlanır ve bağ dokuya etki ederek virulans faktör olarak rol oynar. *S. maltophilia* suşları'nın % 85'inde jelatinaz üretimi önemli bir biyokimyasal özellik olarak görülür. Ektima gangrenozumlu bir hasta olgusunda hastanın kanından izole edilen *S. maltophilia* izolatında ekzoenzim profiline bakıldığında hem jelatinaz hem de elastaz enzimi içerdiği görülmüştür. Elastaz, kan damarlarında elastik tabakaya etki ederek bakteri hücrelerinin subkutan dokuya geçmelerine sebep olur (25). *S. maltophilia*'da tanımlanan bir diğer proteolitik enzim streptokinaz olarak ta bilinen fibrinolizindir (1). Bu enzim bazı Gram pozitif bakterilerde invazyon faktörü olarak belirlenmiş ancak *S. maltophilia* için veriler yetersizdir (26).

## **Esteraz, Lipaz ve Fofolipaz**

Esterazlar, bir grup hidrolitik enzim olup bazı vakalarda virülans ile ilişkili bulunmuştur. Nicoletti ve ark. (CF'Lİ hastalarda) (cystic fibrosis) yaptıkları bir çalışmada birçok *S. maltophilia* izolatında esteraz ekspresyonunu ortaya koymuşlardır. Esteraz Smlt3773 geni ile ilişkili olup K279a geni tarafından kodlanır. Ekstrasellüler lipazlar, karbonhidrattan fakir ortamlarda lipitler karbon kaynağı olarak kullanılır ve bakterinin hayatta kalmasını sağlar. Ayrıca konak dokularında invazyonuna yardımcı olur (27). Akciğer enfeksiyonlarına neden olan patojenler lipaz üreterek ya lipitten zengin akciğer doku komponentlerini hidolize ederler ya da yoğun bir inflamatuvar yanıt oluşmasını sağlarlar (23). *S. maltophilia* klinik izolatları ile yapılan farklı çalışmaların hepsinde yoğun lipaz üretimini görülmesi bu enzimlerin patogeneizde etkili olduğunu göstermektedir (27). *S. maltophilia* genomunda hemolitik olmayan fosfolipaz C (lesitinaz) 'yi kodlayan genler ve D sınıfı fosfolipazlar tanımlanmıştır. Fosfolipazlar fosfolipidleri yağ asitlerine hidrolize ederek hücre zarına zarar verirler (28). Fosfolipazlar patojenlerin konak hücre ve dokulara girmesini sağlayarak normal hücre fonksiyonlarını olumsuz etkilerler. Ayrıca virülans faktörü olarak mukus, lipoprotein membranlar ve immunoglobulinler gibi koruyucu moleküllerin yok edilmesine neden olurlar (29). Figueiredo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Fosfolipaz aktivitesi, sadece trakea ve karaciğerden izole edilen *S. maltophilia* klinik izolatlarında görülmüştür (29).

## **Nükleazlar**

*S. maltophilia*'nin enzim aktivitesi üzerine yapılan tüm çalışmalarda ekstrasellüler nükleazların (DNaz ve RNaz) tüm suşlarda üretildiği gözlenmiştir. Teorik olarak bu enzimlerin DNA' nın parçalanmasına sebebiyet vereceği bilinse de virülans faktörü olarak rolleri henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (30). Brezilya'daki hastanelerde nozokomiyal enfeksiyonlarda izole edilen tüm *S. maltophilia* suşların % 97.6'sında DNaz aktivitesi gösterilmiştir (31). Yapılan bir başka çalışmada ise trakeal aspirat, balgam ve serebrospinal sıvı, yara ve idrardan izole edilen *S. maltophilia*'nin tüm suşları ile kandan izole edilen suşların %94.8'inde DNaz enzimi belirlenmiştir (27).

## **Hyaluronidaz**

Hyaluronidaz enzimi hyaluronik asiti parçalayabilirler, fakat bazıları aynı zamanda kondroitin sülfatı da parçalayarak etkisini gösterir (32). Ancak *S. maltophilia*'da virülans faktörü olarak rolü, henüz yeterince çalışılmamıştır. Bununla birlikte bu enzimin doku invazyonunu kolaylaştırdığı da bilinmektedir. Ayrıca hyaluronidaz Gram negatif bakterilerde hücre için besin kaynağı olarak kabul edilmektedir (27).

## **Heparinaz**

Heparinaz, konak dokuda hücre dışı matrikse etki ederek parçalanmasını sağlayan önemli bir enzimdir. Daha çok ta solunum sisteminde etkisini göstererek patojenin invaze olmasını kolaylaştırır (27). Heparin sülfat bu enzimin substratı olup bronşiyal havayollarında proteoglikanların hücre dışı matrisinin bir bileşenidir. Dolayısıyla heparinaz trakeobronşiyal enfeksiyonların patogenezinde rol oynar. Thomas ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada heparinaz aktivitesi mikroorganizmanın izole edildiği kaynağa göre geniş bir aralık (%0-%80) göstermektedir. Heparinaz üretimi özellikle tıbbi cihazlardan izole edilen suşlarda (%73.2) diğer suşlara (%62.1) göre daha yüksek bir yüzdeye sahiptir (27).

## **Hemolizin**

Hemolizin üretimi, glukozu fermente edemeyen Gram negatif bakterilerde önemli bir virülans faktörüdür (31). Thomas ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda *S. maltophilia*'nın tüm klinik izolatlarında hemolizin üretimi gözlenmiştir (27). Yapılan başka bir çalışmada, Figueiredo ve ark. test edilen suşların yarısında hemolitik aktivite olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca lipaz, proteaz ve lesitinaz gibi hücre zarını parçalayan enzimlerin hemolitik aktivite ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır (29). *S. maltophilia* suşlarının koyun kanı içeren kanlı agarda hemolitik aktivitesinin daha iyi olurken bu oran tavşan kanı ile hazırlanan besiyerinde %90.4 ve insan kanı kullanılarak hazırlanan besiyerinde %64.3 olduğu gözlenmiştir. sonuçların farklı olmasının sebebi ise eritrosit hücre membranının fosfolipit bileşeninin farklı olmasından kaynaklanacağı düşünülmektedir (31).

## **Demir kazanım mekanizmaları**

Bakteriler birçok temel hücresel fonksiyon ve ve metabolik yollar için demire gereksinim duyarlar. Demir bakteriyel büyüme ve bazı virulans faktörlerin ekspresyonu için önemlidir (33). Sideroforlar yüksek afiniteli ferrik şelatörlerdir. bakterinin demiri bağlayarak hücre içine girmesini sağlayan yapılardır. Demir transferrin ve laktoferrin gibi proteinlere bağlı olarak bulunur. Sideroforlar konak hücrede demir sınırlı şartlarda bulunduğu patojenin hayatta kalmasını sağlarlar (34). Son zamanlarda, cihazla ilişkili enfeksiyonlardan kaynaklanan tüm *S. maltophilia* izolatlarının katekol tipi siderofor ürettiği belirlenmiştir.

### **2.7.2. Hücre ile ilişkili virulans faktörleri**

#### **Lipopolisakkarid (LPS)**

Gram negatif bakterilerin hepsinde olduğu gibi *S. maltophilia*'da da hücre membranının dışında LPS molekülü bulunur. Bu molekül lipid A ve spesifik O antijeninden oluşur (35). LPS bakterinin kolonizasyonuna yardımcı olan ve kompleman aracılı hücre ölümüne karşı bakterinin direnç kazanmasını sağlayan virulans faktörüdür (36). LPS'nin lipit A bileşeni, periferik kanda monositleri ve alveolar makrofajları uyararak solunum yolu enflamasyonunun patogenezinde rol oynar (24).

#### **Pili (Fimbria)**

Epitel hücrelerine bağlanma birçok bakteride, kolonizasyonun başlatılmasında önemli bir role sahiptir ve bu bağlanma adezinler ile sağlanır. Patojen mikroorganizmalarda farklı bakteriyel adezinler bulunmuştur. Bakteriyel adezinler ya pili şeklinde ya da afimbrial adezinler şeklindedir (23). Fimbria doğrudan ökaryotik hücrelere bağlanmayı sağlayan yapılardır. Ayrıca bakteri hücreleri arasında köprü görevi yaparak kolonizasyonu kolaylaştırırlar ve böylece patogenezinde etkili olurlar (37). *S. maltophilia*'da fimbrial yapılar, SMF-1 olarak Oliveira-Garcia ve ark. tarafından tanımlanmış ve identifiye edilmiştir. *S.*

*maltophilia*'nın abiyotik yüzeylere yapışabilmesi özellikle tıbbi implantlar ve kateterler ile ilişkili kolonizasyon ve enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (12). Ayrıca yapılan çalışmalarda SMF-1'in hemaglutinasyon, hücre adezyonu ve biyofilm oluşumuna da katkıda bulunduğu dair kanıtlar bulunmuşlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *S.maltophilia* izolatlarının çevresel kaynaklı izolatların aksine hepsinde *smf-1* geninin olduğu yönündedir. Ayrıca birçok gram negatif bakteride (*Neisseria spp.*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, enteropatojenik *Escherichia coli*) Tip IV pili bildirilmiştir. Bu pililer çok çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Bunlardan bazıları konak hücreye adezyon, ‘twitching’(seğirme) hareketi ile ilişkilidir. Ayrıca hedef hücre özgüllüğünü belirlemektedir (38).

### **Pilus olmayan non fimbrial adezinler**

Pilus olmayan adezinler, doğrudan bakteri dış membranında bulunan kısa monomerik veya oligomerik yapılardır. Bakterinin abiyotik yüzeylere ve konakçı hücrelere tutunmasını sağlar ve biyofilm oluşumunda rol oynarlar (39).

### **Flajella**

Flajella bakteriyel motiliteden sorumlu olup adezyonda da rol oynayan immünojenik bir yapıdır. Bakterinin abiyotik yüzeylerin yanı sıra konak müköz membranlarına adezyonuna katkıda bulunur. Yapılan araştırmalar *S. maltophilia*'nın sentetik yüzeylere adere olabilmesinin özellikle immünsuprese hastalarda ve nozokomiyal enfeksiyonlarda fırsatçı patojen hale gelmesinde önemli olduğunu vurgulamaktadırlar (12). *S.maltophilia*'nın IB3-1 hücrelerine (Kistik fibrozlu hastalarda bronşiyal epitel hücreleri) adezyonunda flajellanın rolünün belirlenmesinin amacıyla yapılan bir çalışmada, bakterinin bazı suşlarında mutasyon (flajella defekti) meydana getirilmiş, flajella kaybının bakteriyel adezyonu tamamen ortadan kaldırmaya da önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Öte yandan, aynı çalışmada bakteriyel hücrelerin IB3-1 hücrelere adezyonu ile motilite arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde flajellanın *S. maltophilia*'nın adezyonun erken evrelerinde rolünün olabileceği yönündedir (40).



## Biyofilm oluşumu

Biyofilm mikroorganizmaların, biyotik veya abiyotik yüzeylere adhezyonu sonrasında oluşturdukları “glikokaliks” olarak da adlandırılan ekstrasellüler matriks içinde, birbirlerine yapışarak meydana getirdikleri oluşumlardır. Bu özel oluşum bakteriyi antimikrobiyal ilaçlar, antiseptik solüsyonlar ve konak immün yanıtına karşı korur ve direnç kazanmasını sağlar (24).

Biyofilm yapısı, mikroorganizmanın kolonizasyonunu kolaylaştıran, pH değişikliği, besin yetersizliği gibi olumsuz çevresel faktörlere, antibiyotik, dezenfektan madde gibi kimyasallara karşı dirençli olmasını sağlayan önemli bir virülans faktörüdür (41).

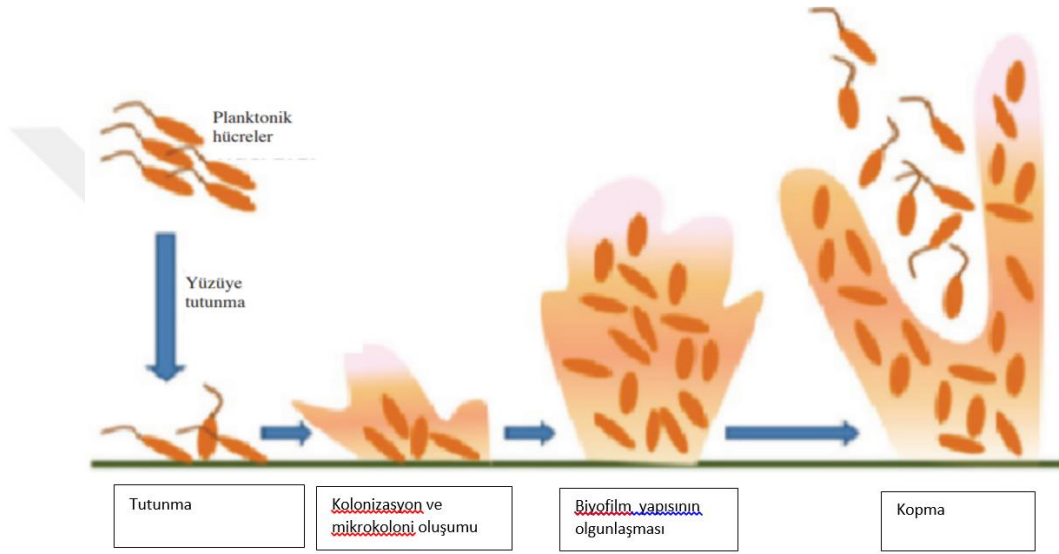
Biyofilm oluşumu, Şekil 2’de (42) görüldüğü gibi mikroorganizmanın bir yüzeye tutunması, geri dönüşümsüz bağlanma, kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu, kopma evreleri olmak üzere dört basamakta gerçekleşmektedir.

Günümüzde gelişen teknoloji ve mikroskopik yöntemler sayesinde mikrobiyal biyofilmlerin enfeksiyonlar açısından önemi ortaya koyulmaktadır. Biyofilm yapısı konakçı immün sistemiyle etkileşir ve immün yanıt oluşumunu tetikleyerek enfeksiyon ve enflamasyona sebep olur (43).

Mikroorganizma tarafından oluşturulan bu yaşam formu, hem biyotik ve hem de abiyotik yüzeylerde oluşabilmektedir. Gerek tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde gerekse konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen biyofilmler kronik yara enfeksiyonlarında, kistik fibroz, endokardit gibi pek çok farklı hastalıkta rol almaktadır (44).

*S. maltophilia*'nın biyofilm oluşturma kabiliyeti virülans üzerine doğrudan etkilidir. Biyofilm formasyonu özellikle kistik fibrozda akciğer hastalığı ve kronik solunum yolu hastalıklarında enfeksiyonun ilerlemesinde etkilidir (40). Biyofilmler hastane kaynaklı enfeksiyonların % 65'i ile ilişkilidir. *S. maltophilia* çeşitli tıbbi cihaz ve ekipmanları bu yolla kontamine eder. Ayrıca nemli yüzeylerde biyofilm oluşturabilir ve bu da suda çözünür dezenfektanlara karşı bakteriyeye direnç kazandırır. Solunum tüpleri, kateterler, diyaliz cihazları, dişçilik ekipmanları, lavabolar ve musluklar doğrudan ya da dolaylı enfeksiyon kaynağı haline gelir (24). *S. maltophilia* klinik izolatları arasında biyofilm oluşturma kabiliyeti (güçlü, orta ve zayıf) açısından farklılıklar olabilir. Özellikle kronik enfeksiyonların erken

evrelerinde bakteri ilerleyen evrelerine göre daha güçlü biyofilm oluşturma kabiliyetindedir (45). *S. maltophilia*'nın biyofilm oluşumuna katılan genler arasında *spgM*, *rmlA*, *rpfF*, *bsmR* ve *ax21* sayılabilir (46). Ax21'in dış membran proteini olup 'difüzyon sinyal faktörü' (DSF) üzerinde etkili olduğu varsayılmaktadır. *spgM* geni özellikle kolonizasyon ve konağın savunma sisteminden kaçışta etkilidir (36). *rmlA* seğirme hareketi, adezyon ve biyofilm oluşumunda, *rpfF* motilite, ekstrasellüler proteaz, LPS ve biyofilm formasyonu ve *bsmR* geni yüzme hareketi ve biyofilm oluşumu üzerine etkilidir (47).



**Şekil 2:** Biyofilm oluşum aşamaları (42).

### “Quorum sensing” (QS) mekanizması

Birçok organizma tür içi ve/veya türler arasında farklı sinyal moleküllerini kullanarak birbirleriyle iletişim kurmaktadır. Bakteriler sinyal moleküllerini salgılayabildikleri gibi, bu moleküllerin ortamdaki yoğunluğunu ölçebilen bir mekanizmaya da sahiptir. Günümüzde bu olaya “quorum sensing” (yeterli çoğunluğu algılama) adı verilmektedir. Beslenme, üreme, spor oluşumu, antibiyotiklere direnç, biyofilm oluşumu gibi davranışların çoğu QS sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. DSF *S. maltophilia*'da antibiyotik direnci ve virulans gibi birçok fonksiyonla ilgili önemli bir role sahiptir. DSF sinyalizasyonunda bozulma daha az biyofilm oluşumu, motilite kaybı, hücre dışı proteaz üretiminin azalması ve antibiyotiklere duyarlılığın artması ile sonuçlanabilir. Quorum sensing mekanizması otoindükleyiciler olarak bilinen hücre dışı sinyal moleküllerinin üretimi ve tanınmasında

görevlidir. Otoindükleyiciler, bakteri popülasyonu arttığında ortamda birikmeye başlar. Ortamda otoindükleyicilerin birikimi ile birlikte hücreler ortamdaki değişiklikleri (bakteri popülasyonunun artışı gibi) algılamaya başlar (48). *S. maltophilia*'da hem biyofilm oluşumu hem de virülans faktörleri QS mekanizması tarafından kontrol edilir. QS bileşenlerine antagonist bileşikler üretilerek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunulabilir. *S. maltophilia*'da kolonizasyonun önlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılığının oluşturulması ancak virülans faktörlerinin tam olarak anlaşılıp inhibe edilmesi ile sağlanabilir (49).

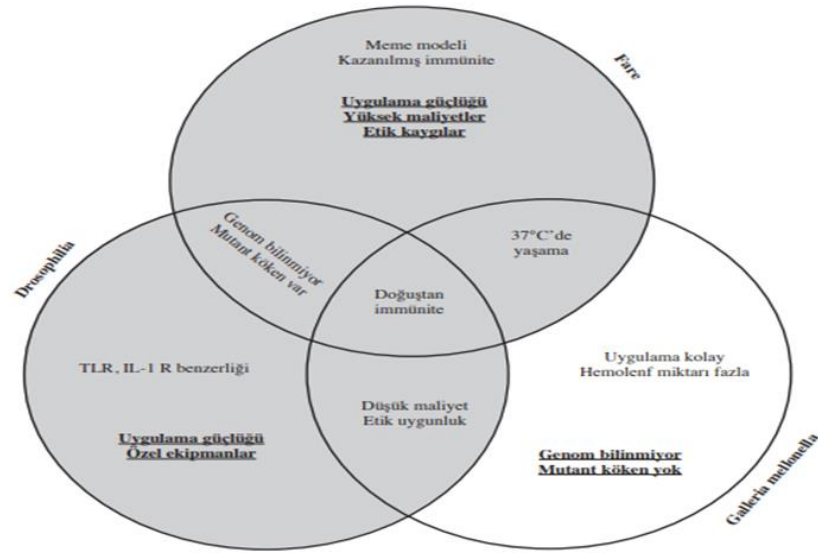
## 2.8. *In Vivo* Enfeksiyon Modelleri

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılması, bu hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların virülans faktörlerinin belirlenmesi ve etkili tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasında *in vivo* modeller geçmişten beri tercih edilmektedir. Sıklıkla kullanılan *in vivo* modeller arasında fare, sıçan, kobay ve tavşan gibi memeli hayvanlar gösterilebilir. Ancak günümüzde deneysel çalışmalarda memelilerin kullanımı ile ilgili yasal düzenlemelerin zorlaştırılması ve bu hayvanların kullanımına ilişkin hassasiyetin artması ile sayılan türlerin kullanımı kısıtlanmaktadır (8). Ayrıca bu modellerin kullanımı için gelişmiş laboratuvarlar, deneyimli teknik personel ve veteriner hekimlere ihtiyaç duyulması sebebiyle de alternatif olarak omurgasız hayvan modellerinin kullanımı gündeme gelmiştir (50). Memeli modelleri ile çalışma yapılırken Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası zorunluluğu olmasına karşın omurgasız modellerde henüz böyle bir durum bulunmamaktadır. Omurgasız modeller arasında; bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*, sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* ve balmumu güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella* larvası sayılabilir. Sayılan modellerin kullanımı özellikle 90'lı yılların sonundan itibaren hız kazanmış olup günümüzde devam etmektedir.

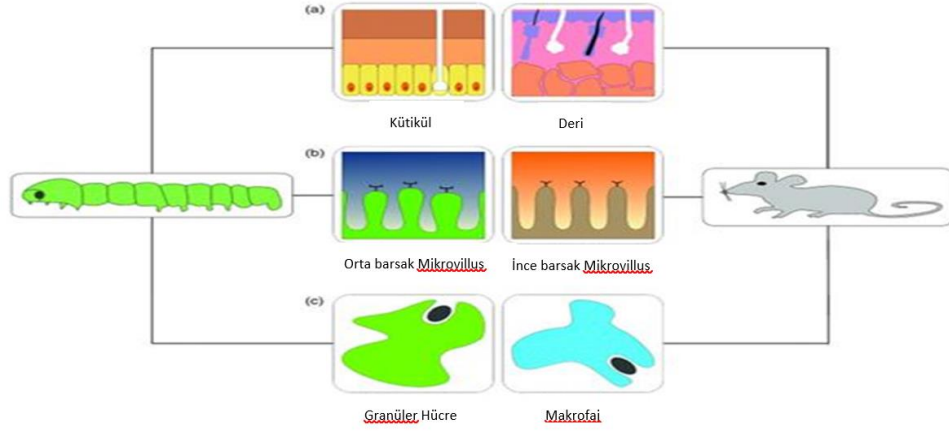
### 2.8.1. *G. mellonella* enfeksiyon modeli

*G. mellonella* larvalarını diğer omurgasızlara göre öne çıkaran bazı özellikleri vardır. Bu larvalar oldukça hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir. Yetiştirilmeleri oldukça kolaydır ve maliyetleri de düşüktür. Boyutlarının büyük olması (~2-4 cm)

enfeksiyon etkenlerinin ve çeşitli antimikrobiyal ajanların enjeksiyonuna olanak sağlar. Ayrıca bağışıklık sisteminin memeliler ile benzerlik gösterir ve bu durum enfeksiyon sürecinin izlenmesinde avantaj sağlayabilir (51). Bu larvaların en önemli özellikleri ise 15-37°C’da yaşayabilme yeteneğidir. Özellikle insan sağlığını tehdit eden tıbbi öneme sahip birçok patojen mikroorganizmanın virulans faktörlerinin ekspresyonu 37°C’da gerçekleştiğinden bu durum *G. mellonella* larvalarını ön plana çıkarmaktadır. Bunların dışında *G. mellonella*’da larva başına yaklaşık 20-50 µl hemolenf elde edilebilmesi diğer omurgasız hayvan modellerine göre tercih edilmesinde önemli bir faktördür (52). Enfeksiyon modeli için, larvaya etkenin inokulasyonunda, oral, topikal ve enjeksiyon yöntemleri tercih edilebilir. Şekil 2’de fare, *Drosophila* ve *G. mellonella* deney modellerinin avantaj ve dezavantajları sunulmuştur.



**Şekil 3:** Fare, *Drosophila* ve *Galleria mellonella* modellerinin avantaj ve dezavantajları (8).



**Şekil 4:** Enfeksiyon açısından memeliler ve böcekler arasındaki benzerlikler (a) Enfeksiyon süresince patojenler salgıladıkları proteazlar ile böceklerde kütikül tabakasındaki, memelilerde epidermisteki protein komponentlerini parçalar. (b) Toksinler etkilerini, memelilerin veya böceklerin bağırsak mikrovilluslarındaki reseptörlere bağlanarak gösterir (c) Patojen mikroorganizmalar, memelilerde dolaşımdaki makrofajlar tarafından, böceklerde ise hemolenfte bulunan granüler hücreler tarafından fagosite edilir (40).

Ancak bu yöntemler içerisinde en güvenilir yöntem enjeksiyondur. Bu yöntemde inokulum doğrudan hemosel içine ince uçlu iğne ile verilir. Enjeksiyon için tercih edilen bölge genellikle son ön bacak olup dezavantajı travma ve kontaminasyondur. Enfeksiyon patogenezinin araştırıldığı çalışmalarda tercih edilen larva formu 6. evredir. Bu evrede larva 2-4 cm uzunluğunda olup yaklaşık 0.2-0.4 g ağırlığında beyaz renkli ve mat görünümündedir (53). *P. aeruginosa* enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında enjeksiyondan 24 saat sonra tüm larvaların öldüğü gözlenmiştir (33).

**Tablo 4:** *Galleria mellonella*'nın bazı yapısal özellikleri ve yaşam süreleri (53).

<i>G. mellonella</i>	Yumurta	Larva	Pupa	Ergin
Büyükklük	0.44x0.36mm	İlk evre; 1-3mm Son evre; 12-20mm (uzunluk) 5-7mm (çap)	12-20mm (uzunluk) 5-7mm (çap)	15mm uzunluk ve ortalama 31mm kanat açıklığına sahip
Morfolojik görünüm	50-150 yumurtalık kümeler halinde, Sferoid, elipsoid ya da ovoid şeklinde Pembe krem renkte	Krem beyaz renkte ve mat	Koyu sarı, kahverengi koza formasyonu	Soluk krem renkli
Yaşam süresi	Çevresel koşullara bağlı olarak 3-30 gün	29-32°C 6-7 hafta	Çevresel koşullara bağlı olarak 6-55 gün	Dişiler ~ 12 gün Erkekler ~21 gün

*G.mellonella* larvasının enfeksiyon modeli olarak kullanıldığı çalışmalarda mikrobiyal virulansın ortaya konulmasında larvada sağlık skorlamasından faydalanılabilir. Buna göre *G.mellonella* sağlık skorum indeksi tablo 3'te verilmiştir.

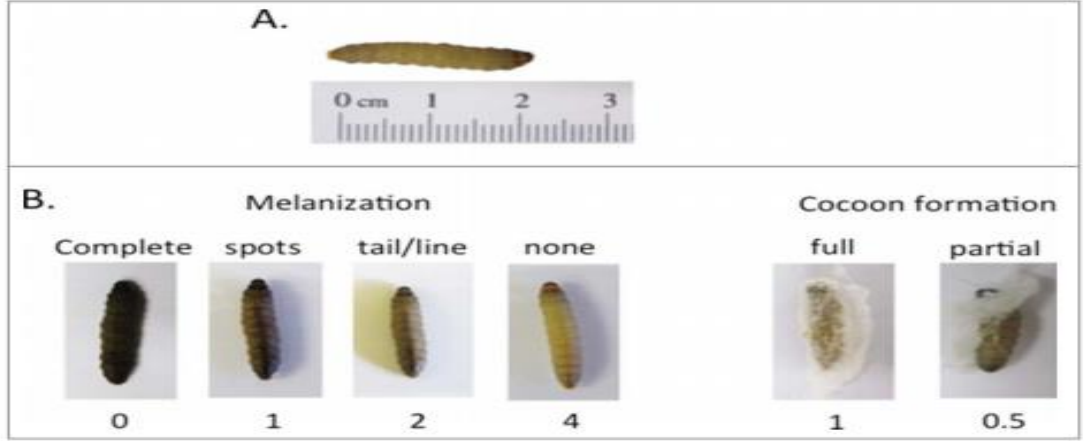
Virulans faktörlerinin araştırılmasında *G. mellonella* larvasının enfeksiyon modeli olarak kullanıldığı ilk makale 2007 yılında yayınlanmıştır. Yapılan bu çalışmada larvalara *E. faecalis* hemosel içerisine enjekte edilmiş ve larvalarda enjeksiyonu takiben 5 dk içerisinde yoğun melanizasyon ve 30 dk sonunda da ölüm görülmüştür (54). *P. aeruginosa* enjekte edilen *G. mellonella* larvalarında enjeksiyondan 24 saat sonra tüm larvaların öldüğü gözlenmiştir (48).

Enteropatojenik *E.coli* ile enfekte edilen *G. mellonella* larvaları ile yapılan ilk çalışma 2012 yılında yapılmıştır. Leuko ve Raivio yaptıkları bu çalışmada enteropatojenik *E. coli* (EPEC) nin enjekte edildiği larvalarda enjeksiyonu takiben 48 saat sonra larvaların ölüme neden olan LD50 dozunun  $2.57 \times 10^3$  CFU olduğunu bildirmişlerdir (55). Peleg ve ark. *A. baumannii* klinik izolatlarında virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmada *G. mellonella* enfeksiyon modelini kullanmışlardır. Referans suş olarak ATCC 17978 kullanmışlar ve  $3.5 \times 10^5$  CFU olarak larvalara enjekte etmişler ve 48 sat sonra larvaların %75'inin öldüğünü göstermişlerdir (56). Ülkemizde *G. mellonella*'nın enfeksiyon modeli olarak kullanımı ile yapılan çalışmalar kısıtlı olup gelecek vadedilmektedir. Kalkancı ve ark.

bazı bakteri ve mantarların virülansını araştırdıkları çalışmada in vivo model olarak *G. mellonella* larvasını kullanmışlardır. Oluşturulan larva enfeksiyon modelinde, enjeksiyonu takiben ilk 24 saatteki larva ölüm oranı mantarlarda %33 iken bakterilerde %100 olarak olmuş, bakterilerin virülansı mantarlardan daha yüksek bulunmuştur (57). *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülansının araştırıldığı bir çalışmada model olarak *G. mellonella* larvası kullanılmıştır. Bu çalışmada LB sıvibesiyerinde üretilen bakterilerden  $10^5$  cfu/ml kadarı larvalara enjekte edilerek 96 saat boyunca izlenmiştir.

**Tablo 5:** *G. mellonella* larvasının sağlık skorlama indeksi (9).

Kategori	Tanımlama	Skor
Larval hareketlilik	Hareket yok	0
	Uyarım varlığında minimal hareket	1
	Uyarım varlığında hareket	2
	Uyarım olmadan hareket	3
Koza formasyonu	Koza formasyonu yok	0
	Kısmi koza formasyonu var	0.5
	Tamamen koza formasyonu	1
Melanizasyon	Siyah larva	0
	Kahverengi larvada siyah nokta şeklinde odaklar	1
	Krem rengi larvada $\geq 3$ odak	2
	Krem rengi larvada $< 3$ odak	3
	Melanizasyon yok	4
Sağ kalım	Ölü	0
	Canlı	2



**Şekil 5:** *G. mellonella*'da; A. Sağlıklı larva, B. Melanizasyon, C. Koza formasyonu (50).

### ***G. mellonella*- *S. maltophilia* Enfeksiyon Modeli**

*Galleria mellonella* mikroorganizmaların neden oldukları enfeksiyonların patogenezinin belirlenmesinde ve bu mikroorganizmaların virulans faktörlerinin araştırılmasında sıklıkla tercih edilen mini modellerden birisidir. Yapılan literatür taramasında üç çalışmada *S. maltophilia in vivo* enfeksiyon modeli olarak *G. mellonella* kullanılmıştır (49).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. *Stenotrophomonas maltophilia* İzolatları**

Bu çalışmaya, 2018-2019 yılları arasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına rutin olarak gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 20 *S. maltophilia* izolatı dahil edildi.

#### **3.2. Mikroorganizmaların Tanımlanması**

Non-fermantatif, katalaz-pozitif, oksidaz-negatif ve Gram-negatif basil görünümünde olan bakteriler *Stenotrophomonas* ön tanısıyla ileri identifikasyon testlerine alındı. Tüm izolatlar ticari otomatize sistem MicroScan Walk Away Neg Combo Panel (Dade Behring, West Sacramento, USA) ile üretici talimatlarına göre çalışılarak tür düzeyinde tanımlandı.

#### **3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

Çalışmaya dahil edilen suşların antibiyotiklere duyarlılık durumları MicroScan Neg MIC Panel Type 44 (Dade Behring, West Sacramento, USA) kiti ile üretici talimatlarına göre çalışılarak belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testlerinde Kloramfenikol, Minosiklin, Levofloksasin (LEV), Seftazidim ve Trimetoprim sülfametaksazol (SXT) sonuçları sayısal MİK değerleri olarak alınarak kullanıldı. Sonuçlar hem CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) hem de EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda değerlendirildi. CLSI 'da duyarlı (S), dirençli (R) ve orta duyarlı (I) olarak yer almaktadır. EUCAST'de sadece SXT MİK sınır değerleri yer almakta olup Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir.

#### **3.4. Biyofilm Oluşturma**

Şuşların biyofilm oluşturma kapasiteleri, Stepanovic ve arkadaşları (58) ile Lusía C. S. Antunes ve ark. (59) kullandıkları mikropalak yöntemleri modifiye edilerek araştırıldı. Buna göre, %0.25 oranında glikoz içeren triptik soy broth (TSB)

(Sigma, Almanya) besiyerleri her tüpte 5ml olacak şekilde hazırlandı. Bakteri hücreleri TSB içerisinde OD (Optik dansite) 600 değeri 1.0 olacak şekilde süspanse edildi. Ardından 37 °C’de 14 saat inkübe edildi. Sonrasında kültürler 1/100 oranında dilüe edildi. Dilüe edilen kültürlerin her birinden 200 µl alınarak düz tabanlı mikropalak içerisine dağıtıldı. Her bir suş için 3 adet kuyucuğa dağıtım yapıldı. Negatif kontrol için ise 3 kuyucuğa sadece TSB koyuldu. Plağın kapağı kapatılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Bekleme süresinin ardından kuyucuk içleri pipetle aspire edildi. Ardından 250µl steril serum fizyolojik ile her kuyucuk 3 kez iyice çalkalayarak yıkandı. Yıkama ardından tüm kuyucuklara 200 µl %99’lik metanol (Sigma, Almanya) dağıtıldı. 15 dk sonunda kuyucuklar pipetle boşaltıldı ve plak ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. 200µl %2’lik kristal viyole (Hucker kristal viyole, Gram boyama için hazırlanmış) tüm kuyucuklara dağıtıldı ve 5 dk beklendi. Çeşme suyunun altında kuyucuklar yıkanarak plak ters çevrildi ve kurumaya bırakıldı. Tüm kuyucuklara 160µl %33’lük glacial asetik asit (Riedel de Haen, Almanya) dağıtıldı, 5-10 dk geçtikten sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşturma kapasiteleri negatif, zayıf, orta, güçlü olarak belirlendi.

Değerlendirmede kullanılacak sınır „cut-off“ (ODc) değeri negatif kontrol OD ölçüm değerinin üç standart sapma üzeri hesaplanarak elirlendi. Buna göre izolatların biyofilm oluşturmaları aşağıdaki hesaplama uygun olarak kategorize edildi.

$OD \leq ODc$	biyofilm oluşturmaz
$ODc \leq OD \leq 2 \times ODc$	zayıf biyofilm oluşumu
$2 \times ODc \leq OD \leq 4 \times ODc$	orta biyofilm oluşumu
$4 \times ODc < OD$	güçlü biyofilm oluşumu

### 3.5. Hareket Testi

Suşların hareket özelliği Eijkelkamp ve ark. (60) ile Luisa C. S. Antunes ve arkadaşlarının (59) kullandıkları metodlar modifiye edilerek belirlendi. Buna göre “twitching” (seğirme) hareketi için Mueller Hinton (Oxoid, İngiltere) besiyeri, “swarming” (yayılma) hareketi için Luria Bertani (Sigma, Almanya) besiyeri kullanıldı. Luria Bertani (%1.5 agar) besiyerinde üretilen bakterilerden steril öze ile birer koloni alınarak twitching hareketi için %1 oranında agar içeren Mueller Hinton besiyerine; swarming hareketi için %0.25 oranında agar içeren Luria Bertani

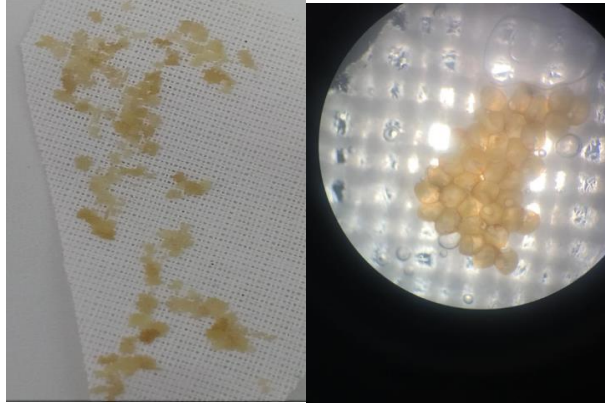
besiyerine besiyerinin dip kısmına doğru batırma şeklinde ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 48 saat inkübe edilerek 24. ve 48. saatlerde değerlendirme yapıldı. Twitching hareketini değerlendirmek için besiyerinin agar kısmı kaldırılarak petri plağı %0.1'lik kristal viyole boyası ile 30 dk boyunca boyandı ve boyanmış olan halo şeklindeki zon çapı değerlendirilerek >10 mm olanlar pozitif olarak değerlendirildi. Swarming hareketi için besiyeri yüzeyindeki hareket değerlendirildi. Zon çapı > 20 mm olanlar pozitif olarak belirlendi.

### **3.5.1. *Galleria mellonella* üretimi**

Bu çalışmada Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı tarafından üretilen *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. Larvalardan 0.2-0.4 g ağırlığında, 2-3 cm uzunluğunda ve krem rengi olanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

### **3.5.2. *Galleria mellonella* larvaları**

Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden temin edilen larvalar uygun şartlar altında ZBEÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi. Larvalar 28±2°C ve %65±5 bağıl neme sahip inkübatörde (Nüve, ES 500) yetiştirildi (61). *G. mellonella* larvalarının beslenmesinde sönmüş siyah petek kullanıldı. Petek temin edilememesi durumunda yapay besin hazırlanarak buzdolabında +4°C'de saklandı. Yapay besin hazırlanmasında 430g kepek, 100g öğütülmüş siyah petek (soğuk şoklanmış), 150ml gliserol, 75g çiçek balı, 75 ml distile su kullanıldı. Tüm karışım hazırlandıktan sonra 24 saat buzdolabında bekletildi ve hazırlanan besin saklandı (58). Besin hazırlandıktan sonra 20 kadar pupa ve parçalanmış siyah petek bir kavanoza alındı. Üzeri iki kat Amerikan bezi ile kapatıldı ve lastik ile sabitlendi. Ardından üzerine delik açılmış kavanoz kapağı kapatıldı. Petek azaldıkça besin takviyesi yapıldı ve kavanoz iki günde bir temizlendi. Çalışmamızda enjeksiyonun rahat yapılabilmesi için 7.evre larvalar (0.20-0.40 g, 2-3 cm) kullanıldı.



**Şekil 6:** a) *G.mellonella* yumurtası. b) *G.mellonella* yumurtalarının mikroskopik görünümü



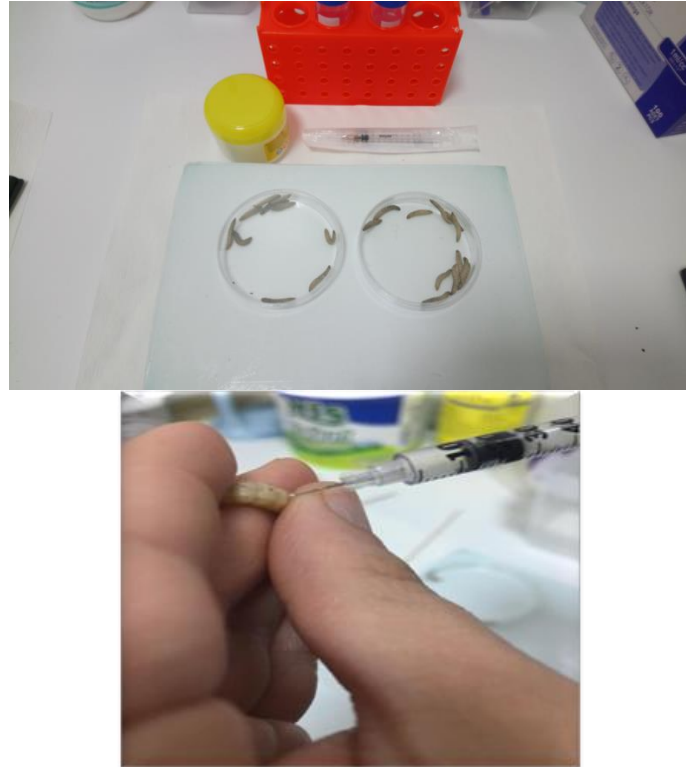
**Şekil 7:** a) Parçalanmış petek üzerine bırakılmış yumurtalar b) İnkübasyon.



**Şekil 8:** a) Erişkin larvalar b) Bakteri enjeksiyonu öncesi gruplandırılan larvalar.

### 3.5.3. Larvalara enjeksiyon yapılması

Tüm *S. maltophilia* izolatlarının Luria bertani agar plaklarındaki 24 saatlik kültürleri alındı. Her izolat için serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde  $10^8$  koloni oluşturan ünite (CFU)/mL konsantrasyonda inokulum olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından  $10\mu\text{L}$ 'si sondaki sol arka ayağının ön kısmına gelecek şekilde  $0.5\text{ ml}$ 'lik insülin enjektörü ile enjekte edildi. Enjeksiyon yapılırken larvaların hareket kabiliyetinin kısıtlanması için larvalar buz aküsü üzerine alındı. Her izolat için 10 larvaya enjeksiyon yapıldı. Ayrıca 10'ar adet larva ise herhangi bir enjeksiyon yapılmamış sağlıklı kontrol ve serum fizyolojik enjekte edilmiş SF kontrol deney grupları olarak belirlendi. Larvalar  $30^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 144. saate kadar izlendi ve ölen ve melanizasyon gösteren kahve renkli larvalar belirlenerek kaydedildi. Ayrıca kontrol suşu olarak; ATCC 13637 numaralı standart *S. maltophilia* suşundan serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde  $10^8$  koloni oluşturan ünite (CFU)/mL konsantrasyonda inokulum olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı 10 larvaya enjeksiyon yapıldı ve larvalar benzer şekilde izlendi.



**Şekil 9:** a) Larva enjeksiyonu öncesi hazırlık, b) Larva enjeksiyonu.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatların Genel Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen toplam 20 *S.maltophilia* izolatının klinik örneklerle göre dağılımına bakıldığında %55 ile en yüksek oranda kan örneği olduğu gözlemlendi. Bunu sırayla trakeal aspirat (%15), idrar (%15), endokater (%5), abse (%5) ve balgam (%5) örneklerinin takip ettiği görüldü.

### 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Profilleri

Çalışmaya dahil edilen suşların antibiyotik duyarlılık durumları Tablo 6'de verilmiştir.

**Tablo 6:** Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik duyarlılıkları.

	Tüm izolatlar (n=20)		
	S (n%)	I (n%)	R (n%)
CAZ	35 (7)	15 (3)	50 (10)
LEV	90 (18)	10 (2)	-
SXT	100 (20)	-	-
MIN	100 (20)	-	-
C	90 (18)	10 (2)	-

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli

### 4.3. *Galleria mellonella* Enfeksiyon Modeli

*G.mellonella* larvaları ile *S.maltophilia* izolatları kullanılarak oluşturulan enfeksiyon modelinde larvalar önce 12 saat sonrasında ise 24 saat aralıklarla 144 saat boyunca değerlendirildi. Her değerlendirme sonrasında ölü ve melanize larvalar ile canlı larvaların sayısı kaydedildi. Larvalara enjeksiyon sonrası ilk 12 saatte larvaların hareketinde yavaşlama görüldü ve melanize olan larvaların ortalama 24 saat sonra ölmeye başladığı saptandı. Kontrol grubu olarak ayrılan ve sadece serum fizyolojik enjekte edilen larvaların pupa oluşumu evresine geçmeye başladığı gözlemlendi. Enjeksiyonu takiben 12. saatte melanizasyon ve ölümlerin başladığı, ölüm oranının

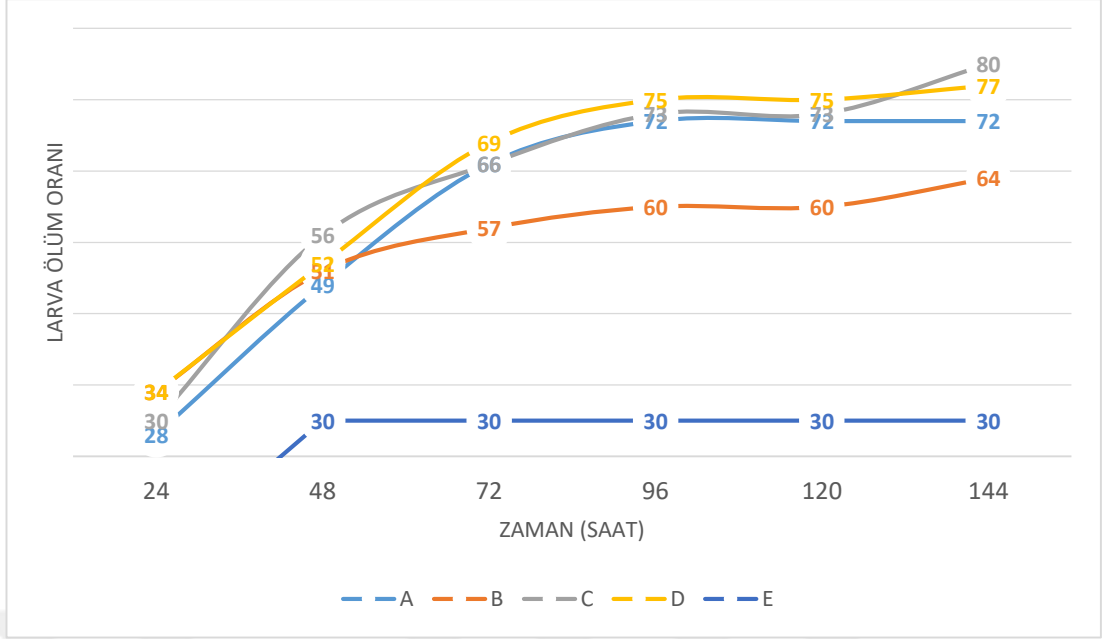
96. saatte sabitlendiği ve 144. saat sonunda sonucun değişmeden kaldığı gözlendi. İlk 24 saatte ortalama larva ölüm oranı %28.5 iken 144. saatte bu oranın %73'lere çıktığı tespit edildi. şekil 12'de; toplam tüm izolatlarda, CAZ duyarlı izolatlarda, CAZ orta duyarlı ve CAZ dirençli izolatlardaki larva ölüm oranlarıyla birlikte standart ATCC1367 *S.maltophilia* suşuna ait ölüm oranı gösterilmiştir.



**şekil 10:** Enfeksiyonun 144. saatinde tam melanize l larvalar.



**şekil 11:** a) Larvada kısmi pupa oluşumu b) Melanize l larva ve l larva.

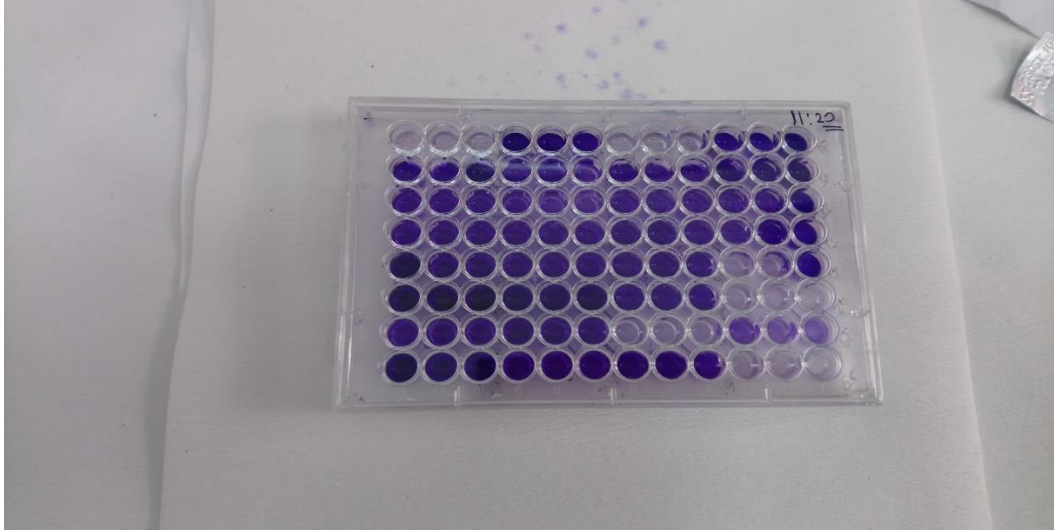


**Şekil 12:** A, Tüm izolatlarda larva ölüm oranı; B, CAZ duyarlı izolatlarda larva ölüm oranı; C, CAZ orta duyarlı larva ölüm oranı; D, CAZ dirençli izolatlarda larva ölüm oranı; E, Standart ATCC 13637 numaralı *S.maltophilia* suşu ile enfekte edilen larvalarda ölüm oranı.

#### 4.4. Biyofilm Oluşumu

Çalışmamıza dahil edilen 20 *S.maltophilia* izolatının iki tanesinin biyofilm oluşturmadığı, 18 tanesinin ise güçlü biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. Biyofilm oluşturmayan izolatlardan birinin balgam diğerinin ise trakeal aspirat örneği olduğu ve her iki izolatın da seftazidime dirençli olduğu belirlendi. Şekil 13'te değerlendirme öncesi polistren mikroplakta kuyucuklardaki farklı düzeylerde biyofilm oluşumu görülmektedir.





**Şekil 13:** Mikroplakta biyofilm oluşumunun gösterilmesi.

#### **4.5. Hareket**

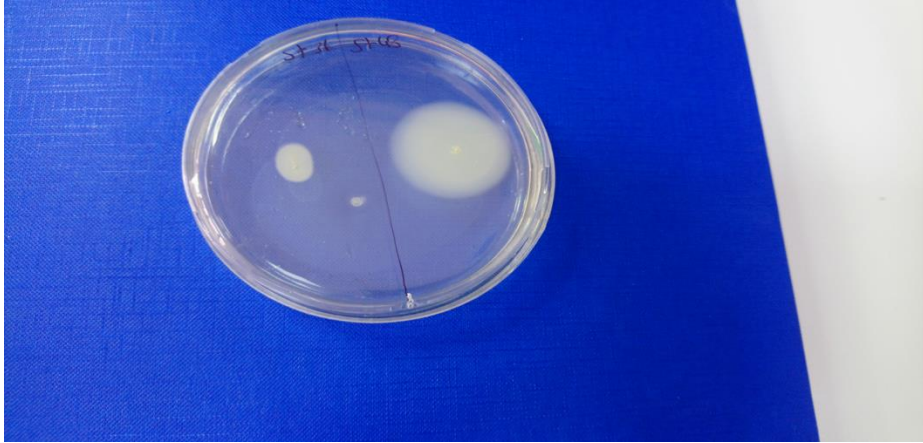
Çalışmaya dahil edilen toplam 20 izolatin dört tanesinde yayılma, bir tanesinde seğirme hareketi olduğu gözlemlendi. Yayılma hareketi pozitif olan izolatların seftazidime dirençli, seğirme hareketi pozitif olan tek izolatin ise seftazidime duyarlı oldukları gözlemlendi. Diğer antibiyotiklere duyarlılık oranı %90 ve üzeri olduğu için karşılaştırma yapılamadı.



**Şekil 14:** Seğirme hareketinin değerlendirilmesinde kullanılan %0.1'lik kristal viyole ile boyanmış besiyerleri.



**Şekil 15:** Seğirme hareketinin değerlendirilmesi için çap ölçümü.



**Şekil 16:** Yayılma hareketi oluşumu.

**Tablo 7:** İzolatların örnek tipi, Seftazidime duyarlılık durumu, biyofilm ve hareket virulans faktörlerine ait sonuçlar

VİRULANS FAKTÖRÜ					
İsolat no	Örnek Tipi	Seftazidime duyarlılık	Biyofilm oluşturma	Yayılma hareketi	Seğirme hareketi
1	Abse	Orta Duyarlı	Güçlü	-	-
2	Kan	Dirençli	Güçlü	+	-
3	Kan	Dirençli	Güçlü	-	-
4	Kan	Dirençli	Güçlü	-	-
5	Kan	Dirençli	Güçlü	-	-
6	Endokatater	Dirençli	Güçlü	+	-
7	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	-
8	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	-
9	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	+
10	Trakeal aspirat	Dirençli	Yok	-	-
11	Trakeal aspirat	Orta Duyarlı	Güçlü	-	-
12	İdrar	Dirençli	Güçlü	+	-
13	Kan	Dirençli	Güçlü	+	-
14	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	-
15	Trakeal aspirat	Duyarlı	Güçlü	-	-
16	İdrar	Orta Duyarlı	Güçlü	-	-
17	İdrar	Dirençli	Güçlü	-	-
18	Balgam	Dirençli	Yok	-	-
19	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	-
20	Kan	Duyarlı	Güçlü	-	-

## 5. TARTIŞMA

*S.maltophilia* birçok antibiyotiğe dirençli infeksiyon etkenlerinden biri olarak son on yılda artan sıklıkta ortaya çıkan bir patojendir. *S. maltophilia*'nın zaman içerisinde nozokomiyal etken olarak öneminin arttığı gözlenmektedir. Hastanelerde ve sıklıkla da Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) gittikçe artan oranlarda etken olarak izole edilmektedirler. Özellikle immün düşkün hastalarda önemli bir fırsatçı patojen özelliği göstermektedir (62).

Günümüze kadar *S. maltophilia* izolatlarıyla yapılan az sayıda çalışmaların çoğu antibiyotik direnci, tedavi protokolleri ve epidemiyolojik veriler üzerine odaklanmasına karşın bu bakterinin virülans faktörleriyle ilgili çalışmalar çok nadirdir (6). Türkiye'de konu ile ilgili yapılmış, virülans faktörlerinin araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. Bu konuda yurtdışında yapılmış çeşitli *in vitro* çalışmalar olmakla birlikte *in vivo* olarak yapılan çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Yaptığımız literatür taramasında sadece üç *in vivo* çalışmada *S.maltophilia* virülansı üzerine çalışılmış olduğu tespit edilmiştir (63). Ancak bu çalışmalarda çok sınırlı sayıda ve özellikle bakteriler çalışılmıştır. Bunlardan birisinde sadece kistik fibroz hasta izolatları yer almış olup diğerinde ise sadece iki adet *S.maltophilia* suşu üzerinde ilaç kombinasyonu etkileri araştırılmıştır (64). Bir diğerinde sadece bir adet sokak tipi *S maltophilia* suşu ve bu suşta belli bir gen bölgesi mutasyonu oluşturularak elde edilmiş suş kullanılmış olması virülans çalışmalarında *G. mellonella*'nın model olarak sunulması için önemli bir kısıtlılıktır (46). Ülkemizde ise *S.maltophilia* virülansı ile ilgili enfeksiyon modeli çalışması hiç bulunmamaktadır. Halen, bu mikroorganizmaya karşı daha etkili kontrol ve tedavi stratejileri geliştirebilmek için virülans faktörlerinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızda; çeşitlilik gösteren, farklı hasta, klinik durum ve örnek tiplerinden elde edilmiş klinik izolatlar kullanılarak, hem *in vitro* hem de deneysel modelde *in vivo* olarak virülans özellikleri araştırılmıştır.

*S. maltophilia* 'nın en sık izole edildiği örneklere bakıldığında solunum yolları, kan dolaşımı, yara ve üriner sistem örnekleri karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kistik fibrozlu hastaların solunum yollarından *P. aeruginosa*'dan sonra en sık izole edilen patojendir (58). Yapılan çalışmalarda *S. maltophilia* 'nın izole edildiği örnek türleri farklılık göstermektedir. Yurtiçi yapılan çalışmalara bakıldığında örneğin Öngüt ve ark.'nın (59) yaptığı bir çalışmada, *S. maltophilia* izolatları en sık trakeal

aspirat örneklerinden izole edilmiştir. Dülger ve ark.'nın (60) yaptığı çalışmada ise idrar örnekleri *S. maltophilia*'nın en sık izole edildiği örnek türü olmuştur. Jones ve ark. tarafından 1997-2001 yılları arasında yapılan geniş çaplı bir araştırmada, *S. maltophilia*'nın *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinden sonra en sık izole edilen üçüncü non-fermenter basıl olduğu görülmüş ve klinik örneklerden izolasyon oranı %8 olarak bulunmuştur (61) Bizim yaptığımız çalışmada ise *S. maltophilia* suşları büyük oranda kan örneklerinden %55 izole edilmiştir.

*S. maltophilia* geçirdiği sık mutasyonlar ile birçok antibiyotiğe doğal olarak direnç kazanabilir. Bu sebeple hastaneler ve özellikle yoğun bakım üniteleri gibi aşırı antibiyotik kullanılan ortamlarda önemli infeksiyonlara sebep olabilmektedirler (55) *S. maltophilia* karakteristik olarak çok ilaca dirençli (MDR) bir fenotip göstermekte olup beta-laktamaz, aminoglikozid asetiltransferaz, eritromisini inaktive eden enzimleri ve eflüks pompaları kodlayan genleri ile birçok antibiyotiğe intrinsek olarak dirençlidir. Tikarsilin-klavulanat *S. maltophilia* infeksiyonlarında en yaygın kullanılan beta-laktam antibiyotiktir. (62). Tedavide ilk seçenek olarak kullanılan SXT'ye karşı direnç oranları, çalışmalar arasında farklılık göstermekle birlikte, %10 civarındadır (65). Ülkemizde yapılmış çalışmalarda *S. maltophilia* suşlarında SXT'ye direnç oranları %0-20 arasında bildirilmiştir (66). Sadıç ve arkadaşları tarafından 2007-2017 yılları arasında yaptıkları çalışmada elde ettikleri *S. maltophilia* suşlarındaki ortalama direnç oranı %7.7 olarak bulunmuştur (67). TMP-SXT direnci ile ilgili yurt dışında yapılan çalışmalarda elde edilen oranlar farklılık göstermektedir. Örneğin İspanya'da yapılan bir çalışmada TMP-SXT direnci %26,2 olarak bildirilirken, Yunanistan'da yapılan bir çalışmada %15 olarak saptanırken Kanada'da ise direnç oranı %2 olarak saptanmıştır (68). Bizim yaptığımız araştırmada çalışmaya dahil edilen izolatların antibiyotik duyarlılık profiline bakıldığında; izolatların yarısının seftazidime %90'ının levofloksasin ve kloramfenikole, tüm izolatların ise trimetoprim sülfometaksazol ile minosikline duyarlı olduğu görülmüş olup literatür ile benzerdir.

Gelişen bakteriyel direnç sonrasında (tekli ya da çoklu) antibiyotiklerin patojenlere karşı etkilerinde azalmalar görülmektedir. *S. maltophilia*'da antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi farklı mekanizmalar yolu ile olmaktadır. Antibiyotik direnci kazanmış bakterilerin virülans özelliklerinde de azalma olduğu bildirilmektedir (69).

*S.maltophilia*'nın en önemli virülans faktörlerinden birisi biyofilm oluşturabilme özelliğidir. Özellikle flagella ve fimbrial adezinler biyofilm oluşumu ile ilişkilidir. Yapılan araştırmalar *S. maltophilia*'nın sentetik yüzeylere adere olabilmemesinin, özellikle immünsuprese hastalarda ve nozokomiyal enfeksiyonlarda fırsatçı patojen hale gelmesinde önemli olduğunu vurgulamaktadırlar (3). Biyofilm üreten *S. maltophilia* suşları fagositlere ve antibiyotiklere daha dirençli olurken aynı zamanda plastik yüzeylere tutunabilme yeteneği kazanırlar. Bunun sonucu olarak da solunum cihazları, kataterler ve protezler gibi tıbbi cihazlarda kolonize olarak enfeksiyonlara neden olabilirler (5). Yapılan araştırmalarda *S. Maltophilia* enfeksiyonlarında ölüm oranı % 23 ile% 77 arasında değişmektedir (70). Biyofilm içinde gömülü halde bulunan bakteriler planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında, antimikrobiyal maddelere karşı 10-1000 kat daha dayanıklı oldukları belirlenmiştir (71). Bizim çalışmamızdaki izolatların %90'ının güçlü biyofilm oluştuğu gözlenmiştir. Biyofilm oluşturmayan izolat sayısı çok az olduğu için örnek tipi ya da diğer virülans özelliklerini içeren etkili bir değerlendirme yapılması mümkün olmamıştır.

Araştırmamızda değerlendirilen bir diğer virülans faktörü bakteri hareketidir. Flajella bakteriyel motiliteden sorumlu olup aynı zamanda adezyonda da rol oynar. Flajella aracılı gerçekleşen biyofilm formasyonu bakterinin konak hücre savunma mekanizmasından korunmasını sağlamaktadır (33). Zgair ve Chhibber fareler üzerinde klinik *S. maltophilia* suşları ile yaptıkları çalışmada bakteriyel adezinlerin doğrudan trakeal epitel üzerindeki mukusa yapıştığını belirlemişlerdir. Bu adezyon ile birlikte bakterilerin solunum yolunda kümeleşerek mukus üzerinde biyofilm oluşturduklarını, biyofilm içindeki bakteriyel hücrelerin hareketlerinin engellendiğini ve böylece dolaylı olarak enfeksiyonun başlamasına katkıda bulunduğunu gözlemlemişlerdir (72). Yapılan başka bir çalışmada, kistik fibrozlu (KF) hastalar ile kistik fibroz olmayan hastalardan izole edilen *S. maltophilia* izolatları karşılaştırılmış ve biyofilm oluşumunda flajella aracılı motilitenin sadece KF'li hastalarda daha esansiyel olduğu belirlenmiş ve araştırmacılar tarafından bu suşlar "KF fenotipi" olarak adlandırılmıştır (35). Bu nedenlerle çalışmamızda *S.maltophilia*'da virülans faktörü olarak biyofilm oluşturma özelliği ve biyofilm oluşumu üzerinde etkili olan hareket özelliği birlikte değerlendirilmiştir.

Pompilio ve ark. (63) tarafından yapılan bir araştırmada on yıl boyunca kistik fibrozisli hastalardan izole edilen *S. maltophilia* suşlarının biyofilm oluşumu,

hareketlilik, antibiyotik direnci ve patojenite ile ilgili özellikleri karakterize edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada in vivo enfeksiyon modeli olarak *G. mellonella* modeli kullanılmıştır. Bu yönleriyle çalışmamıza benzerlik göstermekle birlikte, sadece özel bir hasta grubundan, kistik fibrozlu hastalardan izolatlar kullanılmıştır. İlgili çalışma sonuçları değişik klinik örnekleri içermediğinden, *S. maltophilia* suşlarının genel virülans özelliklerini temsil etmekten uzaktır. Çalışmamızda farklı kliniği olan hastalardan gelen kan, solunum yolu örnekleri, endokateter, abse ve idrar olmak üzere çeşitli örnek tiplerinden elde edilen izolatlar kullanılmıştır. Bu nedenle sonuçlarımız temsiliyet çeşitliliği avantajı ile daha değerlidir.

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılması, bu hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların virülans faktörlerinin belirlenmesi ve etkili tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasında in vivo modeller geçmişten beri tercih edilmektedir. Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında daha çok fare, kobay ve sıçan gibi memeli hayvanlar kullanılmaktadır. Ancak günümüzde memeli hayvanların kullanımını kısıtlayan bazı faktörler söz konusudur. Bu faktörler arasında memeli hayvan kullanımında yasal düzenlemelerin zorlaştırılması, hayvan kullanımına yönelik hassasiyet artışı sayılabilir (41). Ayrıca memeli modellerin kullanımı için gelişmiş laboratuvarlar, deneyimli teknik personel ve veteriner hekimlere ihtiyaç duyulmakta olup Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası zorunluluğu bulunmaktadır. Belirtilen kısıtlamalara bağlı olarak alternatif omurgasız hayvan modellerinin kullanımı gündeme gelmiştir (42). Son yıllarda Omurgasız model olarak *Caenorhabditis elegans*, sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* ile mum güvesi adı verilen *Galleria mellonella* larvası kullanılmaktadır. *G. mellonella* larvalarını diğer omurgasızlara göre ön plana çıkaran bazı özellikleri vardır. Bağışıklık sistemi memeliler ile benzerlik gösterir ve bu durum enfeksiyon sürecinin izlenmesinde avantaj sağlar. Bu larvalar oldukça hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir ve yetiştirilmeleri oldukça kolay olup maliyetleri düşüktür. Boyutları büyük olduğundan (~2-4 cm) enfeksiyon etkenleri ve çeşitli antimikrobiyal ajanların enjeksiyonuna olanak sağlar (43). Ayrıca 15-37°C'da yaşayabilme yeteneğinden dolayı özellikle insan sağlığını tehdit eden tıbbi öneme sahip birçok patojen mikroorganizmanın virülans faktörlerinin araştırılmasına olanak sağlar (44). Belirtilen avantajlar göz önüne alınarak çalışmamızda enfeksiyon modeli olarak *G. mellonella* seçilmiştir. Çalışmamız kapsamında *G. mellonella* üretimi başarı ile hayata geçirilmiş ve deneylerde laboratuvarımızda üretilen larvalar kullanılmıştır.

*G. mellonella* üretimi sırasında, etüvde yer alan inkübasyon kavanozları içinde bir kereye mahsus olmak üzere fungal kontaminasyon gelişmiştir. Önlem olarak hem etüvdeki kavanoz sayısı altıya düşürülerek azaltılmış hem de kavanoz başına düşen larva sayısı en fazla 50 ile sınırlandırılmıştır. Etkili temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri sonrasında tekrar etmemiştir. Temizlik işlemleri sırasında oda sıcaklığına bırakılan kavanozlardaki larvaların, beklenenden hızlı şekilde, henüz yeterli büyüklüğe ulaşmadan pupa formuna geçtikleri gözlenmiştir. Bu durumun sıcaklık ve ışık gibi çevresel stres faktörlerine bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür. Kontrollü çalışmalarla gözlemimizin desteklemesi gerektiği kararına varılmıştır.

Yapılan araştırmalar ile kandi yaptığımız çalışma arasında benzerlik olup olmadığına bakıldığında bakıldığında *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülansının araştırıldığı bir çalışmada model olarak *G. mellonella* larvası kullanılmış ve bu çalışmada LB sıvıbesiyerinde üretilen bakterilerden  $10^5$  cfu/ml kadarı larvalara enjekte edilerek 96 saat boyunca izlenmiştir. Minimum izlem süresi yönüyle bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir ancak deneylerimizde bu süre iki gün kadar daha uzatılmış, toplam 144 saat boyunca izlem yapılmıştır (73). Çalışmamızda yapılan ön deneyler sonucunda larvalar  $10^8$  cfu/ml bakteri ile enfekte edilmiş ve sonuç olarak  $10^8$  cfu/ml bakteri miktarının ve izlem süresinin deneysel model için uygun olduğu ancak minimal enfektif ile letal dozların belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda bakterilerin kullanıldığı ek çalışmalarla sonuçlarımızın desteklenmesi kararına varılmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen *in vivo* virülans özellikleri sonuçları ile deneysel modeldeki *in vivo* patojenite sonuçlarının karşılaştırılması hedeflenmiş olmakla birlikte izolatların biyofilm oluşturma oranı %90'lara çıkacak kadar yüksek olduğu için larvaların melanizasyon/ölüm oranlarıyla karşılaştırma yapılamamıştır. Benzer şekilde; izolatların tümü minosiklin ve SXT'ye duyarlı olarak bulunduğu için, seftazidim dışında duyarlılık durumu ile ilgili de karşılaştırma yapılamamıştır. Seğirme hareketi tek bir izolatta gözlenmiş olup karşılaştırma yapılamamıştır. Bunun yanında, yayılma tespit edilen izolatların larvaların mortalite hızları üzerinde bir fark göstermediği izlenmiştir.



## 6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda; çeşitlilik gösteren klinik *S. maltophilia* izolatları kullanılarak, hem *in vitro* hem de deneysel modelde *in vivo* olarak virülans özellikleri araştırılmıştır. Bu yönüyle literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır.
2. Çalışmada enfeksiyon modeli olarak seçilen *G. mellonella* larvaları laboratuvarımızda başarı ile üretilerek kullanılmıştır.
3. Larvalara yapılan bakteri enjeksiyonunu takiben 12. saatte melanizasyon ve ölümlerin başladığı, ölüm oranının 96. saatte sabitlendiği ve 144. saat sonunda sonucun değişmeden kaldığı gözlenmiştir. İlk 24 saatte ortalama larva ölüm oranının %28,5 olduğu 144. saatte bu oranın %73'lere çıktığı gözlenmiştir.
4. İzolatların elde edildikleri klinik örnekler göre dağılımının %55 ile en fazla kan olduğu, bunu sırasıyla trakeal aspirat, idrar, endokater ve balgam örneklerinin takip ettiği görülmüştür.
5. Antibiyotik duyarlılık profillerine bakıldığında; trimetoprim sülfometaksazol ile minosikline tüm izolatların duyarlı olduğu, seftazidime %50'sinin duyarlı, %15'inin orta duyarlı ve %35'inin ise dirençli olduğu; levofloksasin ve kloramfenikole ise %90'ının duyarlı ve %10'unun orta duyarlı olduğu görülmüştür.
6. İzolatların %90'ının güçlü biyofilm oluşturduğu ve %10'unun ise biyofilm oluşturmadığı görülmüştür.
7. İzolatların biyofilm oluşturma oranları yüksek olduğu için deney modelinde karşılaştırma yapılamamıştır.
8. Benzer şekilde seftazidim dışındaki antibiyotiklerin duyarlılık durumları ile ilgili de karşılaştırma yapılamamıştır. Seftazidime duyarlı olan izolatların ölüm oranı 144. Saatte %64,2 dirençli olanların %77, orta duyarlı olanların ise ölüm oranının %80 olduğu gözlenmiş olup aralarındaki farkın anlamlı olmadığı kanaatine varılmıştır.
9. Bakterilerin hareket yeteneğinin araştırılmasında izolatların dördünde (%20) yayılma hareketi, birinde ise seğirme hareketi gözlenmiştir. Yayılma hareketi larvaların mortalite hızları üzerine bir fark oluşturmamıştır.
10. *G. mellonella* larvalarının *S.maltophilia* virulans çalışmalarında deneysel enfeksiyon modeli olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):57–80.
2. Senol E. *Stenotrophomonas maltophilia*: The significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect.* 2004;57(1):1–7.
3. Snyderman DR. Attributable Mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia Author ( s ): Esin Senol , Jeffrey DesJardin , Paul C . Stark , Laurie Barefoot and David R . Snyderman Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4483179>. 2016;34(12):1653–6.
4. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, et al. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 2008;9(4).
5. Metan G, Hayran M, Hascelik G, Uzun O. Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. *Scand J Infect Dis.* 2006;38(6–7):527–31.
6. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):2–41.
7. Karaman M, Alvandiana A, Bahar İH. *Galleria mellonella* Larva Model in evaluating the effects of biofilm in *Candida albicans*. *Mikrobiyol Bul.* 2017;51(1):32–40.
8. Karaman M. The Rising Star of In-Vivo Infection Models: *Galleria mellonella* Larvae. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2016;46(1):1–7.
9. Loh JMS, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence.* 2013;4(5):419–28.

10. Wei WJ, Yang HF, Ye Y, Li J Bin. *Galleria mellonella* as a model system to assess the efficacy of antimicrobial agents against *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Chemother* [Internet]. 2017;29(4):252–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1120009X.2016.1156892>
11. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009;9(5):312–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0)
12. de Oliveira-Garcia D, Dall’Agnol M, Rosales M, Azzuz ACGS, Alcántara N, Martinez MB, et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol*. 2003;5(9):625–36.
13. Alonso A, Martinez JL. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia* antimicrobial agents *Chemother*. 2000;44(11):3079–86.
14. Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(3):356–61.
15. Cho BJ, Lee GJ, Ha SY, Seo YH, Tchah H. Co-infection of the human cornea with *stenotrophomonas maltophilia* and *Aspergillus fumigatus*. *Cornea*. 2002;21(6):628–31.
16. Hanes SD, Demirkan K, Tolley E, Boucher BA, Croce MA, Wood GC, et al. Risk Factors for late-onset nosocomial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in critically ill trauma patients . *Clin Infect Dis*. 2002;35(3):228–35.
17. Paez JIG, Costa SF. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect*. 2008;70(2):101–8.
18. Nyc O, Matejkova J. *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant contemporary hospital pathogen - review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010;55(3):286–94.

19. Dolinsky AL. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [Internet]. 27th ed. Journal of Services Marketing. 2017. Available from: <http://www.emeraldinsight.com/doi/10.1108/08876049410065598>
20. Kandemir I, Özcan N, Alanbayı Ü, Bozdağ H, Akpolat N, Gül K. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları antimicrobial susceptibilities Dicle Tıp Derg. 2016;43(2):237–40.
21. Zer Y, Karaoğlan İ, Çevik S, Erdem M. *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının İrdelenmesi. Klimik Derg. 2009;22(1):21–4.
22. Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, Gulati A. *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis of prosthetic aortic valve: Report of a case and review of literature. Hear Lung J Acute Crit Care. 2000;29(5):351–5.
23. Trifonova A, Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia*—a low-grade pathogen with numerous virulence factors. Infect Dis (Auckl) [Internet]. 2019;51(3):168–78. Available from: <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1531145>
24. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):2–41.
25. Bottone EJ, Reitano M, Janda JM, Troy K, Cuttner J. *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. J Clin Microbiol. 1986;24(6):995–7.
26. Sharma P, Gaur N. Commentary How do we tackle a child ' s spectacle ? Indian J Ophthalmol. 2018;66(5):651–2.
27. Thomas R, Hamat RA, Neela V. Extracellular enzyme profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates . Virulence. 2014;5(2):326–30.
28. Songer JG. 1-s2.0-S0966842X97010056-main. Trends Microbiol. 1997;5(1993):2320–4.
29. Figueirêdo PMS, Furumura MT, Santos AM, Sousa ACT, Kota DJ, Levy CE, et al. Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. Lett Appl Microbiol. 2006;43(4):443–9.

30. O' Brien M, Davis GHG. Enzymatic profile of *Pseudomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol*. 1982;16(3):417–21.
31. Travassos LH, Pinheiro MN, Coelho FS, Sampaio JLM, Merquior VLC, Marques EA. Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2004;96(5):1143–50.
32. Gunther K. Hyaluronidases — a group of neglected enzymes. *Protein Sci* [Internet]. 2018;4(9):1666–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.5560040902>
33. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002;99(10):7072–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997446><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC124530>
34. Kalidasan V, Azman A, Joseph N, Kumar S, Hamat RA, Neela VK. Putative iron acquisition systems in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*. 2018;23(8).
35. Manuscript A. On the Essentiality of. *curr Opin Microbiol*. 2014;16(6):779–85.
36. McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K. Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect Immun*. 2003;71(6):3068–75.
37. Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: Function and structure. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2000;290(1):27–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2).
38. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host Microbe*. 2009;5(6):580–92.
39. Berne C, Adrien D, Gail GH, Yves VB. Adhesins involved surfaces by gram negative bacteria. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4):1–45.
40. Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, Nicoletti M, Petrucca A, Guarnieri S, et al. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol*. 2010;10:1–15.

41. Temel A, Eraç B. Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2018;48(1):1–13.
42. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 2016;198(1):1–15.
43. Hänsch GM. Host Defence against Bacterial Biofilms: “Mission Impossible”? *ISRN Immunol.* 2012;2012:1–17.
44. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annu Rev Med.* 2008;59(1):415–28.
45. Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One.* 2014;9(10):1–8.
46. An S qi, Tang J liang. The Ax21 protein influences virulence and biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Arch Microbiol.* 2018;200(1):183–7.
47. Huedo P, Yero D, Martinez-Servat S, Ruyra À, Roher N, Daura X, et al. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol.* 2015;6(JUL):1–11.
48. AboZahra R. Quorum Sensing and Interspecies Interactions in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Br Microbiol Res J.* 2014;3(3):414–22.
49. Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV):1–18.
50. Vilcinskas A. Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. *Virulence* [Internet]. 2011;2(5):376–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.2.5.18289>
51. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: Recent studies and new perspectives. *Virulence.* 2012;3(6):1–4.

52. Alvandian A, Jawadi MH, Altıntaş ZN, Yıldız N, Karaman M. Using *Galleria mellonella* Larvae as the in Vivo Model in Investigating the Secretory Acid Proteinase Activity of *Candida albicans*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg.* 2017;(January).
53. Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J Apic Res* [Internet]. 2013;52(1):1–17. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3896/IBRA.1.52.1.10>
54. Liu W, Tian X, Wei J, Ding L, Qian W, Liu Z. BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. 2017;(January):1–15.
55. Leuko S, Raivio TL. Mutations That Impact the Enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx Envelope Stress Response Attenuate Virulence in *Galleria mellonella*. *Infect Immun.* 2012;80(9):3077–85.
56. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2605–9.
57. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, Altay A, Aliyeva Z, Bozdayı G, et al. Using *Galleria mellonella* as an In Vivo Model to Study the Virulence of Some Bacterial and Fungal Agents. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):366–76.
58. Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter - plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation rdjan Stepanovic , Dragana Vukovic , Ivana Dakic , Branislava Savic. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2000;40:175–9. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Branislava\\_Savic/publication/12615362\\_A\\_modified\\_microtiter-plate\\_test\\_for\\_quantification\\_of\\_staphylococcal\\_biofilm\\_formation/links/5666d85108ae4d38f7ac0067.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Branislava_Savic/publication/12615362_A_modified_microtiter-plate_test_for_quantification_of_staphylococcal_biofilm_formation/links/5666d85108ae4d38f7ac0067.pdf)
59. Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One.* 2011;6(8).
60. Eijkelkamp BA, Stroehler UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;323(1):44–51.

61. Hız P, Erdem M, Büyükgüzel E, Büyükgüzel K. The Effect of Gemifloxacin on Some Biological Traits of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Adults. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2016;22(5):777–84.
62. Kandemir Ö. Tedavi Yaklaşımı *Stenotrophomonas maltophilia*. 2007;7(1):151–7.
63. Pompilio A, Crocetta V, Ghosh D, Chakrabarti M, Gherardi G, Vitali LA, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* phenotypic and genotypic diversity during a 10-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Front Microbiol.* 2016;7(SEP).
64. Betts JW, Phee LM, Woodford N, Wareham DW. Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(9):1565–72.
65. Cho SY, Lee DG, Choi SM, Park C, Chun HS, Park YJ, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection in patients with hematologic malignancies: A retrospective study and in vitro activities of antimicrobial combinations. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):1–8.
66. Caylan R, Kaklikkaya N, Aydın K, Aydın F, Yılmaz G, Ozgumus B, et al. An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a University Hospital. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57(2):37–40.
67. Sadıç B, Başaran S, Şimşek-Yavuz S, Çağatay A, Özsüt H, Eraksoy H. *Stenotrophomonas maltophilia*: Results of antimicrobial susceptibility testing and in vitro activity of the combination of ceftazidime and moxifloxacin. *Klinik Derg.* 2019;32(1):29–34.
68. Çaycı YT, Karadağ A, Hava Y, Keramettin Y. *Stenotrophomonas maltophilia* klinik suşlarında antimikrobiyal direnç . 2013;43(1):22–5.
69. Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, et al. Comparative analysis of acinetobacters: Three genomes for three lifestyles. *PLoS One.* 2008;3(3).



70. Safdar A, Rolston K V. *Stenotrophomonas maltophilia*: Changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. *Rev Chil Infectol.* 2008;25(3):224.
71. Liu W, Tian XQ, Wei JW, Ding LL, Qian W, Liu Z, et al. BsmR degrades c-di-GMP to modulate biofilm formation of nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–15.
72. Zgair AK, Chhibber S. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J Med Microbiol.* 2011;60(7):1032–7.
73. Filloux A, Ramos JL. Preface. *Pseudomonas methods and protocols. Methods Mol Biol.* 2014;1149:v.

## 8. EKLER

### EK 1: Etik Kurul Kararı



**T.C.**  
**BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ**  
**Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı**

**TOPLANTI TARİHİ** : 14/03/2018  
**TOPLANTI NO** : 2018/06

#### KARARLAR :

- 9- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2018-70-28/02 Protokol no'lu "*Galleria mellonella* Modeli Kullanılarak *Stenotrophomonas maltophilia* Klinik İzolatlarında Virulans Faktörlerinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

**Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ**  
**B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı**

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Kırşehir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul Küçükçekmece ilçesinde tamamladıktan sonra lisans öğrenimini 2006-2011 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Hekimliği bölümünde yaptı. 2011 yılında OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı ve 2017 yılında doktora eğitimini tamamladı. 2013 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında Veteriner hekim olarak altı ay çalıştı. Aynı yıl Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Gökçebey MMÇ MYO’na öğretim görevlisi olarak atandı. 2015 yılında ZBEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. ZBEÜ Ahmet Erdoğan SHMYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Tıbbi Laboratuvar Teknikleri programında Dr. Öğr. Üyesi olarak çalışmakta ve buradaki görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

### **ADRES BİLGİLERİ**

**Adres:** Dr.Halim Tanyeri caddesi. Nastaş sitesi A/blok k:4 d:3  
Kozlu/ZONGULDAK

**Tel:** (+90) 5468734224

**E-posta:** aydan.atalar@beun.edu.tr