

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

HASTANE KÖKENLİ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* SUŞLARINDA
PROGNOZLA İLİŞKİLİ GENETİK KARAKTERLERİN İRDELENMESİ

Funda Doğruman Al

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Serdar Diker

Eylül

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Funda Doğruman Al

ONAY

Prof. Dr. Serdar Diker danışmanlığında Funda Doğruman Al tarafından hazırlanan bu çalışma 07/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. K.Serdar DİKER

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Müge DEMİRBİLEK EKİCİ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Z.Ceren KARAHAN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Hastane kökenli *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında prognozla ilişkili genetik karakterlerin irdelenmesi

Funda Doğruman Al

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Serdar Diker

Stenotrophomonas maltophilia doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte insanlar için önemi gittikçe artan fırsatçı bir patojendir. Bu çalışmada 17 insan ve 14 hayvan kökenli çok ilaca dirençli *S. maltophilia* suşunda sülfonamid ve kinolonlara direnç, biyofilm ve virulans genleri araştırılmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan antibiyotik duyarlılık testinde tüm suşların sülfonamide duyarlı, aminoglikozidlere, pensilin türevlerine, sefalosporinlere, karbapenemlere, tetrasikline, monobaktamlara dirençli olduğu saptanmıştır. Suşlarda %9,7 levofloksasin, %54,8 tikarsilin-klavulonik asit, %77,4 seftazidim direnci belirlenmiştir. Kinolon direnciyle ilişkili olan *qnr1-2* geni suşların tümünde, *qnr3-4* geni ise %80,6'sında, sülfonamid direnciyle ilişkili olan *sul1* geni ise suşların %12,9'unda, *sul2* geni ise %9,7'sinde bulunmuştur. Biyofilm ile ilişkili *xanB* geni suşların %25,8'inde saptanmış olup, biyofilm plak deneyinde insan suşlarının optik dansiteleri hayvan suşlarından daha yüksek tespit edilmiştir. Virulansla ilişkili genlerden *smf-1* suşların %87,1'inde, *stmpr1* %61,3'ünde, *orf9* ise %25,8'inde saptanmıştır. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen dört suşun ikisinde DNA dizi analizi ile aminoasit değişikliğine neden olan mutasyon belirlenmiştir. Fenotipik olarak duyarlı olan suşların, bu özelliklerinin genotipe tam olarak yansımadağı gözlenmiş, hastalık patogeneğinde bakteriye bağılı birçok faktörün birarada rol alması nedeniyle fenotipik ve genotipik özelliklerin birlikte değerlendirilmesinin tedavi başarısı için önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Stenotrophomonas maltophilia*, enfeksiyon, antibiyotik duyarlılık testi, antibiyotik direnç genleri, biyofilm, virulans

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of the prognostic genetic characteristics of the hospital-acquired

Stenotrophomonas maltophilia strains

Funda Doğruman Al

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Serdar Diker

Stenotrophomonas maltophilia which is widely distributed in natural environments increasingly becomes an important opportunistic agent in humans. The present study investigated sulfonamide and quinolone resistance, biofilm production, and virulence genes in multi-drug resistant *S. maltophilia* strains isolated from 17 human and 14 animals. Antibiotic susceptibility testing using microdilution method showed that all strains were susceptible to sulfonamide and resistant to aminoglycosides, penicillin derivatives, cephalosporins, carbapenem, tetracycline, and monobactam antibiotics. The rate of resistance to levofloxacin, ticarcillin-clavulanic acid, and ceftazidime was 9.7%, 54.8%, and 77.4%, respectively. The *qnr1-2* gene responsible for quinolone resistance was positive in all strains, *qnr3-4* was positive in 80.6% of the strains, *sul1* gene responsible for sulfonamide resistance was positive in 12.9% of the strains, and *sul2* was positive in 9.7% of the strains. Of the strains, 25.8% were found to be positive for the *xanB* gene associated with the biofilm production, and optic density in the biofilm plaque test was higher in human strains compared to the animal strains. Among genes responsible for virulence, *smf-1* was positive in 87.1% of the strains, *stmpr1* was positive in 61.3% of the strains, and *orf9* was positive in 25.8% of the strains. In the DNA sequence analysis, two out of four strains isolated from the intensive care units tested positive for a mutation responsible for amino acid substitution. We observed that the phenotype of sensitive strains was not reflected directly to the genotype of the strains, and, therefore, we concluded that both phenotypic and genotypic characteristics should be taken into consideration for treatment success considering that multiple factors relevant to the bacteria play a common role in the disease pathogenesis.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*, infection, antibiotic susceptibility test, antibiotic resistance gene, biofilm, virulence

TESEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, sürekli desteğini hissettiğim değerli danışmanım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD. Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. K.Serdar DİKER'e, tez savunma jüri üyeleri olarak çok yararlı önerileri ve katkıları nedeniyle Sayın Prof.Dr. K.Serdar DİKER, Sayın Prof.Dr. Aykut ÖZKUL, Sayın Prof.Dr. Kayhan ÇAĞLAR, Sayın Prof.Dr. Z.Ceren KARAHAN, Sayın Prof.Dr. Müge DEMİRBİLEK EKİNCİ'ye, laboratuvar çalışmalarımındaki destekleri için Yrd.Doç.Dr. Kağan Müştak, Bio.Ali Hussein M. AFANDI ve Bio.Yörük DİVANOĞLU'na, ilgi ve yardımlarından dolayı Biyoteknoloji Enstitüsü Öğrenci İşleri Biriminden Sayın Asuman ERZİNCAN'a, her zaman yanımda olan tüm aile bireylerime ve Sevgili Eşim'e şükranlarımı sunuyorum.

Sevgi ve Huzurla...

Funda DOĞRUMAN AL

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------------|
| ETİK BEYAN | i |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR | |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| SİMGELER DİZİNİ | ixi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER | 3 |
| 2.1. STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA’NIN GENEL ÖZELLİKLERİ | 3 |
| 2.2. STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA ENFEKSİYONLARI VE RİSK FAKTÖRLERİ | 7 |
| 2.2.1 STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA PREVALANSI VE ENFEKSİYON SÜRVEYANS ÇALIŞMALARI | 9 |
| 2.2.1.1 Ülkemizdeki Stenotrophomonas maltophilia Enfeksiyonlarında Durum | 10 |
| 2.3. STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA VİRULANSINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1. ANTİBİYOTİK DİRENCİ..... | 12 |
| 2.3.2. BİYOFİLM..... | 18 |
| 2.3.2.1 Biyofilm yapısı ve oluşumu..... | 18 |
| 2.3.2.2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ’da biyofilm etkisi..... | 21 |
| 2.3.3. VİRULANS GENLERİ..... | 22 |
| 2.3.4. GELECEK İÇİN YENİ YAKLAŞIMLAR..... | 23 |
| <u>3. GEREKÇE ve AMAC.....</u> | 24 |
| <u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u> | 25 |
| 4.1. MATERYAL | 25 |
| 4.1.1. STANDART SUŞ..... | 25 |
| 4.1.2. <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i> ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI..... | 25 |
| 4.1.3. BESİYERLERİ ve KİMYASALLAR..... | 25 |
| 4.1.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ..... | 25 |
| 4.1.5. MOLEKÜLER TANI..... | 26 |
| 4.2. YÖNTEM..... | 28 |
| 4.2.1. SUŞLARIN İDENTİFİKASYONU..... | 28 |
| 4.2.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ..... | 29 |
| 4.2.3. BİYOFİLM MODELİNİN OLUŞTURULMASI..... | 29 |
| 4.2.4. DNA İZOLASYONU..... | 30 |
| 4.2.5. PROGNOZLA İLİŞKİLİ GENETİK KARAKTERLERİN PZR İLE ARAŞTIRILMASI..... | 31 |

| | |
|--|------------------|
| 4.2.5.1 Agaroz jel elektroforezi..... | 32 |
| <u>4.2.6.DNA DİZİ ANALİZİ.....</u> | <u>32</u> |
| 4.2.6.1. DNA dizi analizi için PZR..... | 33 |
| 4.2.6.2. PZR ürünlerinin ön saflaştırılması..... | 33 |
| 4.2.6.3. <i>qnr1-2</i> gen DNA dizi analizi..... | 33 |
| <u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u> | <u>35</u> |
| 5.1.ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI..... | 35 |
| 5.2. SÜLFONAMİD VE KİNOLONLARLA İLGİLİ DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI..... | 36 |
| 5.3. BİYOFİLM..... | 38 |
| 5.4. VİRÜLANS GENLERİ..... | 40 |
| 5.5. DNA DİZİ ANALİZİ..... | 43 |
| 6. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 48 |
| 6.1. TARTIŞMA..... | 48 |
| 6.2. SONUÇ..... | 54 |
| <u>7. KAYNAKLAR.....</u> | <u>60</u> |
| <u>8. EKLER.....</u> | <u>65</u> |
| <u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u> | <u>67</u> |
| <u>210. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u> | <u>68</u> |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil:2.3.2.1. Biyofilm oluşumunun aşamaları..... | 19 |
| Şekil 5.2.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında saptanan <i>qnr1-2</i> geninin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü..... | 36 |
| Şekil 5.2.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında saptanan <i>qnr3-4</i> genlerinin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü..... | 37 |
| Şekil 5.2.3. TMP-SMZ (<i>sul1</i> ve <i>sul2</i>) ve kinolon (<i>qnr1-2</i> ve <i>qnr3-4</i>) direnciyle ilişkili genlerin dağılımı..... | 37 |
| Şekil 5.2.4. İnsan ve hayvan suşlarında TMP-SMZ ve kinolon direnciyle ilişkili genlerin dağılımı..... | 37 |
| Şekil:5.3.1. Biyofilmle ilişkili <i>xanB</i> geninin insan ve hayvan suşlarındaki dağılımı..... | 38 |
| Şekil 5.3.2. Biyofilm deneyinde insan ve hayvan suşlarının spektrofotometrik olarak saptanan OD ve SEM değerlerinin karşılaştırılması..... | 40 |
| Şekil 5.4.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında saptanan <i>smf-1</i> geninin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü | 41 |
| Şekil 5.4.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında virulansla ilişkili genlerin dağılımı..... | 42 |
| Şekil 5.4.3. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında saptanan <i>orf9</i> geninin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü | 42 |
| Şekil 5.4.4. İnsan ve hayvan <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında virulansla ilişkili genlerin dağılımı | 43 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın üreme özellikleri (1)..... | 6 |
| Çizelge 2.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> enfeksiyonu için risk faktörleri (22) | 8 |
| Çizelge 2.3.1.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın antibiyotik direnç mekanizmaları (6, 22) | 17 |
| Çizelge 2.3.1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın antibiyotik direnç genleri ve direnç profilleri(6, 22)..... | 17 |
| Çizelge 4.1.5. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın moleküler karakterizasyonunda kullanılan genler ve dizileri..... | 27 |
| Çizelge 4.2.5.1. DNA amplifikasyonu için kullanılan termal döngü cihazı programı..... | 31 |
| Çizelge 5.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarının antibiyotik direnç dağılımı..... | 35 |
| Çizelge 5.3.1. Biyofilm deneyinde insan ve hayvan suşlarının spektrofotometrik olarak saptanan OD ve SEM değerleri..... | 38 |
| Çizelge 5.3.2. Biyofilmden sorumlu olan <i>xanB</i> geninin suşlardaki varlığı..... | 39 |
| Çizelge 5.4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> suşlarında saptanan virulans genlerinin dağılımı..... | 41 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|--------|--|
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| ABC | ATP-binding cassette |
| AGA | Aminoglikozid |
| Bp | Baz çifti |
| CIP | Siprofloksasin |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| ÇİD | Çok ilaca dirençli |
| DD | Disk difüzyon |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| dk | Dakika |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| LEV | Levofloksasin |
| M | Marker |
| KMD | Kalitatif Mikrodilüsyon |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| OD | Optik dansite |
| ONPG | O-nitrofenil-B-D-galaktopiranozid |
| PBS | Phosphat buffered saline |
| PZR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RND | Resistance nodulation cell division |
| SEM | Standart error mean |
| sn | Saniye |

TBE

Tris-Borik asit-EDTA

TMP-SMZ

Trimetoprim-sulfametoksazol

YBÜ

Yoğun Bakım Ünitesi



1. GİRİŞ

Stenotrophomonas maltophilia (*S.maltophilia*,) aerop, nonfermentatif, Gram negatif bir bakteridir (1, 2). Sağlıklı insanlar için patojen olmayan *S.maltophilia* en çok rastlanan patojenler arasındadır. Travma sonrası deride gelişen enfeksiyonlarda en sık izole edilen türdür. İnsanlarda görülen enfeksiyonların sıklığında son yıllarda artış görülmektedir. Solunum cihazına bağlı yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda, immün yetmezlikli olgularda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir nozokomiyal patojendir (1).

İlk kez 1943 yılında plevral sıvıdan izole edilen *S. maltophilia*, *Bacterium booker* daha sonra da *Pseudomonas maltophilia* olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra tekrar sınıflandırılarak önce *Xanthomonas maltophilia* son olarak da 1993 yılında *Stenotrophomonas maltophilia* şeklinde isimlendirilmiştir (3). *Stenotrophomonas* türleri arasında insan için fırsatçı patojen olan *Stenotrophomonas maltophilia* doğada yaygın olarak bulunmaktadır (4)

Stenotrophomonas maltophilia beta-laktamaz, aminoglikozid asetiltransferaz ve eritromisini inaktive eden enzimleri ve efluks pompaları kodlayan genleri nedeni ile birçok antibiyotiğe intrinsek olarak dirençlidir (5). Direncin aynı zamanda, zamanla mutasyon gelişmesi veya horizontal gen transferleri ile kazanılabileceği ileri sürülmektedir. Diğer bilinmeyen mekanizmaların da direnç gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmektedir (6). Kazanılmış direnç ise integron, transpozon ve plazmidlerle olmaktadır (5)

Stenotrophomonas maltophilia'nın tüm genomunun karşılaştırmalı ve fonksiyonel analizinde yoğun olarak ilaç direnç bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir (7). Gram negatiflerde ÇİD'in genellikle direnç nodulasyon bölümü (RND) efluks pompasının aşırı ifadenmesiyle ortaya çıktığı gösterilmiştir.

Stenotrophomonas maltophilia suşlarının antibiyotiklere direnç profillerinin yanısıra biyofilm yapma özelliklerinin de enfekte hastalarda prognozu belirleyen önemli bir kriter olduğu belirtilmiştir. Hücrelere adezyonda *S. maltophilia* fimbria 1 (*smf-1*) proteininin önemli rol oynadığı belirlenmiştir (8).

Çok ilaca dirençli olan suşların olmayanlara göre daha fazla oranda biyofilm yaptıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda biyofilm oluşturan suşların seftazidim, sefepim, tikarsilin-klavulonik asit, piperasilin-tazobaktam, aztreonam ve gentamisin antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir (9)

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonlarının prognozunda ÇİD suşların tedavisinde büyük zorluk yaşanmasının yanısıra bu suşların prognozu etkileyen ve virülansında önemli rol oynayan birtakım proteinleri ifadeleyen genleri barındırması söz konusudur. Örneğin biyofilm yapısının oluşmasında *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* ve *xanB* genleri önemli rol oynamaktadır (10). Biyofilm moleküler mekanizmasının araştırıldığı diğer bir çalışmada fosfoglikomutaz ve fosfomannomutaz aktivitesini ifadeleyen *spgM* geninin biyofilm oluşumunda önemli olduğuna dikkat çekilmiştir (11).

Bununla birlikte lipaz, fibrolizin ve proteaz gibi hücre dışı enzimlerinin fazlalığı, kolonizasyon, adezyon ve epitel hücrelerinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır (12). *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarında bakteriyostatik etkili TMP-SMZ tercih edilen tedavi seçeneğidir. SENTRY anitmikrobiyal süveyans programı 2004 yılında TMP-SMZ direncinin %3.8 olduğunu rapor etmiştir (13). Bununla birlikte artan direnç bildirimleri klinisyenleri alternatif tedavi seçeneklerine yöneltmiştir (14, 15). Bu durum kombine antibiyotik tedavi seçeneklerinin yaygınlaşmasına neden olmuştur (1).

2. KURAMSAL TEMELLER

Sağlıklı insanlar için patojen olmayan *Stenotrophomonas maltophilia* (*S.maltophilia*), en sık rastlanan fırsatçı insan patojenidir. Yoğun bakım ünitelerinde solunum cihazına bağlı hastalarda, immün sistemi baskılanmışlarda, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir nozokomiyal patojendir. Son yıllarda insan enfeksiyonlarındaki sıklıklarında artış gözlenmiştir. Nozokomiyal bir etken olarak virulansında ÇİD bir özellik göstermesi, biyofilm oluşturabilmesi ve birtakım virulans genlerinin ifadenmesiyle oluşan proteinlerin büyük önemi vardır.

2.1. STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Stenotrophomonas maltophilia ilk kez 1943 yılında *Bacterium bookeri* olarak izole edilmiş ve daha sonra *Pseudomonas maltophilia* ismini almıştır. rRNA analizi sonrasında ise *Xanthomonas maltophilia* adının daha uygun bulunarak bu isimle anılmıştır. DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları, dizileme yöntemleri sonrasında sınıflandırma ve isimlendirme son halini alarak bakteri 1993 yılında *S. maltophilia* olarak adlandırılmıştır (1, 3). *Stenotrophomonas maltophilia*; Bacteria aleminde, Protobacteria şubesinde, Gammaprotobacteria sınıfında, Xanthomonadales takımında, Xanthomonadaceae ailesinde ve *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır (3).

Stenotrophomonas cinsi içerisinde bulunan *S. maltophilia* türünün yanısıra *S. acidaminiphila*, *S. africana*, *S. chelatiphaga*, *S. daejeonensis*, *S. dokdonensis*, *S. ginsengisoli*, *S. humi*, *S. koreensis*, *S. nitritireducens*, *S. pavanii*, *S. rhizophila*, *S. terrae* türleri de bulunmaktadır (1).

Bu cinsin üyesi olan *S. rhizophila* filogenetik ve ekolojik olarak *S. maltophilia* ile yakın benzerlik göstermektedir. Biyoteknolojik araştırmalar için kullanımı gündeme gelmiştir. *Stenotrophomonas rhizophila* bir bitki kompetan işlevi için model bir bakteri olarak kabul edilmekte ve endofitik yaşam döngüsüyle tuza toleran bitki yetişmesini sağlayan bir özellik taşımaktadır. (16)

Stenotrophomonas maltophilia ve *S. rhizophila* arasındaki farklar karşılaştırmalı genomik ile analiz edilmiştir. Konak invazyonu ve antibiyotik direnci konusunda önemli bir benzerlik görülmesine rağmen, bazı virülans faktörleri, ısı şok proteinleri plant ilişkili *S. rhizophila* DSM 14405 suşunda tespit edilmemiştir. Bu kökenin bitki koruyucu spermidin, bitki hücre duvarını parçalayıcı enzimler ve yüksek tuz toleransı için genler taşıdığı belirlenmiştir. Bu veriler ışığında *S. rhizophila* 37⁰ C’de üremediği için insan sağlığı için risk taşımayan biyoteknolojik uygulamalara olanak taşıyan bir araç olarak kabul edilmektedir (16)

Stenotrophomonas maltophilia aerop, nonfermentatif, Gram negatif bir bakteri olup hastanede, özellikle de YBÜ’lerinde yatan hastalarda ciddi hastane infeksiyonlarına yol açan fırsatçı bir patojendir. *Stenotrophomonas maltophilia* türleri, oksidaz negatiftir, glikoz ve maloz oksidasyonları değişken, DNaz pozitif, lizin dekarboksilaz pozitif ve hareketlidirler. *Stenotrophomonas maltophilia* türlerinin hücre dışı DNaz aktivitesinin saptanması ile glikozu okside eden diğer Gram negatif bakterilerden ayrılırlar. Metil yeşili indikatörü ile tüpte ya da DNaz agar üzerinde DNaz aktiviteleri saptanabilir. DNaz pozitif olanlar besiyeri üzerinde şeffaf bir zon oluşturur (1).

Koyun kanlı agar da amonyak gibi kokan lavanta yeşili pigmentli ve S tipi koloniler yaparlar. *Stenotrophomonas maltophilia* karakteristik bir hücresel yağ asidi profiline sahiptirler (1, 6). *Stenotrophomonas maltophilia*’nın biyokimyasal özellikleri çizelgede sunulmuştur. (Çizelge 2.1)

Özellikle nemli ortamlarda yaşamını sürdürmesi nedeniyle su drenajı yapılan yerler, nebülizatörler, endoskoplar, hemodializ üniteleri, bitki yetiştirilen ortamlar, su toplama üniteleri, duş başlıkları gibi yaygın olarak ve çok farklı ortamlardan izole edilebilmektedir. *Stenotrophomonas maltophilia*’nın en önemli özelliği biyolojik biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm yapabilme özelliğidir. Bu özellik bakterinin antibiyotik etkisinden uzaklaşmasını sağlamaktadır (1).

Dünya Sağlık Örgütü *S. maltophilia*’nın hastane ortamında ÇİD organizmalar arasında ilk sırada geldiğini belirtmiştir. *S. maltophilia* enfeksiyonlarının büyük kısmı solunum ve dolaşım sistemi enfeksiyonları olarak ortaya çıkmaktadır. Daha az sıklıkla kemik ve eklem, safra yolları, üriner sistem, göz, kalp ve meninklerde tutulum olmaktadır (6,14).

Organ ve dokularda tıkanıklığa neden olabilecek yapısal anomaliler, örneğin hepatobilier neoplazilere bağlı ortaya çıkan obstrüksiyon veya gastrointestinal sistemde ameliyat sonrası oluşan anostomoz kaynaklı yapılar biliyer *S. maltophilia* sepsislerinin ortaya çıkmasına zemin oluşturabilmektedir (1,6).

Tüp torakostomi veya fistül gelişiminin neden olduğu plevral enfeksiyonlar, komplikasyonlu üriner sistem enfeksiyonları, obstrüktif akciğer kanseri gibi klinik durumlar *S. maltophilia* enfeksiyonunun gelişimi için uygun zemin oluşturmaktadır (8).



Çizelge: 2.1. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın üreme özellikleri (1)

| Özellik | Reaksiyon |
|---|-----------|
| Düz veya kıvrık çomaklar, 0,5x1,5µm | |
| Oksidaz | - |
| Katalaz | + |
| Üreme için methionin gereksinimi | + |
| En uygun üreme ısı 35°C 4°C veya 41°C de üreme görülmez | |
| 2-8°C canlılık | + |
| Hareket | + |
| Nitrat redüksiyonu, (nitratı nitrojen kaynağı olarak kullanmaz) | + |
| İndol | - |
| Lizin dekarboksilaz | + |
| Ornitin dekarboksilaz | - |
| Metil kırmızısı reaksiyonu | - |
| Voges-Proskauer reaksiyonu | - |
| Hidrojen sülfid | - |
| Sitrat | d |
| Fenilamin deaminaz | - |
| B-galaktozidaz (ONPG) | d |
| Karbonhidrat utilizasyonu | |
| Maltozdan asit üretimi | + |
| Glikozdan asit üretimi | - |
| Üremede karbon kaynağı | |
| Adonitol | - |
| Arabinoz | - |
| B-hidroksibütirat | - |
| Sellobiyoz | d |
| Dulsitol | - |
| Glikoz | + |
| Fruktoz | d |
| Galaktoz | d |
| Laktoz | + |
| Maltoz | + |
| Mannitol | - |
| Mannoz | d |
| Ramnoz | - |
| Salisin | - |
| Sorbitol | - |
| Trehaloz | +/- |
| Eskülin hidrolizi | + |
| Jelatin likefaksiyonu | + |
| Tween 80 hidrolizi | + |
| DNaz üretimi | + |
| Üre hidrolizi | - |

+; suşların >%85'inden fazlası pozitif, d; suşların %16-84'ü pozitif, -; suşların <%15'inden azı pozitif.

2.2. *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ENFEKSİYONLARI VE RİSK FAKTÖRLERİ

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonlarının klinik belirtileri bakteriyemi pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, oküler enfeksiyonlar, endokardit, menenjit, yumuşak doku ve yara enfeksiyonu, kolanjit, osteokondrit, peritonit olabilmektedir. Uzun süreli intravenöz kateter kullanımı *S.maltophilia* enfeksiyonlarında, patojenin yayılımı ve yerleşmesi açısından uygun ortam sağlabilmektedir. Bakteriyeminin en sık kaynağı ise solunum yolu, santral venöz kateterler veya üriner kateterlerdir (17)

Virulansı yüksek bir bakteri olarak kabul edilmeyen *S. maltophilia*'nın günümüzde daha çok nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak saptandığı görülmektedir. Hastanelerde özellikle yoğun bakım ünitelerinde, hemodiyaliz hastalarında, kalıcı santral venöz kateter takılanlarda, immün yetmelikli olgularda, hastanede uzun yatış süresi, nötropeni, malignite, ileri yaş, diabetes mellitus gibi altta yatan nedenleri bulunanlarda, bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç kullanan hastalarda *S. maltophilia* enfeksiyonları daha sık olarak görülmektedir. Mortalite hızı bakteriyemili hastalarda % 14-69 olarak saptanmıştır (18).

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonlarında bakterinin vücuda girişi için uzun süreli intravenöz kateter kullanılmasıyla gerçekleşebilmektedir. Bakteriyeminin en sık kaynağının üriner ve santral venöz kateterler ile solunum yolu olduğu belirtilmektedir (1).

Enfeksiyonların yaygınlaşmasında tanı ve tedavi amacıyla kullanılan cihazlar ve aletler ile invaziv girişimler, invaziv tedavi yöntemleri ayrıca antimikrobik ilaçların akılcı olmayan kullanımı önemli rol oynamaktadır. Özellikle, *S. maltophilia*'nın neden olduğu enfeksiyonların gelişimi için en önemli bağımsız risk faktörlerinden birisinin, geniş spektrumlu antimikrobik ilaç tedavisi olduğu kabul edilmektedir (18). *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonları için risk faktörleri çizelgede sunulmuştur (Çizelge 2.2)

Çeşitli ülkelerde farklı hastanelerde *S. maltophilia* enfeksiyonu için sürveyans çalışmaları yapılmış, kullanılan moleküler tekniklerle izolatların yüksek düzeyde genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir (19-22).

Çizelge: 2.2. *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonları için risk faktörleri (23).

| |
|--|
| Malignite, özellikle hematolojik malignite |
| İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) |
| İntravenöz ilaç/ uyuşturucu kullanımı |
| Cerrahi veya trafik kazaları |
| Hastanede uzun kalış |
| Acil servise yatış, mekanik ventilasyon |
| Vasküler veya üriner kataterizasyon |
| Kortikosteroid ve immunosupresif tedavi |
| Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi |
| Gastrointestinal sistem kolonizasyonu ve mukozit |
| Kemik iliği nakli |

Stenotrophomonas maltophilia'nin genel olarak düşük virülanslı bir bakteri kabul edilmesine rağmen, hastanelerde özellikle immün yetmezlikli hastalar arasında çok ilaca dirençli fırsatçı bir patojen olması çözülmesi gereken acil bir sorun oluşturmaktadır. Hastada altta yatan bir malignensinin bulunması, kistik fibrozis, kortikosteroid veya immün sistemi baskılayan ilaçların kullanılması, santral venöz katater varlığı ve hastanın geniş spektrumlu antibiyotik kullanması *S. maltophilia* enfeksiyonu için risk faktörleri arasında sayılmaktadır. *S. maltophilia* patogeneğinde antibiyotiklere direncin yanısıra farklı moleküler mekanizmaların da katkıda bulunduğu belirtilmektedir (1,6).

2.2.1. *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* PREVALANSI VE ENFEKSİYON SÜRVEYANS ÇALIŞMALARI

Stenotrophomonas maltophilia klinik özellikleri ve prevalansı hakkında 1970 yılları öncesine (*Pseudomonas maltophilia* veya *Xanthomonas maltophilia* olarak bilindiği dönemler) ait bilgiler sınırlıdır. Nozokomiyal patojen olarak 1980'li yıllarda özellikle kemoterapi sonrası nötropenik hastalarda ve santral venöz katateri olanlarda dikkat çekmeye ve rapor edilmeye başlanmıştır (24).

Dünya genelinde 1990lı yılların sonlarına doğru sürveyans programlarının başlaması ve çok merkezli çalışmalar ile bu bakterinin patojenitesi hakkında daha açıklayıcı bilgilerin elde edilmesi mümkün olmuştur. En iyi bilinen sürveyans programlarından ilki 1997 yılında SENTRY (Antimikrobiyal Sürveyans Programı) ve diğeri 2002 yılında SMART (Antimikrobiyal Direnç Eğiliminin Monitörizasyonu Çalışması) sürveyans programlarıdır. Aynı zamanda ulusal çaplı programlar başlatılmış olup bir kısmı da antimikrobik ajanlar için yapılan proje kapsamında ele alınmıştır. Bu programlara örnek olarak CANWARD (Kanadaya Yönelik Sürveyans Çalışması), SCOPE (Epidemiyolojik Önemi Olan Patojenlerin Sürveyans ve Kontrolü), BSAC (Antimikrobiyal Terapi İngiliz Cemiyeti Direnç Sürveyans Projesi), TSAR (Taiwan Sürveyans ve Antimikrobiyal Direnç Çalışması) ve TEST (Tigesiklin Sürveyans Gelişimi Takibi) geliştirilmiş sürveyans programlarıdır. Yürütülen beş SENTRY programına göre 1997-2003 yılları arasında enfeksiyon sıklığı %0,8-1,4, 2007-2012 yılları için CANWARD ve SENTRY antimikrobiyal sürveyans programlarında ise prevalans %1,3-1,68 olarak raporlanmıştır. Bu veri genel popülasyonda *S. maltophilia*'ya bağlı enfeksiyonların giderek artan bir eğilim gösterdiğini ifade etmektedir (24,25).

Bu sürveyans çalışmaları kapsamında non-fermentatif Gram negatif bakteriler arasında *S. maltophilia*'nın, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* sonrası en sık üçüncü patojen olarak izole edildiği belirlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde %1,4-3 gibi genel popülasyondan daha yüksek bir oranda belirlenmiştir (24). Kistik fibrozisli hastalardan Amerikada %10, Avrupa da ise %25lere varan oranlarda izole edildiği ve genel durumu bozuk olanlarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olduğu belirtilmiştir (25).

Çok ilaca dirençli suşlarda sınıf 1 integron varlığının ÇİD ile ilişkisi açık olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte biyofilm oluşumunun CIP ve LEV direnciyle bağlantısı olmadığı gösterilmiştir (9)

2.2.1.1 Ülkemizdeki *Stenotrophomonas maltophilia* Enfeksiyonlarında Durum

Ülkemizde farklı il ve hastanelerde yapılan çalışmalarda antibiyotik duyarlılıklarında farklılıklar gözlenmektedir. Manisa'da yapılan çalışmada bakteriyemili hastalardan izole edilen suşlarda TMP-SMZ duyarlılığı %91,4 olarak saptanmış olup, piperasilin-tazobaktam için bu oran %62,8 olarak belirlenmiştir (26).

Ankara'da Çocuk hastalarda bakteriyemi etkeni olarak 10 yıllık (1995-2005) retrospektif değerlendirmede bakteriyemi etkenlerinin %2,2'sinin *S. maltophilia* kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Bakteriyeminin karbapenem tedavisi sırasında görüldüğü saptanmış olup CIP, TMP-SMZ tedavide kullanılan ilaçlar olarak bildirilmiştir. İlginç olarak CIP duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle %97 olarak saptanırken mikrodilüsyon ile bu oran %49 olarak bulunmuştur (27).

Trabzon'da üniversite hastanesi yenidoğan kliniğinde beş yıllık gözlem sonucunda (2003-2008) *S. maltophilia* enfeksiyonlarının risk faktörlerinin değerlendirilmesinde, sepsis gelişenlerin %82'sinin ventilatör ilişkili pnömoniden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ayrıca hastanede uzun kalış süresi ve invaziv girişimlerin uygulanması önemli risk faktörü olarak belirtilmiştir. En etkili tedavi ajanı TMP-SMZ (%87) olarak bulunmuş ve mortalite oranının %17 olduğu belirlenmiştir (28).

TMP-SMZ ile tigesiklinin tedavi etkinliğinin karşılaştırıldığı çalışmada üç yıllık süre içinde klinik yanıt ve mortalite açısından her iki antibiyotik tedavisi arasında fark görülmemesi tigesiklinin gerektiği durumlarda alternatif bir seçenek olarak kullanılabilceği görüşünü desteklemiştir (29).

Kayseri'de üniversite hastanesinde hematoloji ve onkoloji servisinde dört yıllık sürede takip edilen 38 hastanın %84,2'sinde santral venöz kateter olduğu, %71,1 hastanın ise nötropenik olduğu, %23,7 olguya da kortikosteroid tedavisi verildiği saptanmıştır. Ciddi sepsis ve tedavi süresinin uzunluğu ölümlerle ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar immün yetmezlikli hematoloji-onkoloji hastalarında *S. maltophilia*'nın etken olarak

düşünüldüğünde en kısa sürede etkili ampirik antibiyotik tedavisinin başlanması gerektiğini ve antibiyotik duyarlılık sonuçları elde edildiğinde de buna göre antimikrobiale spektrumun daraltılabileceğini belirtmişlerdir (30).

Sivas'ta üniversite hastanesinde 2006-2013 yıllarında primer bakteriyemi ve nozokomiyal pnömoni olarak 71 olgu araştırılmış ve pnömonili hastalarda mortalitenin daha yüksek olduğu gözlenmiş, uygun olmayan antibiyotik tedavisi ve çoklu organ yetmezliği de klinik durumu olumsuz etkileyen bağımsız risk faktörleri olarak belirlenmiştir (31)

TMP-SMZ direncinin moleküler analizi için *sul1*, *sul2*, *dfrA9*, *dfrA10*, *dfrA20* and sınıf I, sınıf II integron gen kasetlerinin araştırıldığı çalışmada, incelenen suşların mikrodilüsyonla %9,4'ünde TMP-SMZ direnci belirlenmiştir. Sadece bir izolatta sınıf I integron gen kaseti ve *sul1* geni tespit edilmiştir. Gen kasetinin dizi analizi yapıldığında *oxa2*, *aac(6)-IIc*, *qacF* genlerini içerdiği saptanmıştır. Sınıf I gen kaseti ve *sul1* geninin birlikte ÇİD gelişimine katkıda bulunabileceği ve direncin yayılımı için potansiyel bir kaynak oluşturabileceği belirtilmiştir (32).

2.3. STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA VİRULANSINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER

Gittikçe artan oranda *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarının ortaya çıkması, bakterinin intrinsik olarak çoklu ilaç direncinin bulunması (β -laktam, aminoglikozidler ve kinolonlara), adezyon yeteneklerinin olması ve biofilm oluşturmaları sonucunda kolonizasyonlarının kolay olmasından kaynaklanmaktadır. Yoğun bakımlarda sık görülmesi ve antibiyotiklere dirençli olmaları yüksek genetik değişkenliğinin olması ve hastane içi yayılımının hızlı olmasıyla ilişkilidir.

Yapısal direncin azalmış dış membran geçirgenliğine, hücre duvar yapısında bulunan lipopolisakkarit yapı değişikliklerine, çok ilaç için dışa atım pompası üretimine, direnç gen kasetlerinde integronların varlığına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Melanin benzeri pigmentlerin ve biyofilm oluşumunun antimikrobiyal ile ilişkisi gösterilmiştir. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın hastada kullanılan medikal aletlere, kataterlere ve epitel hücrelerine tutunması biyofilm oluşumunun ilk aşaması olup, aynı zamanda farklı antimikrobiale ajanlardan ve konak immün yanıtından doğal olarak koruyan bir bariyer

görevi de görmektedir. Bu bakterinin virulans faktörleri ile ilgili bilgiler çok sınırlı olup aynı zamanda enfeksiyonun bulaş yolu hakkında da fikir birliği sağlanamamıştır (23, 25).

Birçok potansiyel faktör içerisinde dış membran proteinleri bakteriyel etkileşim ve bakterinin farklı ortamlarda yaşamını sürdürmesi açısından önem taşımaktadır. Bakteriyel patojenlerin dış membranlarında bulunan çoğu makromolekül özellikle hücre yüzeyindeki proteinler önemli virulans faktörleri olup konak immün hücreleri için hedef görevi üstlenmektedirler. Dış membran proteinlerinin tanımlanmasının enfeksiyon patogenezinin aydınlatılmasında, yeni ilaç geliştirilmesinde, yeni hedeflerin saptanmasında ve aşı çalışmalarında büyük önemi vardır. Bakteri tarafından salgılanan proteazların virülanstaki rolleri konusunda kabul gören yaklaşım, bu enzimleri enfeksiyon oluşumuna en az üç yoldan katkıda bulunabilecekleridir. Birincisi konağın uygun olmayan koşullarında ortaya çıkan çeşitli proteinlerinin regülasyonunda rol oynamak, ikinci olarak çeşitli uyarılar sonucunda salgılanan düzenleyici proteinlerin kontrollü proteolizisi için spesifik katkıda bulunmak, sonuncusu ve daha direkt ilişkili; ekzotoksin olarak salgılanabilme olasılıklarının bulunmasıdır. Bu proteinler dış membran veziküllerinde olabildikleri gibi bazen de sitoplazma içerisinde bulunabilmektedirler. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'nin polimikrobiyal ortamda yarıştıkları bakterileri öldürebilmek için murein hidrolaz içeren dış membran veziküllerini ürettikleri gösterilmiştir. Bu özellik *S. maltophilia*'nın ATCC 3637 suşunda belirlenmesine rağmen test edilen diğer bir suşta (M30) belirlenememiştir (8, 9, 25).

2.3.1. ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Yapılan çalışmalarda bakterinin pek çok suşuna etkili bir antibiyotik olan trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ) tedavi amacıyla klinik uygulamalarda yaygın kullanılan bir antibiyotiktir. Bununla birlikte bu antimikrobik ilaca karşı gelişen hızlı direnç nedeniyle *S. maltophilia*'ya bağlı enfeksiyonların tedavisinde diğer bir seçenek olarak levofloksasin alternatif bir tedavi ilacı olarak kabul görmüştür. Levofloksasine direncin görülmesi ise bu bakteri kaynaklı enfeksiyonların üstesinden gelinmesini güçleştirmiştir (33).

Tedavide direnç gelişiminin kontrol altına alınabilmesi için en etkili tedavi seçeneği olan TMP-SMZ çoğunlukla tikarsilin-klavulonat, minosiklin, piperasilin-tazobaktam ile birlikte kullanılmaktadır. Minosiklin, levofloksasin, TMP-SMZ için CLSI, TMP-SMZ için EUCAST disk difüzyon değerlendirme kriterleri mevcuttur (34, 35). Fakat daha çok sıvı mikrodilüsyon, E-test veya agar dilüsyon, yöntemlerinin tercih edilmesi önerilmektedir (17).

Aminoglikozid antibiyotiklerle 30°C ve 37°C gibi farklı derecelerde duyarlılık testi yapıldığında *S. maltophilia*'nın farklı direnç profilleri gösterdiği belirlenmiştir. Yine 24 ve 48 saat sonrasında yapılan değerlendirmelerde TMP-SMZ, CIP, CAZ, sefepim, piperasilin, piperasilin-tazobaktam antibiyotikleri için direnç durumlarında önemli farklılık saptandığı bildirilmiştir (1).

Çok virulan bir bakteri olmamasına rağmen *S. maltophilia*, çok ilaca dirençli (ÇİD) fenotipi, mukozal yüzeylere ve aletlere adezyonu sağlayan biyofilm oluşumu ve eradike edilmesini zorlaştıran işlevleri olan proteinleri ifadeleyen çok sayıda gen içermektedir (7).

Stenotrophomonas maltophilia beta-laktamaz, aminoglikozid asetiltransferaz ve eritromisini inaktive eden enzimleri ve eflüks pompaları kodlayan genleri nedeni ile birçok antibiyotiğe intrinsek olarak dirençlidir. β -laktam antibiyotiklerle indüklenen, L1 ve L2 denilen iki β -laktamazı bulunmaktadır (26, 27). Bu enzimlerin büyük bir plazmid benzeri elementle ifade edildiği ileri sürülmekle birlikte henüz doğrulanmamıştır (7).

Bu durum düşük membran permeabilitesi, çok ilaca direnç eflüks pompasının olması, antibiyotik modifiye eden enzim varlığı, kinolon direnç geninin (*Smqnr*) varlığından kaynaklanmaktadır (6, 7). Direncin aynı zamanda, zamanla mutasyon gelişmesi veya horizontal gen transferleri ile kazanılabileceği ileri sürülmektedir. Diğer bilinmeyen mekanizmaların da direnç gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmektedir (6).

Kinolonlar sentetik antibiyotikler olup klinikte sık kullanılmaktadırlar. Bu antimikrobiklere direnç gelişimi kromozomal mutasyon veya direnç genlerinin plazmidlerle kazanılmasıyla gerçekleşir. İlaç hedefi olan DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV enzimlerinin birinin veya her ikisinin ifadelenmesini sağlayan GryA ve ParE gen bölgelerindeki mutasyonlarla ve enzim-DNA kompleksine ilacın bağlanmasının azaltılmasıyla gerçekleşmektedir. Giraz

iki GyrA ve iki GyrB altünitinden, topoizomeraz IV iki ParC ve iki ParE altünitinden oluşur. Her iki enzim de DNA çift zincirinin kırılmasında zincirler arası geçişlerde ve kırılan parçanın salınımında rol oynamaktadır. Kinolonlar DNA çift zincir kırılmalarını bloke ederek enzim aktivitesini inhibe etmiş olmaktadırlar (7, 12). Giraz veya topoizomeraz IV enzimlerindeki tek aminoasit değişikliği kinolon direncine neden olabilmektedir. Bu mutasyonlar sıklıkla GyrA veya ParC'nin amino terminal domaininde aktif tirozin alanına yakın gerçekleşmektedir. *Stenotrophomonas maltophilia*'da SmeDEF RND dışa atım pompasının dirence katkısı gösterilmiştir. Plazmid aracılı kinolon direncinde dirençten sorumlu gen *qnr* olarak isimlendirilmiştir. Tekrarlayan pentapeptid sentezinden sorumludur. *Qnr* proteinlerinin DNA giraz veya topoizomeraz IV enzim bölgelerine bağlanarak etki gösterdiği düşünülmektedir. CIP için gittikçe artan oranlarda direncin görülmesi ikinci bir plazmid aracılı mekanizmanın keşfi ile ortaya çıkarılmıştır (1). Kinolonların bir aminoglikozid açıltransferaz (AAC(6')-Ib-cr) ile modifikasyonunun gerçekleşmesi bu plazmid aracılı mekanizmanın temelini oluşturmaktadır. Plazmid aracılı kinolon direncinin üçüncü mekanizması ise plazmid aracılı QepAve OqxAB kinolon eflüks pompalarının varlığıdır. Plazmid aracılı kinolon direnci bakterilerin kinolonlara duyarlılığını azaltmakta, yüksek dirençli mutant bakterilerin seçilmesine neden olmakta ve tedavi başarısızlığına neden olmaktadır. *Qnr* homologları birçok Proteobacteria, Firmicutes ve Actinomycetales ailelerindeki bakterilerin kromozomunda bulunabilirler. *S. maltophilia* kromozomunda 50 alellik varyantı tespit edilmiştir. Dünyada *qnr* geninin varlığının kinolonların keşfinden çok daha önce olduğu ileri sürülmektedir. Plazmid aracılı kinolon direnç genleri farklı büyüklükte ve özgülükte bulunmaktadır. Bu direncin dünyada yaygın olarak bulunmasından çok sayıda plazmid tipinin olması sorumlu tutulmaktadır. *Qnr* genleri çoğunlukla diğer direnç bölgeleriyle ilişkili çoklu direnç plazmidlerinde bulunurlar (12).

Doğada bulunan ve yapısal dirence sahip olan *S. maltophilia* gibi bakterilerin metabolik yollarını kendileri için zararlı olan antibiyotik gibi yapıları ortadan kaldırmak amacıyla kullandıkları düşünülmektedir. Hatta bu bakterilerin sahip oldukları biyokimyasal yollarla antibiyotikleri besin kaynağı olarak kullanabildikleri ileri sürülmüştür (1, 3, 4)

Kazanılmış direnç ise integron, transpozon ve plazmidlerle olmaktadır (5). *Stenotrophomonas maltophilia*'nın tüm genomunun karşılaştırmalı ve fonksiyonel

analizinde yoğun olarak ilaç direnç bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir (7). Gram negatiflerde ÇİD'in genellikle direnç nodulasyon bölümü (RND) efluks pompasının aşırı ifadenmesiyle ortaya çıktığı gösterilmiştir. Tüm genom analizi yapılan K279a suşunun dokuz RND-tip efluks pompası taşıdığı belirlenmiştir. Sınıf1 integronların ÇİD ile ilişkileri açık bir şekilde ortaya konulmuştur (9, 36). TMP-SMZ direncinde rolü olan *sul1* sınıf 1 integron elemanıdır (2).

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonlarında bakteriyostatik etkili TMP-SMZ tercih edilen tedavi seçeneğidir. SENTRY anitmikrobiyal sürveyans programı 2004 yılında TMP-SMZ direncinin %3,8 olduğunu rapor etmiştir (13). Bununla birlikte artan direnç bildirimleri klinisyenleri alternatif tedavi seçeneklerine yöneltmiştir (14, 15, 37). Bu durum kombine antibiyotik tedavi seçeneklerinin yaygınlaşmasına neden olmuştur.

İntrinsik rezistom kavramı antibiyotikle karşılaşmayan suşlarda bulunan intrinsik direnci taşıyan bir grup kromozomal genin varlığını ifade etmek için kullanılmaya başlanmıştır (38). İntrinsik rezistom konusundaki bilgilerimiz sınırlı olmakla birlikte hücre metabolizmasında bulunan antibiyotik direnci ile ilişkili bilinen ve bilinmeyen genleri içerdiği bildirilmiştir (38).

Antibiyotiklere düşük duyarlılık sıklıkla aktif efluks, dışa atım pompalarının bulunmasıyla ilişkilidir. *Stenotrophomonas maltophilia* K279a suşunda belirlendiği gibi RND, MFS ve ABC dışa atım pompalarını içeren sekiz ÇİD dışa atım pompası olarak belirlenmiştir (7). Bu ÇİD dışa atım pompaları membran füzyon proteini, enerji bağımlı taşıyıcıyı ve bir dış membran proteininden oluşmaktadır (1). Gram negatif bakterilerde RND dışa atım pompası üç proteinden oluşmuştur; substrata bağlanan iç membran proteini, dış membran proteini (porin) ve periplazmik aralıkta iç ve dış membrana bağlanan membran füzyon proteini. Genellikle dışa atım işleyişi düşük düzeyde ifade edilmektedir. Aşırı ifadenme düşük antibiyotik duyarlılığı ile ilişkilidir (6). Dışa atım pompasındaki tüm proteinler RND ailesine ait SmeABC, SmeDEF ve SmeVWX proteinleri olup aynı operondaki birbirini izleyen tipik genom düzeniyle ifade edilirler. Bu pompalar doğal ve kazanılmış direnci karakterize ederler (39). *Stenotrophomonas maltophilia*'daki kinolon direnci bakteriyel topoizomeraz ve giraz genlerindeki mutasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve SmeDEF dışa atım pompasının aşırı ifadenmesinden kaynaklanmaktadır (1). SmeABC

dışa atım pompası β -laktam, aminoglikozid ve kinolonlara kazanılmış dirençten sorumludur. Sme DEF dışa atım pompası kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolonlara doğal ve kazanılmış dirençten sorumludur. Sme VWX dışa atım pompası aynı antibiyotiklere kazanılmış dirençte rol oynar (38). Sme IJK ve SmeYZ dışa atım pompaları yeni tanımlanan RND ailesine ait dışa atım pompalarıdır. Her ikisi de aminoglikozid, tetrasiklin ve siprofloksasine doğal ve kazanılmış dirençten sorumludur (7). Bu pompaların yüksek düzeyde ifade edilmesi levofloksasine direnç gelişimine neden olduğu belirlenmiştir (36, 39)

Stenotrophomonas maltophilia kinolonlar gibi sentetik antibiyotiklere düşük duyarlılık göstermektedir. Kinolonların hedefi topoizomerazlar olup, bakterideki bu enzimlerin mutasyonu direnç gelişimine neden olmakla birlikte henüz *S. maltophilia*'da bu enzime ait bir mutasyon belirlenmemiştir. Bu direncin de dışa atım pompalarından ve smqnr proteininden kaynaklandığı gösterilmiştir (38, 40). Bu protein bilinmeyen bir mekanizma ile doğal ve kazanılmış dirençle ilişkilidir. *Qnr* çift zincirli DNA benzeri bir dimer yapısındadır (42). Smqnr proteini, plazmitte ifade edilenle benzer olarak topoizomeraza bağlanarak bakteriyi korumaktadır (43).

TMP-SMZ kombinasyonu sık tercih edilen tedavi seçeneği olarak *S.maltophilia* enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. TMP-SMZ direnci *sul1* ve *sul2* ile ilişkilendirilmiştir. *Sul1* esas olarak kromozomal genlerde (insertion element common region-ISCR) bulunmasının yanısıra esas olarak plazmitteki sınıf1 integronlarla ilişkilendirilmiş, *sul2* geni ise plazmitte tespit edilmiştir (2). TMP-SMZ dirençli olguların hepsi bu genlerin varlığı ile açıklanamamaktadır (44). Dihidrofolat redüktaz enzimini ifade eden *dfrA* geni *S.maltophilia*'daki TMP direncine katkıda bulunmaktadır (1).

Transkripsiyon ve translasyon sonrası regülasyon veya modifikasyon antibiyotik direncinde değişikliğe neden olabilmektedir. İfade edilmeyen sRNA (non-coding small RNA) ve RNA bağlayan Hfq proteinlerinin varlığı *S. maltophilia*'da gösterilmiş olup, antibiyotik duyarlılığındaki değişiklikler, biyofilm oluşumu, hareket ve çeşitli sRNA ifade ettiği gösterilmiştir (45). *Stenotrophomonas maltophilia*'nın antibiyotik direnç mekanizmaları ve dirençle ilişkili genler rolleri Çizelge 2.3.1.1 ve 2.3.1.2'de sunulmuştur (6, 23)

Çizelge: 2.3.1.1. *Stenotrophomonas maltophila*'nın antibiyotik direnç mekanizmaları (6, 23)

| Mekanizma | Örnek |
|--|---|
| Dış membran proteinlerinin modifikasyonu | Protein ifadenmesi Geçirgenliğin azalması |
| Kormozomal olarak kodlanan çok ilaca direnç efluks pompaları | Sme ABC, SmDEF, Kadmiyum efluks bölgeleri. Cad A, Cad C RND efluks pompası |
| Enzimatik mekanizmalar | Kromozomal veya plazmidle kodlanan L1 ve L2 gibi β -laktamazlar Aminoglikozid asetil kolin modifiye eden enzim Makrolid fosfotransferaz inaktivasyonu |
| Hedef bölge değişikliği | Lipopolisakkarid üzerindeki fosfoglikomutaz gen mutasyonları Bakteriyel topoizomeraz ve giraz gen mutasyonu |

Çizelge: 2.3.1.2. *Stenotrophomonas maltophila*'nın antibiyotik direnç genleri ve direnç profilleri (6, 23)

| Gen | Ürün | Antibiyotik direnç fenotipi | İntrinsik/kazanılmış antibiyotik direnci |
|---------------|------------------------|---|--|
| <i>SmeABC</i> | RND tip efluks pompası | AGA, β -laktam ve kinolonlar | -/+ |
| <i>SmeDEF</i> | RND tip efluks pompası | Kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolonlar | +/+ |
| <i>SmeGH</i> | RND tip efluks pompası | Bilinmiyor | Belirlenmemiş |
| <i>SmeIJK</i> | RND tip efluks pompası | AGA, tetrasiklin ve CIP | +/+ |
| <i>SmeMN</i> | RND tip efluks pompası | Bilinmiyor | Belirlenmemiş |
| <i>SmeCP</i> | RND tip efluks pompası | AGA, nalidiksik asit, doksisisiklin, makrolid | +/- |

| | | | |
|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| <i>SmeVWX</i> | RND tip efluks pompası | Kloramfenikol, kinolonlar | -/+ |
| <i>SmeYZ</i> | RND tip efluks pompası | AGA | +/+ |
| <i>emrCABsm</i> | MFS tip efluks pompası | Nalidiksik asit | -/+ |
| <i>smlt0032</i> | MFS tip efluks pompası | Bilinmiyor | Belirlenmemiş |
| <i>smtcrA</i> | MFS tip efluks pompası | Tetrasiklin | -/+ |
| <i>smrA</i> | ABC tip efluks pompası | Kinolonlar, tetrasiklin, doksorubisin | Belirlenmemiş/- |
| <i>macABCsm</i> | ABC tip efluks pompası | Makrolidler, AGA, polimiksinler | +/- |
| <i>L1</i> | β -laktamaz | β -laktamlar | +/+ |
| <i>L2</i> | β -laktamaz | β -laktamlar | +/+ |
| <i>aph(3')-IIc</i> | AGA fosfotransferaz | AGA | +/+ |
| <i>aac(6')-Iz</i> | N-AGA asetiltransferaz | AGA | +/+ |
| <i>Smqnr</i> | Pentapeptit tekrarlayan proteinleri | Kinolonlar | +/+ |

2.3.2. BİYOFİLM

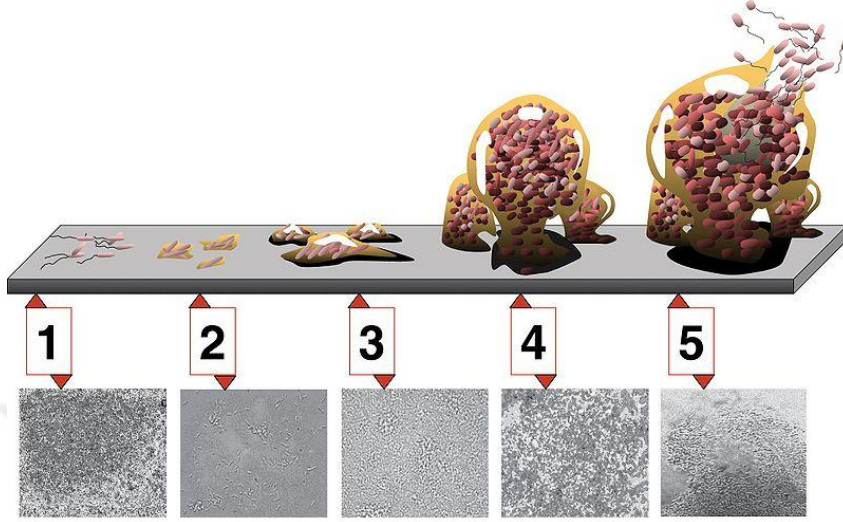
2.3.2.1 Biyofilm yapısı ve oluşumu;

Mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunup hücre dışı polimer yapıları bir matris içerisinde yaşayan ve birbirleriyle haberleşmeyi (quorum sensing) çeşitli sinyallerle sağlayarak bir topluluk oluşturmalarını kapsayan süreç biyofilm oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Sıvı ve nemli ortamlar mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları için elverişli zemin hazırlamaktadır. Bakterilerin yanı sıra, çeşitli mantarlar, algler ve protozoonların da biyofilm oluşturdıkları bilinmektedir. Biyofilm oluşumu içerisinde farklı bakteriyel tür veya cins birlikte bulunabilmektedir (46)

Tıbbi öneminin yanı sıra biyofilm, gıda ve endüstriyel sektörde çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Tıbbi açıdan dental plak oluşumu, kateter enfeksiyonları, eklem ve kalp protez enfeksiyonları, endokardit, kistik fibrozis hastalığı, kontakt lens enfeksiyonları, böbrek taşları biyofilmle ilişkili klinik durumlar olarak görülmektedir. Ayrıca kronik sinüzit,

kronik otit, osteomyelit, diabete bağlı gelişen yara enfeksiyonları da biyofilm kaynaklı olarak gelişebilmektedir (47).

Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir. (Şekil 2.3.2.1)



Şekil:2.3.2.1. Biyofilm oluşumunun aşamaları (48)

1. **Tutunma:** Biyofilm oluşumunun başlaması için mikroorganizmaların belirli bir strese maruz kalmaları gerekmektedir. Biyofilm oluşumunu; yüzeyin düzgün veya pürüzlü olması, yüzeyde müsin, aktin, DNA gibi organik ve inorganik maddelerin varlığı ve ortamın oksijen, pH, ısı, osmolarite durumu bildiren çevresel sinyallerin olması etkilemektedir. Bu aşama hızla gelişmekte ve saniyelerle ifade edilmektedir. Bazı hücreler geri dönüşümsüz olarak bağlanabilirken bir kısmı serbest kalarak ayrılabilir. Bu evrede hücreler logaritmik çoğalma göstermektedirler.
2. **Geri dönüşümsüz tutunma;** ilk evreden dakikalar sonra başlar ve adezinlerin rol oynadığı geri dönüşümsüz bir bağlanma söz konusudur. Bakteriler adezinleri ile hem yüzeye hem de diğer hücrelere bağlanabilirler. Bakteriler çoğalmaya devam ederken quorum sensing sinyallerini birbirlerine gönderirler. Sinyal yoğunluğu belirli bir düzeye ulaştınca bakterilerde hücre dışı polimerik madde üretimi başlatan genetik yollar aktive olur. Mikroorganizmalar kümelenmeye başlar ve etrafları bir tabaka ile kaplanır. Bu tabakanın %50-90 kadarı hücre dışı polimerik yapıdan (slime) oluşurken geri kalanı protein ve DNA'dan meydana gelmektedir. Slime yapısı planktonik bakterileri, besin maddelerini, mineral, kristal ve korozyon moleküllerini tutar.

3. **Tabaka oluşması:** Biyofilm tabakası 10µm'yi aştığında 1. olgunlaşma evresi de denilen üçüncü evre başlar. Bu evrede tipik olarak %75-90'ı slime, %10-15'i bakterilerden oluşan mikrokoloniler meydana gelir.
4. **Tabakaların kalınlaşması;** Biyofilm tabakasının kalınlığı bu evrede 100 µm'ye ulaşmıştır. Bu evreye 2. olgunlaşma evresi de denilmektedir.
5. **Planktonik şekilde ayrılmalar:** Biyofilm oluşumunun dördüncü aşamadan sonra gelişen bu son basamağında hücrelerden bir kısmı ayrılarak, yeni yüzeylere yapışmak için biyofilmi terkederler (46, 47).

Biyofilmdeki bakteri topluluğu bir organizma gibi birbiriyle iletişim ve işbirliği içinde bulunmaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler yapısal ve metabolik olarak heterojendirler. Yapının farklı seviyelerinde aerob ve anaerob ortam ve işlevler sürdürülmektedir. Hatta olgun bir biyofilm ortamında besin ve suyun iletimini sağlayan kanallar bulunmaktadır. Besin dolaşımı ve atıklar için bir iletim sistemi de bulunmaktadır. Bakterilerin etrafındaki biyofilm tabakası onları antibiyotik, antikor gibi immün sistem elemanları ve toksik maddelerden, dezenfektan etkisinden korumaktadır (47, 49).

Biyofilm oluşumunda quorum sensing sisteminin (çevreyi algılama sistemi) büyük önemi vardır. Hücrelerin salgıladığı kimyasal moleküller ile bakteriler çevrelerindeki hücre yoğunluğunu algılayabilir ve bu yoğunluğa katılma eğilimi gösterebilirler (47)

Bakteriler birbirleriyle iletişim kurabilmek için üç farklı sinyal molekülü üretirler. Gram-negatif bakteriler; açıl homoserin laktonlar (AHLs), Gram-pozitif bakteriler otoindükleyici peptidler (AIPs), Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde otoindükleyici-2 (AI-2) hücreler arası sinyal iletimini sağlayan moleküllerdir. Bu iletişim sayesinde koloni oluşumunun kontrolü, üreme hızının düzenlenmesi, türler arası iletişimin ve toksin üretiminin sağlanması mümkün olmaktadır (49).

Biyofilmin bakterilere sağladığı avantajlar ne yazık ki hastaların tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir. Biyofilm üreten bakterilerde antibiyotik tedavi başarısızlığı ilacın biyofilm tabakasına yeterince penetre olamamalarına, biyofilm içerisinde bakterilerin yavaş üremeleri nedeniyle antibiyotik etkisine daha az maruz kalmalarına, yüzeydeki bakterilerin antibiyotiklerden daha fazla etkilenmeleri nedeniyle daha derinde olan bakterilerin enfeksiyon kaynağı olarak sürekliliklerine bağlıdır (47, 49)

2.3.2.2 *Stenotrophomonas maltophilia*'da biyofilm etkisi

Tekrar tanımlayacak olursak biyofilm, bakterilere ait ekzopolisakkarit matriks, DNA ve proteinden oluşan karmaşık bir yapı olup sıklıkla katater gibi kliniklerde kullanılan aletleri etkileyerek arındırılmaları zor bir özellik taşırlar. Biyofilm nedeniyle antibiyotik ile bakteri etkileşimi azalarak, antibiyotik duyarlılığının azalması da meydana gelmektedir (6).

Stenotrophomonas maltophilia'nın teflon, cam, plastik ve insan dokularında biyofilm oluşturması önemli bir özelliğidir. Deneysel çalışmalarda taramalı elektron mikroskopunda *S. maltophilia*'nın iki saat içerisinde polistren yüzeye tutunduğu ve 24 saat içinde de biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir. *Stenotrophomonas maltophilia* fimbria 1 (*smf1*) proteinin adezyon için çok önemli olduğu gösterilmiştir (1)

Klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* için yapılan biyofilm deneylerinde 32°C'de, 37 °C ve 18 °C'den daha iyi biyofilm oluşturduklarını, biyofilm yükünün aerobik koşullarda veya %6 CO₂'li ortamda anaerobik koşullara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (1)

Biyofilm oluşumunun erken döneminde tutunmayı *smf1* fimbrial operondaki genlerin ifade ettiği saptanmıştır. Biyofilm oluşumunda rol oynayan *xanB* geni *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan fosfomanoz izomerazla büyük homoloji göstermektedir. Bu enzim alginat sentezinde anahtar rol oynamaktadır. *xanA* geni ise *spgm* olarak bilinmektedir aynı şekilde fosfoglikomutaz enzim homolojisi göstermektedir (7).

Çok sayıda pili ve fimbrial geninin olması katater ve ventilatörlere bağlanma yeteneğini doğurmakla birlikte kan ve akciğerden kaynaklı enfeksiyonlara yol açmakta olup, bu bakterinin eradikasyonunun neden zor olduğunu açıklamaktadır (9). *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotiklere direnç profillerinin yanısıra biyofilm yapma özelliklerinin de enfekte hastalarda prognozu belirleyen önemli bir kriter olduğu belirtilmiştir. Hücrelere adezyonda *S.maltophilia* fimbria 1 (*smf-1*) proteininin önemli rol oynadığı belirlenmiştir (8).

Antimikrobiyallerle *S.maltophilia* biofilmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, ÇİD olan ve olmayan suşlar arasında biyofilm yapma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Çok ilaca dirençli olan suşların olmayanlara göre daha fazla oranda biyofilm yaptıkları gösterilmiştir.

Aynı zamanda biyofilm oluşturan suşların seftazidim, sefepim, tikarsilin-klavulonik asit, piperasilin-tazobaktam, aztreonam ve gentamisin antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir (9, 49).

Biyofilm yapısının oluşmasında *rmla*, *rmlb*, *rmlc* ve *xanb* genleri önemli rol oynamaktadır (10). Biyofilm moleküler mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada fosfoglikomutaz ve fosfomannomutaz aktivitesini ifadeleyen *spgm* geninin biyofilm oluşumunda önemli olduğuna dikkat çekilmiştir (11).

2.3.3. VİRULANS GENLERİ

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyonlarının prognozunda ÇİD suşların tedavisinde büyük zorluk yaşanmasının yanısıra bu suşların prognozu etkileyen ve virülansında önemli rol oynayan birtakım proteinleri ifadeleyen genleri barındırması söz konusudur. Bazı bakteriler herhangi bir genomik farklılık göstermeksizin antibiyotiklere geçici olarak daha az duyarlı olabilirler. Fenotipik dirençten sorumlu genler hakkındaki bilgilerin sınırlı olduğu belirtilmektedir (6).

Bununla birlikte lipaz, fibrolizin, esteraz, DNaz, RNaz ve proteaz gibi hücre dışı enzimlerinin fazlalığı, kolonizasyon, adezyon ve epitel hücrelerinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (1). Bakterinin kromozomunda yer alan tür spesifik genomik adalar ürünü olan metal direnç genleri, tipI ve tipIV sekresyon sistemi, filamentoz hemaglütinin genleri, lipopolisakkarit genleri potansiyel patojenik determinatların bulunduğu bölgeler olarak belirlenmişlerdir (12). Çevresel izolatların klinik izolatlara göre mutasyon hızının çok daha az olduğu belirlenmiştir (50).

Yaygın görülmesine rağmen, *S. maltophilia*'nın virülans faktörlerinin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Solunum yolu epitel hücrelerine tip1 fimbria ve flagella ile tutunduğu, ayrıca dokuda kolonize olabilmek için DNase, RNase, fibrolizin, lipaz, proteaz, ve esteraz gibi hücre dışı enzimleri kullandığı gösterilmiştir (7, 8). Bakterinin en önemli hücre dışı proteazı olan *stmpr1* proteininin, saflaştırılarak kültüve edilmiş insan fibroblastlarına hasar verdiği ve immün yanıtın bileşenlerini inaktive ettiği gösterilmiştir

(51). Yakın zamanda *S. maltophilia*'nın, K279a ve D457 (Accession numbers: NC_010943.1 ve NC_017671.1), klinik izolatu ile R551-3 ve JV3 (Accession numbers: NC_011071.1 ve CP002986.1) çevre izolatının tüm genom dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir (7, 52). K279a genomunun dokuz RND-tip efluks pompa gen bölgesi taşıdığı saptanmıştır. L1 ve L2 B-laktamazlarının plazmid kaynaklı ifade edilmediği saptanmıştır (7).

2.3.4. GELECEK İÇİN YENİ YAKLAŞIMLAR

Son yıllarda *Stenotrophomonas* cinsi içindeki evrimsel gelişimin basamakları genomik ve transkriptomik uygulamalarla araştırılarak anlaşılmaya çalışılmıştır. Yaşam döngüsü, fizyolojisi, antibiyotik direnç elementleri ve virulans faktörleri gibi potansiyel risk faktörlerine yeni bakış açıları kazanılmıştır. Farklı *Stenotrophomonas* türlerinin farklı metilasyon hızları tanımlanmasıyla epigenetik analizlerin yorumlanması mevcut durumda açıklanması gereken birçok soruyu da beraberinde getirmektedir (53).

Aynı zamanda taksonomi konusunda yaşanan sıkıntılar hala devam etmekte olup özellikle *Stenotrophomonas* ve *Lysobacter* arasındaki ayırımıda yaşanan karmaşa yanlış tanımlamalara neden olmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonlarda gittikçe yaygın görülmeye başlanan ve ÇİD nedeniyle yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan *S. maltophilia* için farklı tedavi yaklaşımlarına acilen ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir. Bu sorunun çözülmesi için mikrobiyom uygulamalarının tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir (54). *Stenotrophomonas* türleri fajlarla yakın ilişkide olup, genomlarında farklı fajları taşıdıkları gösterilmiştir. Ayrıca litik fajlar da tanımlanmıştır (55). Bu durum ÇİD *Stenotrophomonas* için faj terapisi konusunda yeni imkanlar sağlayacaktır. Maltosin M28, *S. maltophilia*'dan ilk izole edilen faj kuyruk benzeri bakteriyosini olup antibiyotik yerine kullanılacak gelecek vaad eden bir seçenek olarak görülmektedir (56). Fajlara ek olarak probiyotik bakterilerin *S. maltophilia* için antagonistik aktivite göstermeleri enfeksiyonların önlenmesinde diğer bir seçeneği oluşturmaktadır. Doğal bir ürün olan yeşil çay bileşiklerinden epigallokatekin-3-gallat yapısının *S. maltophilia*'ya etkinliğinin gösterilmesi tedavide diğer ilginç bir alternatifi oluşturmaktadır (57).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışması çok virülan olmamasına rağmen nozokomiyal enfeksiyonlarda sık izole edilen *S. maltophilia* suşlarındaki antibiyotik direnç profillerini belirlemek, prognozdan sorumlu olan antibiyotik direncinin, biyofilm oluşumunun ve virülans faktörlerinin moleküler karakterizasyonunu tespit etmek üzerine odaklanmıştır.

Bunun nedeni özellikle antibiyotik duyarlılık sonucuna göre tedavi alan *S. maltophilia* ile enfekte olgularda, tedavi başarısının sağlanamaması durumunda hatta risk altındaki olgulardan enfeksiyon etkeni olarak bu bakterinin soyutlandığı anda tedavinin yönlendirilmesine katkı sağlayabilecek parametrelerin birlikte değerlendirilmesinin tedavi protokolü ile tutarlılık sağlayıp sağlayamayacağı konusunun değerlendirilmesidir. Diğer bir deyişle fenotipik olarak belirlenen bakteriye etkili antibiyotik seçenekleri ile bakterinin taşıdığı virülans faktörlerinin birlikte değerlendirilmesinin tedavi planlanmasında ve prognozda katkı sağlayıp sağlayamayacağı olasılığının tartışılmasıdır.

Bakteriyemili hastalardan izole edilen hastane kaynaklı suşlarla hayvanların burunlarından alınan örneklerden izole edilen suşların birlikte incelenerek çok ilaca dirençli suşlarda prognozu etkileyecek biyofilm ve virülans genlerinin antibiyotik direnciyle ilişkileri her iki örnek grubunda belirlenerek karşılaştırılmıştır. Hayvanların beslenmeleri sırasında toprakla ilişkileri nedeniyle burunda kolonize olan *S. maltophilia* suşlarının doğa kaynaklı olabileceği ihtimali nedeniyle bu suşlar ile nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak kandan izole edilen suşların, diğer bir deyişle çevresel ve klinik kaynaklı izolatların prognozda etkili faktörler açısından karşılaştırılarak virülanslarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Fenotipik olarak duyarlı olan suşların, bu özelliklerinin genotipe tam olarak yansımaması ve hastalık patogeneğinde bakteriye bağlı birçok faktörün birarada rol alması nedeniyle, fenotipik ve genotipik özelliklerin birlikte değerlendirilmesinin sağlanabilmesi konusunda yapılacak her türlü çalışma, *S. maltophilia* kaynaklı enfeksiyonlarla mücadelede tedavi yaklaşımlarında ve korunmada prognozu etkileyecek bilgiler doğuracaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. Standart suş

Çalışmada kullanılan referans suş *S. maltophilia* LMG 958, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan elde edildi.

4.1.2. *Stenotrophomonas maltophilia* örneklerinin toplanması

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürlerinden izole edilen ve otomatik yöntemlerle (MicroScan, WalkAway, Siemens, USA) tanımlanan insan kökenli suşlar (n=17) ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında sığırların burunlarından alınan örneklerden izole edilen kökenler (n=14) kullanıldı.

4.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

Stenotrophomonas maltophilia suşlarının identifikasyonu amacıyla MacConkey Agar (Oxoid, CM0007), Kanlı Agar (Oxoid, CM0055), Nutrient Agar (Oxoid, CM0003), Nutrient Broth (Oxoid, CM0501), Muller Hinton Agar (Oxoid, CM0337), Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0103), Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129), Oksidaz test çubukları (Oxidase Sticks, Oxoid, BR0064), Skim milk tozu (Oxoid, LP0031)

4.1.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Stenotrophomonas maltophilia suşlarının tümünün antibiyotik duyarlılık testleri mikrodilüsyon yöntemiyle ticari sistemle (MicroScan, WalkAway, Siemens) yapılarak minimum inhibitör konsantrasyonları saptandı. Bu sistem mikrodilüsyon esasına göre çalışmakta ve kalitatif olarak sonuç vermektedir (KMD). Ayrıca insan ve hayvan kökenli suşların siprofloksazin (CIP, Oxoid, 5ug), levofloksazin (LEV, Oxoid, 5ug) ve trimetoprim/sulfometoksazol (TMP/SMZ, Oxoid, 25ug) antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standarts Institute (34) standartlarına göre disk difüzyon yöntemi (Oxoid, antibiyotik diskleri, Thermo Scienific) ile de gerçekleştirildi.

4.1.5. Moleküler tanı ve Karakterizasyonu

DNA izolasyonu ticari kit (Mini Bacteria Kit, Invitrogen, USA) ile yapıldı Aynı zamanda hassas terazi (Scaltec, Almanya), soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya), ısıtma bloğu (Biosan, Letonya), steril kabin (Bioair Instruments, Aura, Italy), vorteks (Fine Vortex, Kore), Jel elektroforez (Wealtec elite 3000 plus, , USA), UV translüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Sygene, Bio Imaging System, UK) kullanıldı.

Çizelge 4.1.5’de listelenen primerler (Thermohybid, Germany) ile sülfonamid (*sul1*, *sul2*) ve kinolon direnci (*qnr1-2*, *qnr3-4*), biyofilm (*xanB*) ve virulans genleri (*orf9*, *smf-1*, *stmpr1*) PCR yöntemiyle araştırıldı. Çalışmada *qnr1-2* ile *qnr3-4* saptanması için Sanchez ve ark. (2008) çalışmalarında kullandıkları primer dizisi kullanılmış (58), diğer genlerin varlığını araştırmak için ise gerekli primerler, Primer 3 bilgisayar programı kullanılarak tasarlanmıştır.

Kullanılan primerlerin spesifiteleri NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak *in silico* analizleri ile kontrol edildi.

PZR karışımı; PZR master mix(2x) (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak hazırlandı ve amplifikasyon Arktrik™ Thermal cycler, (Thermo Fisher Scientific, USA) marka ısı döngü cihazında gerçekleştirildi. DNA marker (100-1000bp, Fermentas, Litvanya), 6xloading dye (Fermentas, Litvanya), agaroz (Thermo Fisher Sci) kullanılarak PZR ürünlerinin görüntülenmesi sağlandı.

Sonrasında *qnr1-2* saptanan, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kanlarından izole edilen dört suşun DNA dizi analizi Bigdye Terminator cycle sequencing 3.1 kiti kullanılarak ABI 3130 Applied Biosystems cihazında yapıldı.

Çizelge: 4.1.5. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan genler ve dizileri

| İlgili işlev | İsim ve uzunluk | Oligonükleotid dizisi | Referans |
|---------------------|-----------------------------|--|------------|
| Antibiyotik direnci | <i>sul</i> I, 1152 bp | F-5'-AATCCATCCCTGTCGGTGTT-3' R-5'-AGAGCTTAACGGTGCGATCT-3' | Bu çalışma |
| | <i>sul</i> II, 741 bp | F-5'-ACACAGAAATCGCGCGTATC-3' R-5'-GCAACCAGTCAGAATGCGAT-3' | Bu çalışma |
| | <i>qnr</i> 1-2, 312 bp | F-5'-AGAAAGTGGTTCGACCAGCAG-3' R-5'-GCAGGTTGACTTCTTGATG-3' | 58 |
| | <i>qnr</i> 3-4, 220 bp | F-5'-CAACGCCAGCTTCATGAACC-3' R-5'-AGTTGGCGCTGTTCCAGTCG-3' | 58 |
| Virulans genleri | <i>orf9</i> (holin), 582 bp | F-5'-AAGGAGCACGCACTGGAAA-3' R-5'-GCATAGCAGCGCACTCAG-3' | Bu çalışma |
| | <i>stmpr1</i> , 285 bp | F-5'-CAGGACTATGGTGACTGGGT-3' R-5'-CATGTTGATGACCTCGGCC-3' | Bu çalışma |
| | <i>smf-1</i> , 322 bp | F-5'-ACCGTGTCCAAGAACACTCT-3' R-5'-TGGCGTAGTACTCAGCGTAG-3' | Bu çalışma |
| Biyofilm geni | <i>xanB</i> , 217 bp | F-5'-CATCATTCCAGCCTGCATCC-3' R-5'-TTTAAGGCCTCGCGGTATCT-3' | Bu çalışma |

4.2. YÖNTEM

4.2.1 Suşların identifikasyonu:

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gazi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan örneklerinde üreyen *S. maltophilia* kökenleri (n=17) çalışmaya dahil edilmiştir. Suşlar konvansiyonel ve otomatik yöntemlerle (MicroScan, WalkAway, Siemens, USA) tanımlanmıştır. Aynı zamanda Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında hayvanlardan izole edilen *S. maltophilia* suşları da (n=14) çalışma kapsamına alınmıştır.

İnsan kaynaklı örnekler için otomatize kan kültür sisteminde (BacT/ALERT, Biomerieux, France) sinyal veren kan kültür şişelerinden, hayvan kökenli olanlar için ise, hayvan solunum yollarından alınan örnekler %5 koyun kanlı ve EMB besiyerlerine pasaj yapılarak $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda geniş tabanlı, düzgün yüzeyli, parlak, düzensiz kenarlı, eflatun-yeşilden açık pembeye kadar farklı renklerde olan ve bazı kolonileri sarı pigmentli, amonyak kokulu şüpheli kolonilerden üç şekerli demirli besiyerine subkültürleri yapılmıştır. Aynı zamanda indol, hareket, üreaz, sitrat besiyerlerine de ekim yapılmıştır. Tüm suşlara oksidaz testi yapılmıştır. Non fermentatif özellik gösteren, oksidaz negatif, hareketli özellik taşıyan ve koloni özellikleri ile *S. maltophilia* olduğundan şüphelenilen kolonilerden otomatik identifikasyon cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda test stripleri hazırlanmış, etüv ortamında 24 saat inkübasyon sonrasında cihazda okutularak bilgisayar ortamında analizi yapılmıştır (MicroScan, WalkAway, Siemens, USA). Konvansiyonel testlerle *S. maltophilia* özellikleri taşıyan, otomatize sistemle de *S. maltophilia* olarak tanımlanan suşlar skim milk besiyerinde daha sonraki çalışma aşamalarında kullanılmak üzere stoklanarak -20°C 'de saklanmıştır.

Stoklanan suşlar gerektiğinde çözülerek %5 koyun kanlı agara pasajlanarak taze koloni eldesi sağlanmıştır.

4.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri:

Çalışmaya dahil edilen suşlar çok ilaca dirençli (ÇİD) suşlardan seçildi. Bunu belirlemek amacıyla insan ve hayvan kökenli suşların amikasin, gentamisin, ampisilin-sülbaktam, piperasilin-tazobaktam, tikarsilin-klavulonat, sefazolin, sefepim, sefoksitin, seftazidim, seftriakson, CIP, LEV, ertapenem, imipenem, meropenem, tigesiklin, TMP-SMZ ve aztreonam için antibiyotik duyarlılık testleri ticari sistemle (MicroScan, WalkAway, Siemens) minimum inhibitör konsantrasyonları saptanarak belirlenmiştir. Bu sistem mikrodilüsyon esasına göre çalışmakta ve kalitatif olarak sonuç vermektedir (KMD). İnsan ve hayvan kökenli suşların CIP, LEV ve TMP/SMZ antibiyotik duyarlılık testleri CLSI standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile de gerçekleştirilmiştir (34). Disk difüzyon yöntemi; CLSI tarafından standardize edilen 1.25/23.75 µg TMP-SMZ, 5 µg LEV ve 5 µg CIP içeren diskler (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) ve Mueller-Hinton agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine 0.5 McFarland standardı kullanılarak eşdeğer bulanıklık yoğunluğunda hazırlanmış direkt koloni süspansiyonu inoküle edilip üzerine antibiyotik duyarlılık test diskleri yerleştirilmiş plaklar, 36±1°C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında disklerin çevresinde saptanan inhibisyon zon çapları milimetre olarak ölçülerek değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yönteminde CIP için ≤15mm, LEV için ≤13mm, TMP-SMZ için ≤10mm olarak saptanan inhibisyon zon çapları dirençli olarak kabul edilmiştir. Kullanılan iki yöntem ile elde edilen veriler duyarlı ve dirençli olarak not edilmiştir. Her iki yöntemde de orta duyarlı değerler dirençli olarak kabul edilmiştir. Tam otomatik mikrobiyoloji identifikasyon ve antimikrobik duyarlılık testlerinde kalite kontrolü için standart suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

4.2.3. Biyofilm modelinin oluşturulması:

Stepanović ve ark. (2007) ve Fu ve ark. (2010) uyguladığı metotla *S. maltophilia* suşlarının biyofilm modeli oluşturulmuştur (59, 60). Suşların triptik soya agar besiyerinde gecelik kültüründen alınan koloniler triptik soy buyyonda iki kez 10dk +4⁰ C'de PBS ile yıkanmış ve triptik soy buyyon ile 10⁸ cfu/ml olacak şekilde dilüe edilerek 96 kuyulu düz tabanlı

polistren hücre kültür plaklarına 100µl eklenmiştir. 24 saat etüvde (37⁰C) kapağı kapatılarak bekletilmiştir. Kontrol kuyularına sadece triptik soy buyyonu konulmuştur. Ertesi gün yapışmayan hücreleri atmak için 3 kez 100µl PBS (pH=7.4) ile yıkanmıştır. Biyofilm fiksasyonu için 1 saat 60⁰C'de inkübe edilmiş ve 100µl kristal viyole ile 15 dk boyanmıştır. Plaklar çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 30dk süreyle 37⁰C'de kurutulmuştur. Boya 150µl %95 etanol ile resolubilize edilerek plak spektrofotometrede 620nm'de okutulmuştur. Ortalama OD değeri; örnek ve kontrollerin ölçülmesi ve bu ölçümlerin 3 kez yapıp ortalamalarının alınması ile tespit edilmiştir. Test sonuçları aşağıdaki hesaplamalar sonucunda belirlenmiştir (11, 60, 61).

Cut off değeri; OD_c

OD_c: negatif kontrolün üzerinde olan 3SD (standart sapma) olarak tanımlanmıştır.

OD_c=Negatif kontrolün ortalama OD+(3x negatif kontrolün SD)

Test örneğinin OD değeri= Suşun optik değerlerinin ortalaması- OD_c

Sonuçların yorumlanması için aşağıdaki yol izlendi;

OD<OD_c ise biyofilm oluşumu yok

OD_c<OD ise biyofilm oluşumu var

İnsan ve hayvan suşları istatistiksel olarak biyofilm oluşturmaları yönünden karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda OD hesaplamalarında değerlendirmeler 1SD ile 4SD arasında derecelendirilerek yapılarak biyofilm pozitifliği ile biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden olan *xanB* varlığı arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

İstatistiksel analizler SPSS 16.0 bilgisayar programında Mann Whitney U testi ve t testi ve ki-kare testi kullanılarak yapılmış p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.2.4. DNA izolasyonu:

DNA izolasyonu için tüm suşlar çözülerek %5 koyun kanlı agara pasajlanarak taze koloni eldesi sağlanmıştır. Sonrasında DNA izolasyonu ticari kit (Mini Bacteria Kit, Invitrogen, USA) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu yapılncaya kadar tüm DNA örnekleri -30⁰C'de saklanmıştır.

4.2.5. Prognozla ilişkili Genlerin PZR ile araştırılması;

Bu amaçla çalışmaya dahil edilen tüm suşlarda antibiyotik direnci, biyofilm ve virulans ile ilgili genlerin varlığı PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Antibiyotik direnci ile ilgili olarak; TMP/SMZ direncinden sorumlu genlerden *sul1* ve *sul2*, kinolon direnci için *qnr1-2* ile *qnr3-4* genleri araştırılmıştır. Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden biri olan *xanB*, virulanstan sorumlu olarak lizozim benzeri etkiden sorumlu proteini ifade eden *orf9* (holin), adezyondan sorumlu fimbrial protein ifadeleyen *smf-1* ve proteaz etkiden sorumlu proteini ifade eden *stmpr-1* genleri PZR yöntemiyle taranmıştır.

PZR karışımı her bir örnek için 25 µl hacim olacak şekilde sırasıyla belirtilen son konsantrasyonlarda; 10x PZR Master mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 2.5 mM MgCl₂ (25 mM), 0.2 mM dNTP (10 mM), DNA template 70 ng/µl, primerler 0.5 µM, 1.5 U Taq DNA polimeraz (500U) kullanıldı. Amplifikasyon koşulları aşağıdaki tabloda gösterilen döngü sayıları ve sürelerinde Arktik Thermal Cyclers (Thermo Fisher Scientific, USA)'da gerçekleştirildi (Çizelge 4.2.5.1).

Çizelge: 4.2.5.1 DNA amplifikasyonu için kullanılan termal döngü programı

| Reaksiyon aşaması | Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|-------------------|----------|------|--------------|
| Ön ısıtma | 95 | 3dk | 1 |
| Denatürasyon | 95 | 25sn | 45 |
| Primer bağlanması | 60 | 1dk | |
| Uzama | 72 | 1dk | |
| Son uzama | 72 | 5dk | 1 |
| Koruma | 4 | oo | |

4.2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Çoğaltılan DNA örneklerinin değerlendirilmesi için %1,5 agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle Tris-Borik asit-EDTA (TBE) 5x stok tampon solüsyonu hazırlanmıştır. Tris-base (Promega) 54g, borik asit (Promega) 27,5g tartılarak EDTA (Promega) (0,5m, PH.8) 20 ml ile toplam hacim 1lt olacak şekilde distile suda çözülmüş ve pH:8'e ayarlanarak oda ısısında saklanmıştır. Hazırlanan bu 5x TBE tamponundan 200ml alınarak distile su ile 1000ml'e tamamlanarak 1x TBE tamponu elde edilmiştir. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez yürütme tamponu olarak hazırlanan bu 1x TBE solüsyonu kullanılmıştır.

Agaroz jel hazırlamak için; 100 ml 1x TBE buffer içerisinde 1,5 gr agarose (Promega) süspanse edilerek hazırlanmıştır. Mikrodalga fırın içerisinde tamamen eriyip şeffaf görüntü elde edilene kadar ısıtıldı. Isıtıldıktan sonra soğutulan agaroz içerisine 8 µl ethidium bromide (10mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, USA) eklenerek jel tarağı yerleştirilmiş jel tabağına dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra jel tarağı çıkartılmış ve jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PZR ürünleri, her bir kuyucuğa 10 µl yüklendikten sonra 180 volt elektrik akımında 60 dk yürütülmüştür.

Elektroforez sonunda elde edilen bant görüntüsü 100 bp moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. 100 bp moleküler ağırlık standardı elektroforez aşamasında örnekler yüklendikten sonra ilk ve son kuyucuklara 5'er µl hacimde eklenmiştir. Moleküler ağırlık standardı hazırlamak için 4 µl distile su, 1 µl jel yükleme tamponu (Thermo Fisher Scientific, USA) ve 1 µl 100 bp moleküler ağırlık standardı (Thermo Fisher Scientific, USA) karıştırılarak hazırlanmıştır. Elektroforez sonrası elde edilen bantlar, G:BOX Chemi XRQ (Syngene) görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

4.2.6 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için "zincir sonlandırma yöntemi" ile çalışılan "Bigdye Terminator cycle sequencing 3.1" kiti kullanıldı. Kullanılan suşların *qnr1-2* gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğalttıktan sonra, kalıp olarak kullanarak, üzerine PCR'da kullanılan primerler ile sekans

PCR işlemi firmanın direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler ABI 3130 (Applied Biosystems) sekans cihazında dizi analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar sekans analiz yazılımına (Sequence Analysis 5.3) göre belirlenmiştir. Böylelikle sekanslanan her bir örnek ile, *qnr1-2* gen dizileri saptandı ve elde edilen diziler GenBank veritabanında bulunan referans diziler ile BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır (62).

4.2.6.1. Dizi Analizi için PZR:

İzolatların *qnr1-2* dizi analizi öncesi kalıp oluşturması için *qnr1-2*'ye özgü spesifik primer (F-5'-AGAAAGTGGTCGACCAGCAG-3') 312 bp'lik bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı Çizelge 4.2.5.1'de belirtilen PZR karışımı ve çizelge 4.2.5.2'de belirtilen ısı döngü cihazı programı kullanılarak DNA dizi analizi için *qnr1-2* gen bölgesi PZR yapıldı.

4.2.6.2. PZR ürünlerinin ön saflaştırılması

Amplifiye edilen DNA dizileri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle koşturulduktan sonra UV altında görüntülendi. Elektroforezde görüntülenen yaklaşık 312 bp'lik temiz bantlar sekans analizi öncesi saflaştırmak için belirlendi. Sekanslamadan önce elde edilen PZR ürününe, bağlanmamış dNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması için “exosap” enzimiyle (Affymetrix, USA) purifikasyon yapıldı. Bunun için:

- 1) 5 µl PCR ürününe 2 µl “exosap” enzimi ilave edilerek;
- 2) Isı döngü cihazında 37°C'de 30 dk (enzim aktivasyonu ısısı), 80°C'de 15 dk (enzim inaktivasyonu ısısı) tutuldu.

4.2.6.3. *qnr1-2* DNA Dizi Analizi

İlk saflaştırmadan sonra kalıp elde etmek için yukarıda anlatılan PZR'da kullanılan primer dizilerinden hem Forward (ileri) hem de reverse (geri) primerler için ayrı ayrı karışımlar hazırlanarak her bir örnek için her bir primer çiftiyle iki PCR yapıldı. Bunun için aşağıda belirtilen karışım BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA) protokolüne göre aşağıda belirtilen hacimlerde hazırlanarak aynı termal döngü cihazına yerleştirildi.

| | | |
|------------|---|------|
| BigDye Mix | : | 2 µl |
| 5x buffer | : | 2 µl |
| PCR ürünü | : | 2 µl |

| | | |
|------------------------------|---|---|
| dH ₂ O | : | 2 µl |
| Primer (F veya R) (3.2 pmol) | : | 2 µl |
| Ön denatürasyon | : | 96 ⁰ C'de 1 dk |
| Amplifikasyon (25 döngü) | : | 96 ⁰ C'de 10 sn denatürasyon, 50 ⁰ C'de 5 sn bağlanma, 60 ⁰ C'de 4 dk polimerizasyon |

Sekans PZR'ının sonunda tekrar purifikasyon yapıldı. Bu purifikasyonun amacı ortamdaki bağlanmayan ddNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bunun için:

1. 1 gr "Sefadex" (toz halde) 13 ml nükleaz free distile su içerisinde süspanse edildi. İyice çalkanan ve çözdürülen sefadex jelöz kıvam aldı.
2. Süspanse sefadex'ten 750 µl kolonların içerisine konuldu. Kolonlar 4600 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Jelin içerisindeki sıvı koleksiyon tüpüne birikti. İçerisinde katılaşmış jel kalan kolon koleksiyon tüpünün içerisine yerleştirildi.
3. Elde edilen sekans PCR ürününün tamamı (10 µl) kolonun içerisindeki katı jelin ortasına, pipet ucu değdirilmeden dikkatlice bırakıldı.
4. 4800 g'de 2 dk santrifüj yapıldı.
5. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı (10 µl) sekanslamada kullanılacak olan örnek olarak elde edildi. Bu sıvının tamamı ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazına yüklenerek elde edilen diziler değerlendirildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

Çalışmaya dahil edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının AGA, β -laktam grubu, kinolon, karbapenem, tetrasiklin, sülfonamid ve monobaktam grubu antibiyotikler için KMD test sonuçları Ekler bölümünde Ek1’de sunulmuştur. Kalitatif mikrodilüsyon test sonuçlarına göre suşların tamamının teste dahil edilen aminoglikozid grubu antibiyotiklere, karbapenemlere, tigesiklin (tetrasiklin), kinolon grubundan CIP’e monobaktam grubu antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte suşların hepsinin TMP-SMZ’e duyarlı olduğu belirlenmiştir. Kinolon grubundan LEV’e suşların %9,7’sinin dirençli olduğu, dirençli olan üç suşunda insan kökenli olduğu tespit edilmiştir. β -laktam grubu antibiyotiklerden seftizidime suşların %77,4’ünün, tikarsilin/klavulonik asite ise %54,8’inin dirençli olduğu belirlenmiştir (Çizelge5.1). İnsan suşlarının %11,7’si (2/17), hayvan suşlarının %28,6’sı (4/14) CAZ duyarlı olarak saptanmış olup hayvan suşlarının daha duyarlı olduğu (p=0.044) dikkat çekmiştir. Aynı şekilde insan suşlarının %29,4’ü (5/17), hayvan suşlarının %57,4’ü (8/14) TIM duyarlı olarak saptanmış olup hayvan suşlarının daha duyarlı olduğu (p=0.044) belirlenmiştir. Tüm suşlar CIP dirençli iken insan suşlarının sadece üçü (%17,6) LEV dirençli saptanmıştır.

Çizelge:5.1. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnç dağılımı

| Antibiyotik | Bakteri N (%) |
|----------------------------|------------------|
| Aminoglikozid grubu | 31 (100) |
| B-laktam grubu | |
| Penisilin türevi ve | 31(100) |
| Sefalosporinler | |
| Seftazidim | 24 (77,4) |
| Tikarsilin/klavulonik asit | 17 (54,8) |
| Kinolon grubu | |
| Siprofloksasin | 31 (100) |
| Levofloksasin | 3 (9,7) |
| Karbapenemler | 31 (100) |
| Tetrasiklin türevi | 31 (100) |
| Sülfonamid | 0 (0) |
| Monobaktam grubu | 31 (100) |

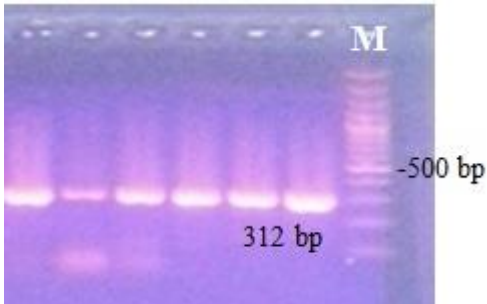
5.2. SÜLFONAMİD VE KİNOLONLARLA İLGİLİ DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TMZ-SMZ, CIP ve LEV için disk difüzyon ve mikrodilüsyon test sonuçları ile direnç genlerinin varlığına ait sonuçlar ise Ek2’de sunulmuştur.

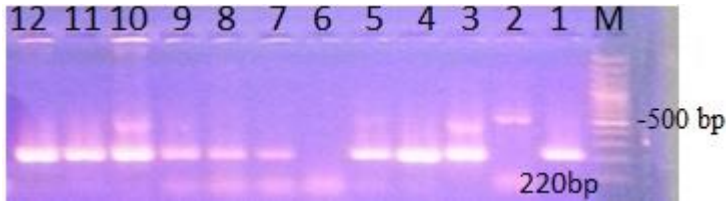
Disk difüzyon testi ile sadece iki insan suşunda TMP-SMZ direnci saptanmış olup bu iki suşta da aynı zamanda *suII* geni negatif iken *suIII* geni pozitif olarak saptanmıştır. *SuII* ve *II* genlerinin saptandığı diğer suşlar TMP-SMZ antibiyotiğine duyarlı olarak tespit edilmiştir. CIP’e insan suşlarının 11’i (%64,7) hayvan suşlarının ise sadece 1’i (%7,1) olmak üzere tüm suşların %38,7’sinde direnç saptanmıştır. LEV’e insan suşlarından sadece ikisi (%11,7) dirençli olup, hayvan suşlarının hepsi duyarlı olarak bulunmuştur. Suşların tamamı gözönüne alındığında LEV direnci %6,4’ünde belirlenmiştir.

Suşların hepsi mikrodilüsyon yöntemi ile sülfonamidlere duyarlı olarak saptanmışken, sulfonamid direncinden sorumlu *suI* geni dört (%12,9), *su2* geni ise üç suşta (%9,7) tespit edilmiştir. *SuI* geninin üçü, *su2* geninin tümü insan izolatlarında belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılığı ile direnç geninin varlığı arasında ilişki tespit edilmemiştir.

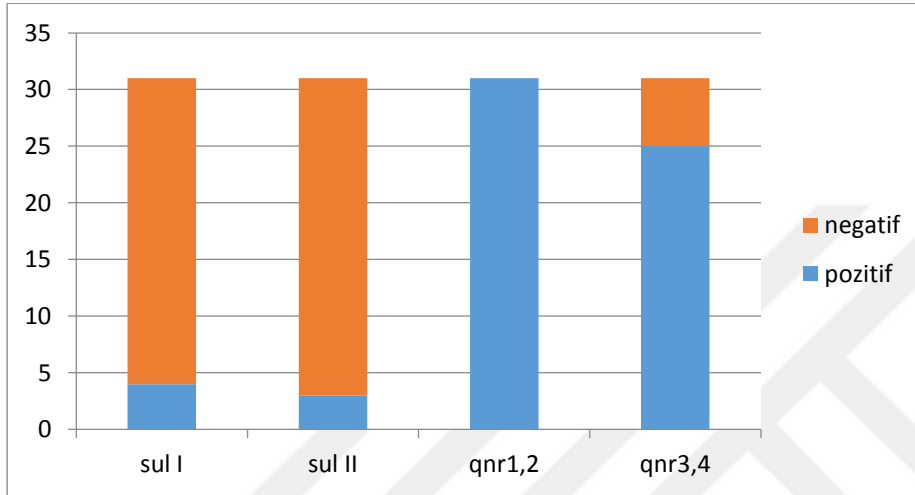
Kinolon grubunda CIP’e tüm suşlar dirençli olup *qnr1-2* genide tüm suşlarda saptanmışken, *qnr3-4* geni suşların %80,6’sında belirlenmiştir. LEV’e duyarlı olan suşların hepsinde hem *qnr1-2*, hem de *qnr3-4* belirlenmiştir (Şekil 5.2.1 ve Şekil 5.2.2). Fenotipik olarak duyarlı olan suşlarda genotipik olarak direnç geni saptandığı gözlenmiştir (Şekil 5.2.3, Şekil 5.2.4).



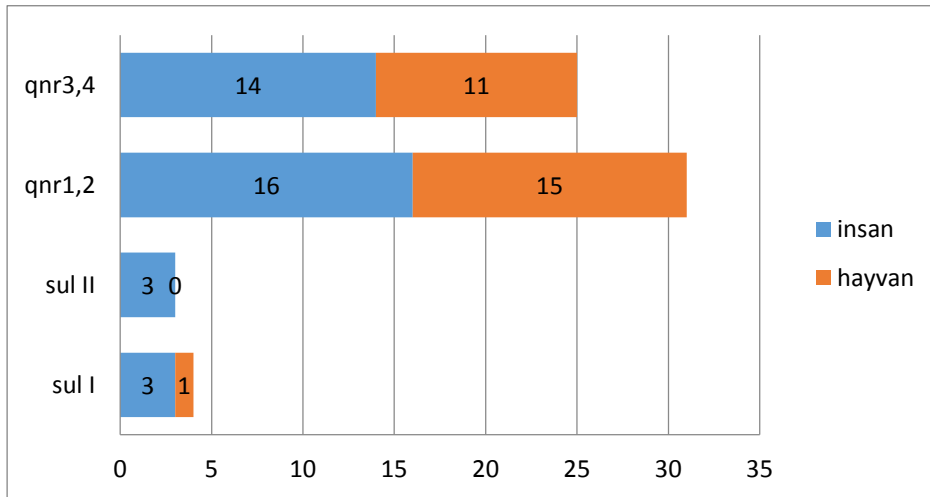
Şekil: 5.2.1. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında saptanan *qnr1-2* genlerinin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü



Şekil: 5.2.2. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında saptanan *qnr3-4* genlerinin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü (Sıra 2 ve 6'daki örnekler negatif)



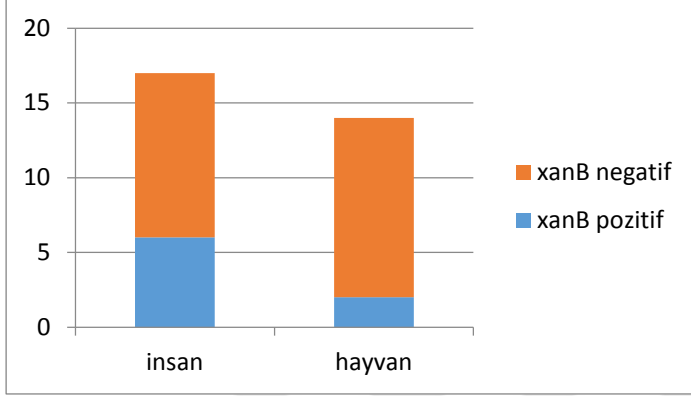
Şekil: 5.2.3. TMP-SMZ (*sul1* ve *sul2*) ve kinolon (*qnr1-2*, *qnr3-4*) direnciyle ilişkili genlerin dağılımı



Şekil:5.2.4. İnsan ve hayvan suşlarında TMP-SMZ (*sul1* ve *sul2*) ve kinolon (*qnr1-2*, *qnr3-4*) direnciyle ilişkili genlerin dağılımı

5.3. BİYOFİLM

Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden biri olan *xanB* geni, 17 insan ve 14 hayvan suşunda PCR ile aranmıştır. Suşların %25,8'inde *xanB* geni varlığı saptanmış olup, insan suşlarının altısında (%35,3), hayvan suşlarının ise ikisinde (%14,3) pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.3.1). Her iki grup arasındaki *xanB* varlığı açısından istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmıştır (Ki-kare, $p=0.008$) (Şekil5.3.1)



Şekil:5.3.1. Biyofilmle ilişkili *xanB* geninin insan ve hayvan suşlarındaki dağılımı

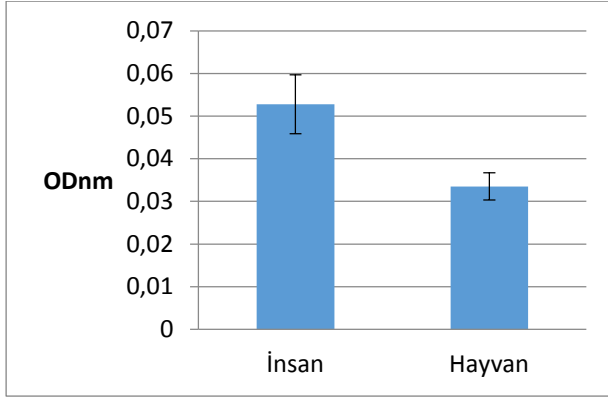
Biyofilm testinde insan ve hayvan suşlarına ait optik dansitelerin (44) değerlerinin ortalamaları t testi ile karşılaştırıldı (Çizelge5.3.2). Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.000$) (Şekil 5.3.2). Çalışmamızda OD hesaplamalarında değerlendirmeler 1SD ile 4SD arasında derecelendirilerek yapıldığında, tüm suşların biyofilm ürettiği saptanırken derecelendirme ile biyofilm pozitifliği açısından suşlar arasında bir ilişki belirlenmedi.

Çizelge: 5.3.1. Biyofilm deneyinde insan ve hayvan suşlarının spektrofotometrik olarak saptanan OD ve SEM değerleri

| | OD (nm) | SEM |
|---------------|---------|---------|
| İnsan | 0,0528 | 0,0069 |
| Hayvan | 0,0335 | 0,00318 |

Çizelge: 5.3.2. Biyofilmden sorumlu olan *xanB* geninin suşlardaki varlığı

| Sayı | Bakteri no | <i>xanB</i> |
|------|----------------|-------------|
| 1. | 21552765 | + |
| 2. | 21551554 | - |
| 3. | 914047 (1815) | - |
| 4. | 21473204 | - |
| 5. | 1099945 (1825) | + |
| 6. | 21557686 | - |
| 7. | 21433536 | - |
| 8. | 21433148 | - |
| 9. | 1733372 (1816) | - |
| 10. | 1721718 (1866) | - |
| 11. | 2136(8)4279 | + |
| 12. | 1715125 (1857) | - |
| 13. | 1043417 (1806) | + |
| 14. | 21393080 | + |
| 15. | 21465621 | - |
| 16. | 1773 | - |
| 17. | 1826 | - |
| 18. | SM23b | - |
| 19. | SM22 | - |
| 20. | SM18 | - |
| 21. | SM16 | + |
| 22. | SM19 | - |
| 23. | SM14 | - |
| 24. | SM7 | - |
| 25. | SM25b | - |
| 26. | SM20 | - |
| 27. | SM419b | - |
| 28. | SM26b | + |
| 29. | SM30 | - |
| 30. | SM34 | - |
| 31. | SM15 | - |
| 32. | SMLMG958 | - |
| 33. | | |



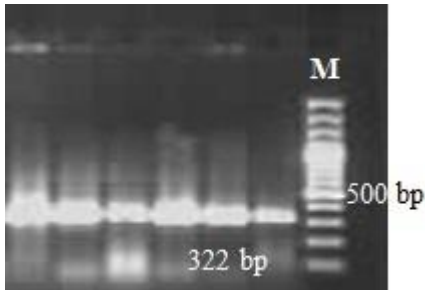
Şekil: 5.3.2. Biyofilm deneyinde insan ve hayvan suşlarının spektrofotometrik olarak saptanan OD ve SEM değerlerinin karşılaştırılması ($p<0.000$)

5.4. VİRULANS GENLERİ

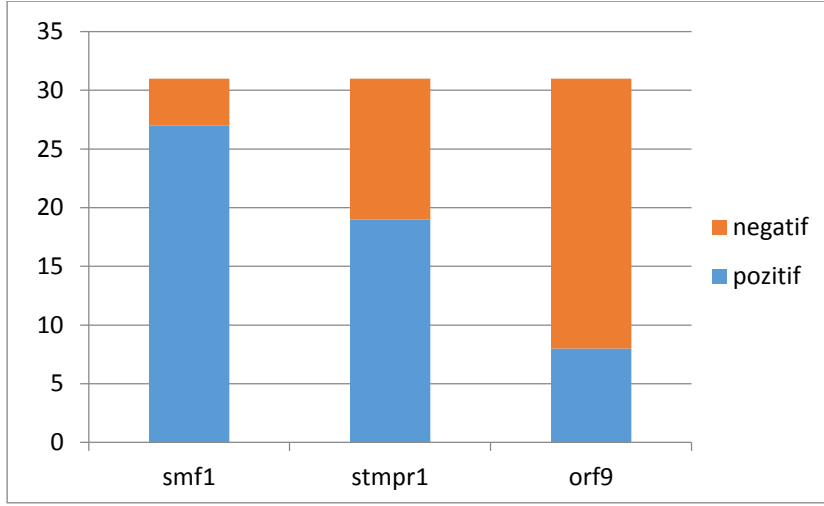
İnsan ve hayvan suşlarında araştırılan fimbrial adezyon proteinini ifadeleyen *smf1* geni (Şekil 5.4.1) suşların %87,1'inde ($n=27$), proteaz proteinini ifadeleyen *stmpr1* geni suşların %61,3'ünde ($n=19$), endolizin etkili holin proteinini ifadeleyen *orf 9* geni ise suşların %25,8'inde ($n=8$) saptanmıştır (Çizelge 5.4) (Şekil 5.4.2)

Çizelge: 5.4. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında saptanan virülans genlerinin dağılımı

| Sayı | Bakteri no | Virülans genleri | | |
|------|----------------|------------------|---------|------|
| | | smf-1 | stmpr-1 | orf9 |
| 1. | 21552765 | + | + | + |
| 2. | 21551554 | + | + | - |
| 3. | 914047 (1815) | + | + | - |
| 4. | 21473204 | + | + | + |
| 5. | 1099945 (1825) | + | + | - |
| 6. | 21557686 | + | - | - |
| 7. | 21433536 | + | + | - |
| 8. | 21433148 | + | + | - |
| 9. | 1733372 (1816) | + | - | - |
| 10. | 1721718 (1866) | + | + | - |
| 11. | 2136(8)4279 | - | + | + |
| 12. | 1715125 (1857) | + | + | - |
| 13. | 1043417 (1806) | + | + | + |
| 14. | 21393080 | + | - | + |
| 15. | 21465621 | + | - | + |
| 16. | 1773 | - | + | - |
| 17. | 1826 | + | - | - |
| 18. | SM23b | + | - | - |
| 19. | SM22 | + | - | - |
| 20. | SM18 | - | + | - |
| 21. | SM16 | + | - | - |
| 22. | SM19 | + | + | - |
| 23. | SM14 | + | - | - |
| 24. | SM7 | + | + | + |
| 25. | SM25b | + | + | - |
| 26. | SM20 | + | + | - |
| 27. | SM419b | + | + | + |
| 28. | SM26b | + | - | - |
| 29. | SM30 | - | - | - |
| 30. | SM34 | + | - | - |
| 31. | SM15 | + | + | - |
| 32. | SMLMG958 | + | + | - |

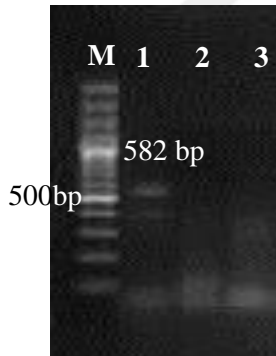


Şekil: 5.4.1. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında saptanan *smf-1* geninin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü

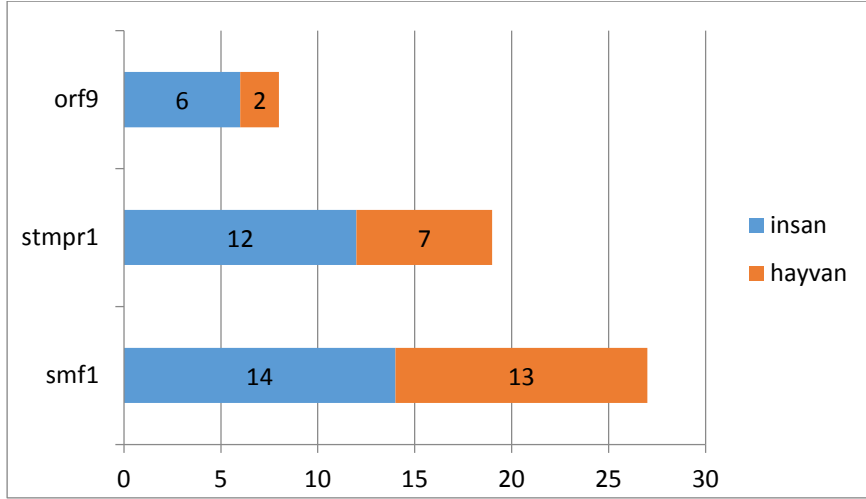


Şekil: 5.4.2. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında virulansla ilişkili genlerin dağılımı

İnsan ve hayvan suşları arasında virulans genlerinin varlığı açısından istatistiksel fark sadece *orf9* geninde saptanmıştır ($p=0,008$). İnsan kökenli suşların %35,3'ünde, hayvan kökenli suşların ise %14,3'ünde *orf9* geni tespit edilmiştir (Şekil 5.4.3, Şekil 5.4.4)



Şekil: 5.4.3. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında saptanan *orf-9* geninin agaroz jeldeki amplikon görüntüsü (Sıra 1: pozitif, Sıra 2 ve 3 negatif)



Şekil: 5.4.4. İnsan ve hayvan *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında virulansla ilişkili genlerin dağılımı

5.5. DNA DİZİ ANALİZİ

Yoğun bakımdan izole edilen dört suşun qnr1-2 genine ait aşağıda sunulan sekans dizileri referans suşla karşılaştırılarak, NCBI web sitesinde BLAST analizi yapılmıştır. Belirlenen nükleotid bazında değişiklik gösterenler kırmızı ile işaretlenmiştir.

Suş no:1857

Stenotrophomonas maltophilia strain C048 Qnr (qnr) gene, complete cds
Sequence ID: [gb|EU681377.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/EU681377.1) Length: 660 Number of Matches: 1

```

Query 1 TCATCAAGAAGTCGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGGGGTAACGCTGGAAAAGTGCG 60
|||||
Sbjct 359 TCATCAAGAAGTCGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGGGGTAACGCTGGAAAAGTGCG 418

Query 61 AGCTGTGGGAAAATCGATGGGATGGCGGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGG 120
|||||
Sbjct 419 AGCTGTGGGAAAATCGATGGGATGGCGGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGG 478

Query 121 ACCTGTCCGGCGCCAGTTCGAGGGCATCGACTGGAACAGCGCCAACACTACACCGACTG 179
|||||
Sbjct 479 ACCTGTCCGGCGCCAGTTCGAGGGCATCGACTGG-AACAGCGCCAACACTACACCGACTG 536

```

Bu dizi analizi referans genomla karşılaştırıldığında aşağıdaki mutasyonlar saptanmıştır:

c.432 bölgesinde C>T transisyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 144.kodonda N144N sense (anlamli) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.527 bölgesinde T>A transversiyonu (TTC-TAC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak, 176.kodonda homozigot olarak F176Y missense (yanlış anlamlı) mutasyonu saptanmıştır. Fenilalanin ile tirozin aminositleri yer değiştirmiştir.

Suş no: 1816

Stenotrophomonas maltophilia strain C048 Qnr (qnr) gene, complete cds
Sequence ID: [gb|EU681377.1](#)|Length: 660|Number of Matches: 1

```
Query 1 TCAAGAAGTCGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTAACGCTGGAAAAGTGGGAGC 60
|||||
Sbjct 362 TCAAGAAGTCGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTAACGCTGGAAAAGTGGGAGC 421

Query 61 TGTGGGAAAAATCGATGGGATGGCGCGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGGACC 120
|||||
Sbjct 422 TGTGGGAAAAATCGATGGGATGGCGCGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGGACC 481

Query 121 TGTCCGCGGCCAGTTCGAGGGCATCGACTGGAACAATAGCCAACTACACCGACTG 175
|||||
Sbjct 482 TGTCCGCGGCCAGTTCGAGGGCATCGACTGGAACAATAGCCAACTACACCGACTG 536
```

Bu dizi analizi referans genomla karşılaştırıldığında aşağıdaki mutasyonlar saptanmıştır:

c.402 bölgesinde A>C transversiyonu (GTA-GTC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 134.kodonda V134V sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.414 bölgesinde G>A transisyonu (AAG-AAA) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 138.kodonda K138K sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.420 bölgesinde G>A transisyonu (GAG-GAA) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 140.kodonda E140E sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.435 bölgesinde A>C transversiyonu (CGA-GCG) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 145.kodonda R145R sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.441 bölgesinde T>C transisyonu (GAT-GAC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 147.kodonda D147D sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.444 bölgesinde C>T transisyonu (GGA-GGC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 148.kodonda G148G sense(anlamlı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.450 bölgesinde T>C transisyonu (AAT-AAC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 150.kodonda N150N sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.453 bölgesinde G>C transversiyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 151.kodonda V151V sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.456 bölgesinde T>C transisyonu (AGT-AGC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 152.kodonda S152S sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.474 bölgesinde A>C transversiyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 158.kodonda G158G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.489 bölgesinde C>T transisyonu (GGC-GGT) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 163.kodonda G163G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.527 t>a ttc-tac F176Y missense (kayıp) mutasyonu ile aminoasit değişikliği meydana gelmiştir. Fenilalanin ile tirozin aminositleri yer değiştirmiştir.

Suş no: 1866

Stenotrophomonas maltophilia Smqnr54 gene for quinolone protection protein 54, complete cds, strain: D-S31
Sequence ID: [dbj|AB905279.1](https://dbj.dsl.ac.jp/AB905279.1)|Length: 660|Number of Matches: 1

```
Query 1 CGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTAACGCTGGAAAAGTGCAGACTGTGGGAAA 60
|||||
Sbjct 371 CGAACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTAACGCTGGAAAAGTGCAGACTGTGGGAAA 430

Query 61 ATCGATGGGATGGCGCGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGGACCTGTCCGGCG 120
|||||
Sbjct 431 ATCGATGGGATGGCGCGAATGTGAGTGGCGCCAGCTTCGCCGGATCGGACCTGTCCGGCG 490

Query 121 GCCAGTTCGAGGGCATCGACTGGAACA TAGCCAACTACACCGACTG 166
|||||
Sbjct 491 GCCAGTTCGAGGGCATCGACTGGAACA GCGCCAACTTACACCGACTG 536
```

Bu dizi analizi referans genomla karşılaştırıldığında aşağıdaki mutasyonlar saptanmıştır:

c.432 bölgesinde C>T transisyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 144.kodonda N144N sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

Suş no: 21473204

Stenotrophomonas maltophilia strain 28 Qnr-like gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|HQ711556.1](#)|Length: 593|Number of Matches: 1

```
Query 1 AACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTCACGCTGGAG-AATGCGAACTGTGGGA AAC 59
|||||
Sbjct 340 AACCTGCGCTATGCCAATTTCTCGCGGGTCACGCTGGAGAAATGCGAACTGTGGGA AAC 399

Query 60 CGCTGGGACGGTGC GAACGTCAGCGCGCCAGCTTCGCCGGCTCGGACCTGTCCGGTGGC 119
|||||
Sbjct 400 CGCTGGGACGGTGC GAACGTCAGCGCGCCAGCTTCGCCGGCTCGGACCTGTCCGGTGGC 459

Query 120 CAGTTCGAGGGAATCGACTGGAACAGCGCCAAC TACCCGACTG 163
|||||
Sbjct 460 CAGTTCGAGGGAATCGACTGGAACAGCGCCAAC TACCCGACTG 503
```

Bu dizi analizi referans genomla karşılaştırıldığında aşağıdaki mutasyonlar saptanmıştır:

c.402 bölgesinde A>C transversiyonu (GTA-GTC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 134.kodonda V134V sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir

c.411 bölgesinde A>G transisyonu (GAA-GAG) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 137.kodonda E137E sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.414 bölgesinde G>A transisyonu (AAG-AAA) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 138.kodonda K138K sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.420 bölgesinde G>A transisyonu (GAG-GAA) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 140.kodonda E140E sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.435 bölgesinde A>C transversiyonu (CGA-GCG) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 145.kodonda R145R sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.441 bölgesinde T>C transisyonu (GAT-GAC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 147.kodonda D147D sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.444 bölgesinde C>T transisyonu (GGA-GGC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 148.kodonda G148G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir

c.450 bölgesinde T>C transisyonu (AAT-AAC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 150.kodonda N150N sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.453 bölgesinde G>C transversiyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 151.kodonda V151V sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir

c.456 bölgesinde T>C transisyonu (AGT-AGC) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 152.kodonda S152S sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.474 bölgesinde A>C transversiyonu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 158.kodonda G158G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

c.489 bölgesinde C>T transisyonu (GGC-GGT) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 163.kodonda G163G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir

c.504 bölgesinde C>A transversiyonu (GGC-GGA) saptanmıştır. Buna bağlı olarak 168.kodonda G168G sense(anlamalı) mutasyonu homozigot olarak gözlenmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Stenotrophomonas maltophilia enfeksiyon sıklığının araştırıldığı 1997-2003 yıllarında yürütülen SENTRY antimikrobiyal sürveyans çalışmaları kapsamında enfeksiyon sıklığı %0,8-1,4 oranında rapor edilmişken, 2007-2012 yıllarındaki CANWARD ve SENTRY antimikrobiyal sürveyans çalışmalarında bu oran %1,3-1,68 olarak saptanmıştır. Bu bulgular genel popülasyonda *S. maltophilia* enfeksiyon sıklığının giderek artış göstermeye eğilimli olduğuna işaret etmektedir. Çok ilaca dirençli olan bu bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisi önemli bir sorun olarak tartışılmaktadır. Dünyada en yaygın seçenek olarak kullanılan TMP-SMZ için az sayıda da olsa dirençli izolatların olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Aynı zamanda uzun yıllardır *S. maltophilia* enfeksiyonlarında kullanılan CAZ, TIM ve kinolonlar için de direnç gelişiminin rapor edilmesi, tedavi yaklaşımlarının gözden geçirilmesi gerektiğine işaret etmektedir (13, 18, 63).

Stenotrophomonas maltophilia suşlarında görülen doğal (yapısal, intrinsik) direnç, beta-laktamaz ve eflüks pompalarını kodlayan genler, aminoglikozid transferaz ve eritromisini inaktive eden enzimlerle ortaya çıkmakta ve çoklu antibiyotik direncine neden olmaktadır. Bu durum *S. maltophilia* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde büyük zorluklara neden olmaktadır. Yapısal direnç nedeniyle *S. maltophilia*'ya karşı in vitro olarak etkili görünse de tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneği çok kısıtlıdır. Bazı antimikrobik ilaçların kullanımı da intrinsik dirence yol açmaktadır. Bu duruma örnek olarak saptanmıştır (6, 18). *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde, in vitro duyarlılık çalışmalarına göre TMP-SMZ, en başarılı seçenek olarak bulunmuştur. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları farklı olmakla birlikte genel olarak *S. maltophilia* suşlarının %90'dan fazlasının TMP/SMZ'ye duyarlı olduğu bildirilmektedir (63). TMP/SMZ, *S. maltophilia*'ya karşı en etkili seçenek olmakla birlikte son zamanlarda bu ilaca karşı direncin ortaya çıktığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (14, 33). Türk Dağı ve ark. çoğunlukla pediatrik hastalara ait kan kültürlerinden izole ettikleri izolatlarda en etkili antibiyotiklerin %10 direnç ile TMP-SMZ ve % 20 direnç oranı ile LEV olduğu saptanmıştır. TMP-SMZ'e dirençli olan bütün suşların LEV'e de dirençli olduğu

belirlenmiştir (64). Cho ve ark. hematolojik maligniteli 31 hastanın kan kültüründen izole ettikleri *S. maltophilia* suşunun mikrodilüsyon yöntemiyle saptadıkları antibiyotik duyarlılıklarını seftazidim için %11,1, LEV için %44,0, tikarsilin-klavulonik asit için %40,7 ve TMP-SMZ için %88,9 olarak belirlemişlerdir (65). Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemine göre duyarlılık oranları seftazidim için %22,6, LEV için %90,3 tikarsilin-klavulonik asit için %45,2 ve TMP-SMZ için %100 olarak saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda insan ve hayvan kökenli suşların tümünün TMP-SMZ'ye duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hastanemizde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak sık rastlanan *S. maltophilia* suşlarının tedavisi açısından büyük bir şans yaratmaktadır. Hastanemizde yapılan bir çalışmada nozokomiyal etkenlerin %1,6'sını *S. maltophilia*'nın oluşturduğu ve en etkili tedavi seçeneğinin TMP-SMZ olduğu bildirilmiştir. Dizbay ve ark. yaptıkları bu çalışmada 89 izolatu incelemişler ve disk difüzyon yöntemiyle TMP-SMZ direnç oranını %21,9 olarak belirlemişlerdir. İlginç olarak CIP direnci suşların %22,5'inde saptanmıştır (66). Bizim çalışmamızda suşların tümü CIP'e dirençli bulunmuş, LEV'e karşı hayvan suşlarının hepsi duyarlı iken 17 insan suşunun üçünde direnç görülmüştür. Kombine veya alternatif tedavi açısından bir seçenek olarak LEV kullanımı tedavi şansı yaratmaktadır. Bununla birlikte gen düzeyinde direnç araştırıldığında TMP-SMZ direncinden sorumlu sorumlu *sul1* geni dört (%12,9), *sul 2* geni ise üç suşta (%9,7) tespit edilmiştir. *Sul1* geninin üçü, *sul2* geninin tümü insan izolatlarında belirlenmiştir. *Sul1* geni sınıf 1 integronunun varlığına işaret etmekte olup, integron taşıyan bakterilerin çoklu direnç gösterme potansiyeli bulunmaktadır (9). Toleman ve ark. (2007) *sul 1* genini TMP-SMZ dirençli suşların %64,7'sinde tespit etmişlerdir (2). Bizim suşlarımızın hepsi TMP-SMZ'e duyarlı iken *sul1* ve *sul2* genlerinin tespit edilmesi Toleman ve ark. (2007) çalışmasında olduğu gibi fenotipik olarak saptanan antibiyotik direnç veya duyarlılığının gen düzeyinde saptanan sonuçlarla bir tutarlılık göstermediğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda *sul1* geninin TMP-SMZ dirençli suşlarda büyük oranda belirlenmesinin yanısıra, bazı çalışmalarda bizim bulgularımızı da destekler şekilde TMP-SMZ duyarlı suşlarda da *sul1* geninin saptandığı belirtilmiştir (67). Hu ve ark. bu oranı çalıştıkları suşlarda %26,4, Song ve ark. ise %14,8 olarak belirlemişlerdir (68, 69). Bizim çalışmamızda ise bu oran %12,9 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda kinolon grubu için dirençten sorumlu *qnr1-2* geni tüm suşlarda saptanmışken, *qnr3-4* geni suşların %80,6'sında belirlenmiştir. Suşların tümü CIP'e dirençli olarak bulunmuştur. Bu durumda CIP dirençliliği ile direnç genlerinden özellikle *qnr1-2* arasında kuvvetli bir tutarlılık olduğu belirlenmiştir. LEV'e duyarlı olan suşların hepsinde hem *qnr1-2*, hem de *qnr3-4* belirlenmiştir (Şekil 5.2.1 ve Şekil 5.2.2). Plazmid kaynaklı olan *qnr1-2* varlığı hastane ortamında direncin aktarılmasında ve yayılmasında önemlidir. Fenotipik olarak duyarlı olan suşlarda genotipik olarak direnç geni saptandığı gözlenmiştir. Antibiyotik duyarlılığı ile direnç geninin varlığı arasında ilişki tespit edilmemiştir. Bu durum hasta takibinde antibiyotik duyarlılık testleriyle birlikte direnç gen profillerinin de belirlenmesinin önemli olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte *S. maltophilia* için antibiyotik duyarlılık testlerinde in vitro duyarlılık saptanması iyi standardize edilmiş bir yöntem arayışı devam etmektedir. CLSI, agar veya buyyon dilüsyon testlerini duyarlılık belirlenmesinde önermektedir. Bu rehberde göre LEV, minosiklin ve TMP-SMZ antibiyotikleri için disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyon sınır değerlerini belirlenmiştir (34). EUCAST ise *S. maltophilia* için sadece TMP-SMZ için disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyon için sınır değerlerini bildirmiştir (35). Nicodemo ve ark. çalışmalarında TMP-SMZ, doksisisiklin, gatifloksasin, kloramfenikol ve tikarsilin-klavulanat için agar dilüsyon, E-test ve disk difüzyon metodunu karşılaştırmışlar ve yöntemler arasında uyumluluğun mükemmel olduğunu gözlemlemişlerdir (70). Kinolon, özellikle CIP direncinin disk difüzyonla saptamasının sorun oluşturabileceği ifade edilmiştir (71). Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına ve klinik gözlemlere göre TMP-SMZ, *S. maltophilia* infeksiyonlarının tedavisi için en uygun seçenek olarak görülmektedir. Bununla birlikte bu konuda etkili antibiyotik tedavisi ve süresini kapsayan kontrollü klinik bir çalışma yoksunluğu hissedilmektedir. Diğer tedavi seçenekleri olarak tikarsilin-klavulanat, kinolonlar, tigesiklin ve kloramfenikol de bulunmaktadır (6, 63). Son yıllarda bildirilen direnç oranlarına rağmen bizim çalışmamızda izole edilen suşlarımızın tamamı TMP-SMZ'e duyarlı bulunmuştur (66). Antibiyotik seçeneğinin sınırlı olduğu *Stenotrophomonas maltophilia* infeksiyonlarıyla birlikte diğer dirençli nonfermentatif bakteri enfeksiyonlarında kinolonlar önemli bir tedavi alternatifi olarak kullanılmaktadır.

Stenotrophomonas maltophilia karbapenemlere yapısal olarak dirençli olup sefalosporin grubu antibiyotiklere de beta-laktamaz üretiminedeniyle sınırlı duyarlılığı bulunduğu için bu antimikrobiklerin ampirik tedavide kullanımları önerilmemektedir. Çalışmamızda da suşların tümünün karbapenemlere direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yine çalışmamızda yer alan aminoglikozid ve monobaktam grubu antibiyotiklere de suşlarının hepsinin dirençli olduğu belirlenmiştir. Gazi Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada nozokomiyal *S.maltophilia* suşlarında disk difüzyon yöntemi ile imipenem direnci % 79.8, seftazidim direnci % 45.1 olarak saptanmıştır (66). Türk Dağı ve ark (2011) imipenem direnci % 100, seftazidim direnci % 78 ve sefotaksim direnci % 98 olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar üçüncü kuşak sefalosporin direncini oldukça yüksek oranda bulmuşlardır. Karbapenemlerin ve sefalosporinlerin yatan hastalarda ampirik tedavide sık kullanımının bu ilaçlara dirençli suşların seçilmelerine sebep olabileceği ileri sürülmüştür (64).

Beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları Gram negatif basillerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Türk Dağı ve ark (2011) % 80 oranında direnç belirlemişlerdir (64). Bizim çalışmamızda CAZ ve TIM dışında suşların tümünde β -laktam antibiyotiklere direnç saptanmıştır. Seftazidime suşların %77,4'ü, TIM'e ise %54,8'inin dirençli olduğu belirlenmiştir. Seftazidime insan suşlarının %11,7'si (2/17), hayvan suşlarının %28,6'sı (4/14) duyarlı iken TIM için bu oran insan suşlarında %29,4 (5/17), hayvan suşlarında ise %57,1 (8/14) olarak tespit edilmiştir. Hayvan suşlarının her iki antibiyotik için de insan suşlarından daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Dizbay ve ark. (2009) TMP-SMZ, CIP ve sefoperazon-sulbaktamın toplam 89 nozokomiyal *S. maltophilia* olgusu için en etkili antimikrobiyaller olduğunu saptamışlardır. *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonları en sık yoğun bakım üniteleri ve hematoloji bölümünde gözlenmiştir. Pnömoniler en sık saptanan nozokomiyal enfeksiyon olmuştur; bunu kan dolaşımı enfeksiyonları takip etmiştir. Kaba mortalite oranı %50.6 olarak belirlenmiştir. Bu durumun hastanede uzun süre yatış, ileri yaş, pnömöni varlığı, yoğun bakım ünitesinde yatış, invaziv girişimlerin uygulanması gibi faktörlere bağlı olarak anlamlı derecede yüksek saptandığı belirlenmiştir (66).

Tekin ve ark. (2014) ise çalıştıkları izolatlarda suşların CIP ve LEV için duyarlılıkları sırasıyla %73, %75, TMP-SMZ için ise %57 olarak belirlemişlerdir. Farklı hasta

örneklerinin çalışılması hem de duyarlılık testinde disk difüzyon yönteminin kullanılması nedeniyle sonuçlardaki farklılığın olabileceği düşünülmektedir (33).

Ankara'da bir diğer hastanede 205 izolatla yapılan çalışmada suşların %28,3'ünde kotrimoksazol direnci saptanmıştır. Diğer antibiyotiklere dirençin bu oranın çok daha üzerinde olduğu belirlenmiştir. İzolatların genotip çalışmalarında yüksek genetik heterojenite olduğu, aynı hastanın farklı örneklerinden izole edilen suşlarda bile genetik farklılık belirlenmiştir (20).

Çoğunluğunu solunum yolu örneklerinin oluşturduğu 566 *S. maltophilia* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmada *S. maltophilia* suşların, %7,2'si (n=41) trimetoprim-sulfametoksazol'e, %11,5'i (n=65) levofloksasine ve % 53,5'i (n=303) seftazidime orta duyarlı veya dirençli olarak saptanmıştır (73). Samonis ve ark. (2012) hastane kökenli 68 *S. maltophilia* suşların %80'den fazlasını kolistin, TMP-SMZ, CIP, AGA duyarlı %26,5'i ise CAZ ve TIM duyarlı olarak saptadıklarını belirtmişlerdir (73).

Doğada yaygın olarak bulunan *S. maltophilia* insan enfeksiyonlarının yanısıra hayvanlarda da yara enfeksiyonlarından, kronik solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte lenfadenit, artrit, pnömoni ve sepsis olgularından da izole edilmektedir. Ülkemizde veteriner hekimliği alanında *S. maltophilia* konusunda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. İç Anadolu bölgesindeki beş merkezden at (burun), sığır (burun, tırnak) ve koyunlardan (burun, tırnak) toplanan 362 örneğin %24'ünden (n=87) *S. maltophilia* izole edildiği bildirilmiştir. Tüm suşlar TMP-SMZ, CIP ve LEV duyarlı, imipeneme dirençli olarak bulunmuştur. Diğer antibiyotiklere farklı hayvan suşları farklı dirençlilik göstermişlerdir. Araştırmacılar suşların antibiyotik dirençliliklerinin literatürde bildirilen insan suşlarına göre daha az olduğunu saptamışlardır (74)

Nicoletti ve ark. (2011) virulans ile ilişkili adezyon ve biyofilm oluşumunda rol oynayan tip 1 fimbria (*smf-1*) majör hücre dışı proteaz (*StmPr1*) ve esteraz (*Smlt3773*) ifade eden genleri PZR ile araştırmışlardır. Çalışmaya dahil edilen klinik kaynaklı izolatlarda *smf-1* varlığını gösterirken, çevre kaynaklı kökenlerde bu genin varlığı tespit edilememiştir (21). Bizim çalışmamızda da insan kökenli suşların %88,2'sinin *smf1* içermesi virulansta önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda biyofilm oluşumunda sorumlu genlerden biri olan *xanB* geni suşların %25,8'inde saptanmış olup, insan suşlarının altısında (%35,3), hayvan suşlarının ise ikisinde (%14,3) pozitif olarak belirlenmiştir. Her iki grup arasındaki *xanB* varlığı açısından istatistiksel fark anlamlı olarak saptanmıştır. Biyofilm oluşumunun moleküler mekanizması *S. maltophilia* için henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (11). Pompilio ve ark (2011) biyofilm oluşumu ile *rpfF*, *rmlA* ve *spgM* varlığı arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında *spgM* geni ile biyofil oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki tespit etmişlerdir. Günümüze kadar *S. maltophilia* ait biyofilm oluşumuyla ilgili az sayıda gen ve biyokimyasal yolak hakkında çalışma yapılmıştır. Bu konuyla ilgili olarak polisakkarid senteziyle ilişkili *rmlA*, *rmlC* ve *xanB*, hücre-hücre iletişimi sağlayan diffüze olabilen sinyal faktörü, küçük RNA düzenleyici Hfq ve ABC-tipi eflüks pompası MacABC tanımlanmıştır. Kang ve ark. (75) çalışmalarında biyofilm oluşumunun sıkı kontrol mekanizmaları altında karmaşık bir süreçle gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar FsnR (orphan response regülâtör) proteininin flajella tutunması, hücre hareketi ve biyofilm oluşumu sırasında düzenleyici protein olarak büyük rol üstelendiğini belirtmişlerdir.

Stenotrophomonas maltophilia'nin virulans genlerinden biri olan ve hücre dışı enzimlerinden proteazı ifadeleyen *stmpr1* için araştırmacılar iki farklı primer kullandıklarında farklı sonuçlar (%73; %21) elde ettiklerini ve bu durumun yapılan DNA dizi analizi sonucunda çoğu klinik izolatın K279a genomunda alellik farklılığı gösterdiğini belirlemişlerdir. Esteraz aktivitesini klinik izolatların %90'ında tespit etmişlerdir. *Galleria mellonella* larvasında izolatlarla oluşturdukları enfeksiyon modelinde proteaz ve esteraz ifade düzeyini belirlemeye çalışmışlar ve *stmpr1*'in etkili bir virulans faktörü olabileceğini, esterazın ise virulans potansiyelini göremediklerini belirtmişlerdir (21). Çalışmamızda *smf1* geni izolatların %87'inde, *stmpr1* geni %61,3'ünde *orf9* geni ise %25,8'inde saptanmıştır. İnsan ve hayvan suşları arasında virulans genlerinin varlığı açısından istatistiksel fark sadece *orf9* geninde saptanmıştır ($p=0,008$). İnsan kökenli suşların %35,3'ünde, hayvan kökenli suşların ise %14,3'ünde *orf9* geni tespit edilmiştir. Suşların insan kaynaklı suş olmaları ve ÇİD olmalarının bu virulans faktörlerini taşımalarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışmada insan ve hayvan kökenli çok ilaca dirençli *S. maltophilia* suşlarında prognozu etkileyen genetik karakterlerden sülfonamid ve kinolonlara direnç, biyofilm ve virulans genleri araştırılmıştır. Kalitatif mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde tüm suşların TMP-SMZ'e duyarlı, kinolonlardan CIP'e tüm suşların dirençli, LEV'e ise çoğunun yüksek duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte CAZ için %77,4, TIM için %54,8 oranında direnç görülmesi tedavide alternatif ilaç seçeneklerinin kısıtlılığı konusunda endişe yaratmaktadır. İnsan suşlarının hayvan suşlarına göre CAZ ve TIM için duyarlılıkları daha düşük olarak saptanmıştır. Fenotipik olarak duyarlı olan suşların, bu özelliklerinin genotipe tam olarak yansımadağı tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle *sul1,2* ile *qnr1-2*, *qnr3-4* genlerinin literatürle uyumlu olarak sülfonamid ve kinolonlara direncin saptanmasında fenotipik direnç ile paralel sonuçlar alınamadığından bir belirteç olarak kullanılmasının faydalı olamayacağı düşünülmektedir. Genlerinin varlığının direncin varlığına işaret etmediğı, bu durumun genlerin ekspresyonu ile ilişkisinin olabileceğı kanısını doğurmaktadır. Bu nedenle fenotipik direncin gen düzeyinde belirlenmesinde, kullanılan bu genlerin PZR ile gösterilmesiyle uygun olmayacağı, direncin başka gen bölgelerinden kaynaklanabileceğı veya başka direnç mekanizmalarıyla ilişkili gen bölgelerinin kontrolünde olabileceğı düşünülmektedir.

Biyofilm ile antibiyotik dirençliliğı arasında kuvvetki ilişki olduğunun gözlenmesi ve biyofilm yapan suşların %87,1'de *smf-1* saptanmasının klinik örneklerden izole edilen suşlarda *smf-1* gen belirlenmesinin prognoz açısından anlamlı olabileceğı düşünülmektedir. Çalışmamızda OD hesaplamalarında değerlendirmeler 1SD ile 4SD arasında derecelendirilerek yapıldığında, tüm suşların biyofilm ürettiğı saptanırken derecelendirme ile biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden biri olan *xanB* varlığı arasında bir ilişki belirlenemedi.

Sürekliğı olan sürveyans çalışmaları ile farklı coğrafik bölgelerdeki *S. maltophilia* suşlarında antibiyotik direnç durumlarının izlenmesinin büyük önemi vardır. Böylece uygun antibiyotik tedavi programı geliştirilebilecektir. Hastaneye ait antibiyotik direnç profilinin ortaya çıkarılması etkili tedavinin en kısa sürede başlanabilmesi morbidite ve mortalite oranlarının düşürülmesi için faydalı yaklaşımlardır.

Halen çok az antibiyotik için duyarlılık test standardizasyonu belirlenmiş olan bu bakterinin antibiyotik direncinin moleküler olarak da saptanmasının tedavi planlanmasında fayda sağlayacağı kanısına varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev. 2012;**25**(1):2-41.
2. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. Emerg Infect Dis. 2007;**13**(4):559-65.
3. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Intern J Syst Bacteriol (IJSB). 1993;**43**(3):606-9.
4. Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nat Rev Microbiol. 2009;**7**(7):514-25.
5. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, et al. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrobl Agents Chemother 2004;**48**(2):666-9.
6. Sanchez MB, Martinez JL. The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobl Agents Chemother. 2015;**59**(7):4347-8.
7. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, 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):R74.
8. de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, et al. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. Cell Microbiol. 2003;**5**(9):625-36.
9. Liaw SJ, Lee YL, Hsueh PR. Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase

(SpgM), and melanin and biofilm formation. Intern J Antimicrob Agents. 2010;**35**(2):126-30.

10. Huang TP, Somers EB, Wong AC. Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol. 2006;**188**(8):3116-20.

11. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. BMC Microbiol. 2011;**11**:159.

12. Rocco F, De Gregorio E, Colonna B, Di Nocera PP. *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: a start-up comparison. Int J Med Microbiol. 2009;**299**(8):535-46.

13. Fedler KA, Biedenbach DJ, Jones RN. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. Diag Microbiol Infect Dis. 2006;**56**(4):427-36.

14. Gallo SW, Figueiredo TP, Bessa MC, Pagnussatti VE, Ferreira CA, Oliveira SD. Isolation and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a Brazilian Hospital. Microb Drug Resist. 2016 Mar 23.

15. Juhasz E, Pongracz J, Ivan M, Kristof K. Antibiotic susceptibility of sulfamethoxazole-trimethoprim resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung. 2015;**62**(3):295-305.

16. Berg G, Martinez JL. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? Front Microbiol 2015;**31**(6):241

17. Başustaoğlu A. (çev editorü) Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology). Ankara: Atlas; 2009.

18. Gherardi G, Creti R, Pompilio A, Di Bonaventura G. An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2015;**81**(3):219-26.
19. Caylan R, Kaklikkaya N, Aydin K, et al. An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a university hospital. *Jpn J Infect Dis*. 2004;**57**(2):37-40.
20. Gulmez D, Hascelik G. *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2005;**11**(11):880-6.
21. Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *IJMM*. 2011;**301**(1):34-43.
22. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010;**51** Suppl 1:S81-7.
23. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM. Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol*. 2014;**4**:232.
24. Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front Microbiol*. 2015;**6**:893.
25. Ferrer-Navarro M, Torrent G, Mongiardini E et al. Proteomic analysis of outer membrane proteins and vesicles of a clinical isolate and a collection strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Proteomics*. 2016; **16**:142:122-9.
26. Tunger O, Vural S, Cetin CB, et al. Clinical aspects and risk factors of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia episodes in a Turkish intensive care unit. *J Chemother*. 2007;**19**(6):658-64
27. Güriz H, Çiftçi E, Ayberkin E et al. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in Turkish children. *Ann Trop Paediatr* 2008;**28**(2):129-36

28. Mutlu M, Yılmaz G, Aslan Y et al. Risk factors and clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in neonates. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(6):467-72
29. Tekçe YT, Erbay A, Cabadak H, Sen S. Tigecycline as a therapeutic option in *Stenotrophomonas maltophilia* infections. J Chemother. 2012; 24(3): 150-154
30. Demiraslan H, Sevim M, Pala Ç et al. Risk factors influencing mortality related to *Stenotrophomonas maltophilia* infection in hematology-oncology patients. Int J Hematol. 2013;97(3):414-20
31. Gökhan Gözel M, Celik C, Elaldı N. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in adults: primary bacteremia and pneumonia. Jundishapur J Microbiol 2015;22:8(8):e23569
32. Ozkaya E, Aydın F, Bayramoglu G, et al. Investigation of integrons, *sul-1* and *dfr* genes in trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul 2014;48(2): 201-212
33. Tekin A, Tekin R, Deveci Ö, Demirkaya S, Mete M, Dayan S. Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıkları. Düzce Tı Fak Derg. 2014;16(1):4-7.
34. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute [cited 2016; Available from: <http://clsi.org/>
35. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testi. [cited 2016; Available from: <http://www.eucast.org/>
36. Hu RM, Huang KJ, Wu LT, Hsiao YJ, Yang TC. Induction of L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):1198-200.
37. Neela V, Rankouhi SZ, van Belkum A, Goering RV, Awang R. *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance. Int J Infect Dis 2012;16(8):e603-7.

38. Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, et al. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*. 2008;**3**(2):e1619.
39. Chen CH, Huang CC, Chung TC, Hu RM, Huang YW, Yang TC. Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; **55**(12):5826-33.
40. Garcia-Leon G, Salgado F, Oliveros JC, Sanchez MB, Martinez JL. Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environ Microbiol*. 2014 ;**16**(5):1282-96.
41. Gould VC, Okazaki A, Avison MB. Coordinate hyperproduction of *SmeZ* and *SmeJK* efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 ;**57**(1):655-7.
42. Xiong X, Bromley EH, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res*. 2011 ;**39**(9):3917-27.
43. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; **49**(1):118-25.
44. Huang YW, Hu RM, Yang TC. Role of the *pcm-tolCsm* operon in the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2013 ;**68**(9):1987-93.
45. Roscetto E, Angrisano T, Costa V, et al. Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol*. 2012; **194**(21):5864-74.
46. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;**8**(3):253-67

47. Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. Front Microbiol. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. 2015; **31**;6:1216
48. <https://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm#/media/File:Biofilm.jpg>
49. Kang XM, Wang FF, Zhang H, Zhang Q, Qiana W. Genome-wide identification of genes necessary for biofilm formation by nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* reveals that orphan response regulator FsnR is a critical modulator. App Environ Microbiol. 2015 ;**81**(4):1200-9.
50. Turrientes MC, Baquero MR, Sanchez MB, et al. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. App Environ Microbiol. 2010 ;**76**(6):1746-58.
51. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, et al. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. J Biol Chem. 2002 ;**277**(13):11042-9.
52. Lira F, Hernandez A, Belda E, et al. Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, a clinical isolate and a model strain. J Bacteriol. 2012 ;**194**(13):3563-4.
53. Berg G, Martinez JL. Friends or foes: can we make a distinction between bebefical and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? Front Microbiol 2015;**6**:241
54. Arnold C. Rethinking sterile. The hospital microbiome. *Environ Health Perspect.* 2014; 122: 182–187.
55. Hagemann M, Hasse D, Berg G. Detection of a phage genome carrying a zonula occludens like toxin gene (zot) in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Arch Microbiol.* 2006; 185: 449–458.
56. Liu J, Chen P, Zheng C, Huang YP. Characterization of maltocin P28, a novel phage tail-like bacteriocin from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Appl Environ Microbiol.* 2013;**79**, 5593–5600.

57. Vidigal PG, Müsken M, Becker KA, Häussler S, Wingender J, Steinmann E, et al. . Effects of green tea compound epigallocatechin-3-gallate against *Stenotrophomonas maltophilia* infection and biofilm. PLoS ONE 2014; **9**:e92876
58. Sanchez MB, Hernandez A, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Martinez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. BMC Microbiol. 2008;**8**:148.
59. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother. 2010 ;**54**(1):397-404.
60. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. APMIS 2007 ;**115**(8):891-9.
61. Di Bonaventura G, Stepanovic S, Picciani C, Pompilio A, Piccolomini R. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Folia Microbiol. 2007;**52**(1):86-90.
62. Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J Eukaryot Microb. 1999 ;**46**(4):327-38.
63. Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Int J Antimicrob Agents. 2003 ;**22**(6):551-6.
64. Türk Dağı H AU, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2011;**25**(1):27-30.
65. Cho SY, Lee DG, Choi SM, 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**:69.

66. Dizbay M GTÖ, Maral I, Aktaş F, Şenol E. Five years surveillance of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* infections in Gazi University Hospital. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2009;**29**(6):1406-11.
67. Chung HS, Kim K, Hong SS, Hong SG, Lee K, Chong Y. The *sul1* gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with high-level resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole. *Ann Lab Med.* 2015 ;**35**(2):246-9.
68. Hu LF, Chang X, Ye Y, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Mar;**37**(3):230-4.
69. Song JH, Sung JY, Kwon KC, et al. Analysis of acquired resistance genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Korean J Lab Med.* 2010 ;**30**(3):295-300.
70. Nicodemo AC, Araujo MR, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother.* 2004 ;**53**(4):604-8.
71. Al-Jasser AM. *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;**5**:23.
72. Tanrıverdi Çaycı Y KA, Yılmaz H, Yanık K, Günaydın M. *Stenotrophomonas maltophilia* Klinik Suşlarında Antimikrobiyal Direnç. *Turk Mikrobiol Cem Derg.* 2013;**41**(1):22-5.
73. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Maraki S, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. *PloS one.* 2012;**7**(5):e37375.
74. Ülkü Çİ. Hayvanlar ve çevrelerinden *Stenotrophomonas maltophilia* izolasyonu ve karakterizasyonu [Doktora Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2011.

75. Kang XM, Wang FF, Zhang H, Zhang Q, Qiana W. Genome-wide identification of genes necessary for biofilm formation by nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* reveals that orphan response regulator FsnR is a critical modulator. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(4):1200-9.



Ek 1. Çalışmada kullanılan tüm *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının kalitatif mikrodilüsyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılık durumları

| Sayı | Bakteri no | Aminoglikozid grubu | B-laktam grubu Penisilin türevi ve Sefalosporinler | Kinolon grubu | Karbapenemler | Tetrasiklin türevi | Sülfonamid | Monobaktam grubu |
|------|-------------------------|---------------------|---|---------------|---------------|--------------------|------------|------------------|
| 1. | 21552765 | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 2. | 21551554 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 3. | 914047 (1815) | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 4. | 21473204 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 5. | 1099945 (1825) | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 6. | 21557686 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 7. | 21433536 | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 8. | 21433148 | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 9. | 1733372 (1816) | Dirençli | Sadece CAZ duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 10. | 1721718 (1866) | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 11. | 2136(8)4279 | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 12. | 1715125 (1857) | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 13. | 1043417 (1806) | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 14. | 21393080 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 15. | 21465621 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 16. | 1773* | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 17. | 1826* | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 18. | SM23b | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 19. | SM22 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 20. | SM18 | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 21. | SM16 | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 22. | SM19 | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 23. | SM14 | Dirençli | Sadece TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 24. | SM7 | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 25. | SM25b | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 26. | SM20 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 27. | SM419b | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 28. | SM26b | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 29. | SM30 | Dirençli | TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 30. | SM34 | Dirençli | Dirençli | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 31. | SM15* | Dirençli | TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| 32. | SMLN958 Standart suş | Dirençli | Sadece CAZ ve TIM duyarlı | Dirençli* | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |

Aminoglikozid grubu: Amikasin , Gentamisin, **B-laktam grubu:** Penisilin türevi: Ampisilin sülbaktam, Piperasilin-tazobaktam, Tikarsilin-klavulonat (TIM), **Sefalosporinler:** Sefazolin, Sefepim, Sefoksitin, Seftazidim (CAZ), Seftriakson, **Kinolon grubu:** Siprofloksasin, Levofloksasin, *LEV duyarlı, CIP dirençli, **Karbapenemler:** Ertapenem, İmipenem, Meropenem, **Tetrasiklin türevi;** Tigesiklin, **Sülfonamid grubu:** Trimetoprim-sülfometaksazol, **Monobaktam grubu:** Aztreonam

Ek 2: *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının TMZ-SMZ, CIP ve LEV için disk difüzyon (DD) ve kalitatif mikrodilüsyon (KMD) test sonuçları ve direnç genleri

| Sayı | Bakteri no | TMP-SMZ | | Direnç geni | | CIP | | LEV | | Direnç geni | |
|------|------------------------|----------|---------|-------------|--------------|----------|----------|----------|----------|---------------|---------------|
| | | DD | KMD | <i>suII</i> | <i>suIII</i> | DD | KMD | DD | KMD | <i>qnr1-2</i> | <i>qnr3-4</i> |
| 1. | 21552765 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Dirençli | + | + |
| 2. | 21551554 | Duyarlı | Duyarlı | - | + | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 3. | 914047 (1815) | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Dirençli | + | + |
| 4. | 21473204 | Dirençli | Duyarlı | - | + | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 5. | 1099945 (1825) | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Dirençli | + | + |
| 6. | 21557686 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 7. | 21433536 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 8. | 21433148 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 9. | 1733372 (1816) | Dirençli | Duyarlı | - | + | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 10. | 1721718 (1866) | Duyarlı | Duyarlı | + | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 11. | 2136(8)4279 | Duyarlı | Duyarlı | + | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | - |
| 12. | 1715125 (1857) | Duyarlı | Duyarlı | + | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 13. | 1043417 (1806) | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 14. | 21393080 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 15. | 21465621 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 16. | 1773 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | + | - |
| 17. | 1826 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 18. | SM23b | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 19. | SM22 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | - |
| 20. | SM18 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 21. | SM16 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | - |
| 22. | SM19 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 23. | SM14 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 24. | SM7 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 25. | SM25b | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | - |
| 26. | SM20 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | - |
| 27. | SM419b | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 28. | SM26b | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 29. | SM30 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 30. | SM34 | Duyarlı | Duyarlı | + | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 31. | SM15 | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |
| 32. | SMLN958 (Standart suş) | Duyarlı | Duyarlı | - | - | Dirençli | Dirençli | Duyarlı | Duyarlı | + | + |

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Funda Doğruman Al

Doğum Yeri: Denizli

Doğum Tarihi: 16.08.1971

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ankara Kız Lisesi (1988)

Lisans: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (1994)

Uzmanlık Eğitimi: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum (2000)

İş Tecrübesi

Kurumu: Sağlık Bakanlığı, Dereli Sağlık Ocağı, Giresun

Görevi: Hükümet Tabipliği **Yılları:** 1994-1995

Kurumu: Sağlık Bakanlığı, Dadaşkent Sağlık Ocağı, Erzurum

Görevi: Hükümet Tabipliği **Yılları:** 1995-1996

Kurumu: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

Görevi: Araştırma Görevlisi Dr. **Yılları:** 1996-2000

Kurumu: Ankara SSK Etlik Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi, Ankara

Görevi: Mikrobiyoloji Uzmanı **Yılları:**2000-2004

Kurumu: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Görevi: Öğretim Üyesi **Yılları:**2004-

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

-

Doktora Öncesi Yayınlar (Son 5 yıllık)

1. Dogruman-Al F, Fidan I, Celebi B, Yesilyurt E, Erdal B, Babur C, Kustimur S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pacific J Trop Med.* 2011;4(1):16-19
2. Yoshikawa H, Doğruman-Al F, Türk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res* 2011; 109;4:1045-50
3. Türk S, Doğruman-Al F, Karaman Ü, Kuştimur S. Investigation of *Microsporidia* prevalence by different staining methods in cases of diarrhea. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(1):85-92
4. Aydın M, Adıyaman G, Kaya T, Kuştimur S, Doğruman-Al F. Comparison of conventional and commercial trichrome staining methods for detecting protozoan in stool samples. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012;18 (Suppl-A):A155-A159
5. Dogruman-Al F, Adıyaman G, Yantra TN, Hasgür S, Bağrıaçık Ü. Determination of the effects of anti-parasitic drugs on the viability of *Blastocystis* strains via MTT assay.. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012;18 (Suppl-A):A167-A170
6. Turk S, Dogruman-Al F, Kuştimur S. A new approach to the diagnosis of species of *Blastocystis*: direct fluorescent antibody method. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012;18 (Suppl-A):A171-A174 SCI-E kapsamında
7. Engin AB, Doğruman-Al F, Ercin U, Celebi B, Babur C, Bukan N. Oxidative stres and tryptophan degradation pattern of acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitol Res* 2012; 111(4): 1725-1730 SCI-E kapsamında
8. Toyran M, Bakirtas A, Dogruman-Al F, Turktas I. Airway inflammation and bronchial hyperreactivity in steroid naive children with intermittent and mild persistent asthma. *Pediatr Pulmonol* 49:140–147 (2014) SCI-E kapsamında (IF 2.375)

9. Dogruman-Al F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, Hananel A, Levi L, Kopelowitz J, Babai O, Gross S, Greenberg Z, Herschkovitz Y, Mumcuoglu I. A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. Parasitol Res. 2015;114:495-500 SCI kapsamında (IF:2.327)
10. Adiyaman Korkmaz G, Doğruman-Al F, Mumcuoğlu İ. Investigation of the presence of *Blastocystis* spp. in stool samples with microscopic, culture and molecular methods Mikrobiyol Bul . 2015 49(1): 85-97 SCI-E kapsamında
11. Oncul B, Karakis D, Dogruman Al F. The effect of two artificial salivas on the adhesion of *Candida albicans* to heat-polymerized acrylic resin. J Adv Prosthodont. 2015 Apr;7(2):93-7. SCI-E kapsamında
12. Doğruman-Al F, Engin AB, Bukan N, Evirgen-Bostancı S, Ceber K. Late-stage systemic immune effectors in *Plasmodium berghei* ANKA infection: biopterin and oxidative stress. Pteridines. 2015; 26(3):105-112 SCI-E kapsamında
13. Mumcuoglu I, Cetin F, Dogruman Al F, Oguz I, Aksu N. Prevelence of microsporidia in healthy individuals and immunocompetent patients with acute and chronic diarrhea. Infect Dis 2016; 48(2):133-137 SCI kapsamında
14. Kurt O, Dogruman Al F, Tanyuksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? Parasitol Int 2016; SCI-E kapsamında

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler (Son 5 yıllık)

1. Yoshikawa H, Dogruman-Al F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of diagnosis methods on *Blastocystis*: Comparison among commercial DNA-elution kits from fresh fecal samples and fecal culture method. The XIIth International Congress of Parasitology, Australia, Congress Handbook, 1955, 2010

2. Dogruman-Al F, Turk S, Adiyaman G, Hananel A, Kopelowitz J, Gross S, Greenberg Z, Mumcuoglu I. A novel ELISA-based diagnostic test may replace the traditional microscopy detection of *Blastocysti* spp. in human stool samples. ECCMID^{22nd} London, UK, 31 March-3 April 2012 Poster no. 2083 (Congress Handbook . p170)
3. Dođan N, Doğruman-Al F, Kocman U, Dinleyici EC, Ođuz İ, Aydın M. Subtyping of *Blastocystis* isolates from children in Eskisehir province. 1st International *Blastocystis* Symposium, May 28-29 2015. Gazi University Faculty of Medicine. Poster no:13 (Abstract Book, p49)
4. Yıldız S, Dođan İ, Doğruman-Al F. Prevalance of *Blastocystis* sp. İnfection in cirrhotic patients and its correlation with hepatic encephalopathy. 1st International *Blastocystis* Symposium, May 28-29 2015. Gazi University Faculty of Medicine. Poster no:17 (Abstract Book, p54)
5. Akkale Ö, Doğruman-Al F, Dođan İ, Ođuz İ, Tuncer C. The effect of treatment for *Blastocystis* sp. on symptoms in patients with irritable bowel syndrome. 1st International *Blastocystis* Symposium, May 28-29 2015. Gazi University Faculty of Medicine. Poster no:24 (Abstract Book, p63)

Airway Inflammation and Bronchial Hyperreactivity in Steroid Naive Children With Intermittent and Mild Persistent Asthma

Muge Toyran, MD,^{1*} Arzu Bakirtas, MD,² Funda Dogruman-AI, MD,³ and Ipek Turktas, MD^{2†}

Summary. Background: Intermittent and mild persistent asthma are defined according to symptom frequency and spirometry and treated differently. To our knowledge, there is no study comparing airway inflammation between intermittent and mild persistent asthmatic children. Materials and methods: Children aged 7–16 years, referred to our pediatric allergy clinic for recurrent respiratory complaints underwent a detailed clinical history and spirometry with reversibility. None of the subjects had been using regular anti-inflammatory treatment. After a 2-week run-in period during which asthma symptoms were recorded, exhaled NO measurement, bronchial provocation test with adenosine monophosphate and methacholine and sputum induction were performed. Data of patients with intermittent and mild persistent asthma and a control group were compared. Results: Thirty intermittent, 26 mild persistent asthmatic children, and 21 control subjects were studied. Sputum was obtained from 19 of intermittent asthmatics (63.3%), 18 of mild persistent asthmatics (69.2%), and 13 of control subjects (61.9%). Eosinophil count and exhaled nitric oxide were not different between asthmatic groups. Neutrophil count of children with mild persistent asthma was higher than the intermittent asthmatic group ($P = 0.003$). Geometric mean of PC₂₀ methacholine values were not different between groups ($P = 0.058$). Geometric mean of PC₂₀ AMP was lower among patients with mild persistent asthma ($P = 0.102$). Conclusion: Eosinophilic airway inflammation and direct BHR may not be significantly different in intermittent asthmatic children from their peers with mild persistent disease. Neutrophilic airway inflammation and BHR to an indirect stimuli are more pronounced in the mild persistent group. *Pediatr Pulmonol.* 2014; 49:140–147. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: induced sputum; nitric oxide; methacholine; AMP; mild asthma.

Funding source: none reported

INTRODUCTION

Children with mild disease constitute a large part of the asthmatic population yet remain a relatively unstudied group. Although their asthma is considered to be “mild”, they use health care resources disproportionately to their apparent disease severity. A remarkable part of hospitalizations and one-third of asthma related deaths are reported to be within this group of patients.^{1,2} The use of

emergency care is almost as high as in patients with severe persistent disease. They are also reported to suffer impairment in health related quality of life equal or greater than patients with more severe disease.^{3,4}

Severity of asthma is determined only at the time of diagnosis before any treatment is initiated and leaves its place to the term “asthma control” thereafter. Children with intermittent or mild persistent asthma are generally accepted as mild asthmatics. These two groups are defined

¹Department of Pediatric Allergy and Immunology, Ankara Pediatric Health and Disease Hematology Oncology Research and Education Hospital, Ankara, Turkey.

²Department of Allergy and Asthma, Gazi University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey.

³Department of Clinical Microbiology, Gazi University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey.

Conflict of interest: None.

[†]Asst. Professor.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

[‡]Professor.

*Correspondence to: M. Toyran, MD, Department of Pediatric Allergy and Immunology, Ankara Pediatric Health and Disease Hematology Oncology Education and Research Hospital, Altındağ/Ankara 06100, Turkey. E-mail: mugetoyran@yahoo.com

Received 22 November 2012; Accepted 10 March 2013.

DOI 10.1002/ppul.22810

Published online 24 June 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

according to symptom frequency and spirometry and treated differently. Asthma guidelines recommend regular anti-inflammatory treatment to children with mild persistent asthma but not to intermittent asthmatics.⁵ However, the relation between asthma symptoms and spirometry and airway inflammation and bronchial hyperreactivity are conflicting.^{6,7} To our knowledge, there is no study specifically designed to compare airway inflammation between intermittent and mild persistent asthmatic children. Previous reports comparing airway inflammation between severity groups included both intermittent and mild persistent asthma patients in the less severe group and/or included patients with moderate to severe asthma patients in the more severe group.⁸⁻¹² Moreover, in most of the studies on the subject, study population included patients using inhaled corticosteroids. There is one study comparing bronchial hyperreactivity between intermittent and mild persistent asthmatic patients between 10 and 25 years old.¹³ Therefore the aim of the present study was to investigate and compare the characteristics of airway inflammation and bronchial hyperreactivity at the time of diagnosis in children with intermittent and mild persistent asthma who are not on regular anti-inflammatory treatment. We used sputum induction, exhaled nitric oxide (eNO), and bronchial hyperresponsiveness (BHR) to methacholine and adenosine monophosphate (AMP) as noninvasive methods for the assessment of airway inflammation and bronchial hyperreactivity, respectively.

METHODS

Patients and Study Design

Children aged 7–16 years, referred to the Pediatric Allergy and Asthma Department of the Gazi University Hospital for recurrent respiratory complaints without a previous diagnosis of asthma, underwent a detailed clinical history, clinical visit and spirometry with reversibility, and methacholine test. A diagnosis of asthma was made based on a history of recurrent respiratory symptoms (cough, wheezing, dyspnea, and chest tightness) with over 12% improvement in baseline FEV₁ predicted after 200 mcg albuterol inhalation. Demographic data and information about disease progress in the preceding year (frequency of acute attacks, oral steroid use, emergency visits, and hospitalizations) were recorded. Patients were not enrolled in the study if they had had an exacerbation of asthma or an upper respiratory tract infection within 2 months preceding the study. None of the subjects had been using regular anti-inflammatory treatment before the study. Subjects having daily symptoms and/or a FEV₁ predicted lower than 80% were not enrolled in the study. Children who had a moderate to severe acute attack or hospitalization in the preceding year were also excluded. Atopy was defined as

at least one sensitivity to common aeroallergens (pollen, mite, mold, cat, and cockroach) on skin prick tests.

After an initial screening visit, patients selected according to the criteria described above, participated in a 2-week run-in period during which asthma symptoms were recorded to diary cards. In the diary cards symptoms were rated with a 4-point scale (from 0 to 3 corresponding to none to severe). Day and night symptoms were recorded separately. Number of days with symptoms and symptom scores were recorded from the dairies.

Asthmatic children were classified as intermittent and mild persistent according to disease severity. The definitions are based on the recommendations of GINA.⁵ Children with moderate to severe persistent asthma were not included in the study. Age and sex matched healthy children served as the control group.

Exhaled NO measurement, bronchial provocation test with AMP and methacholine and sputum induction were performed on the week following the day that the dairies were returned. Exhaled NO measurement preceded the sputum induction and were performed on the same day. Bronchial provocation tests with methacholine and AMP were done thereafter within the same week.

Written informed consent was taken and the study was approved by the ethics committee of Gazi University Faculty of Medicine.

Lung Function Tests

Lung function tests were performed according to American Thoracic Society guidelines with a daily calibrated spirometer (Vmax 20C, SensorMedics Co., Yorba Linda, CA). Short and long acting bronchodilators were withheld for 8 hr before testing.

Sputum Induction and Processing

Sputum induction and processing was performed according to the recommendations of European Thoracic Society.¹⁴ Briefly, 4.5% saline is nebulized by a DeVilbiss ultrasonic nebulizer with an output of 1 ml/dk, for 5 min intervals measuring FEV₁ at the end of each inhalation period. Induction was continued for a total of 20 min unless there was a 20% or greater fall in FEV₁. Terbutalin 200 mcg is inhaled 15 min before induction. Subjects were encouraged to cough deeply and expectorate after each interval and samples were collected into a sterilized sputum container, kept at 4°C, and processed within 2 hr of collection.

Whole sample was used for processing. Obtained sample was added to equal volume of dithiothreitol (0.1%) and agitated on vortex mixer. It was placed in a shaking water bath at 37°C and then cell viability was assessed using trypan blue. Preparations with a cell viability of 50% or greater were filtered from a 52 µm nylon mesh. Cytospins were prepared and stained with

Pediatric Pulmonology

Giemsa stain. Sputum cytopins with a squamous cell percentage of 50% or greater were not used. Four hundred nonsquamous cells were counted for differential cell counting. The physician assessing differential cell counting (FA) did not have any information about the patients. Eosinophilia was defined as an eosinophil count more than 2.5% of nonsquamous cells on the cytopsin.^{15,16} Because there is not a generally accepted definition for neutrophilia, we accepted the two standard deviation of the mean neutrophil percent of our control group as a cut off point.

Nitric Oxide Measurement

Exhaled NO was measured with a fast response chemiluminescence analyzer (NOA Tm 280i; Sievers Instruments Inc., Boulder, CO) by the on-line single-breath technique, according to the ATS and ERS recommendations for children.¹⁷ The analyzer has an NO sampling rate of 200 ml/min, a detection range of <0.1–500.000 parts per billion (ppb) and a response time of 0.02 sec for 90% full scale. Briefly, the subjects were asked to perform a single slow exhalation starting from total lung capacity through a mouthpiece and a one-way nonbreathing valve against a resistance of 16 cm H₂O under a visual biofeedback, to maintain a 50 ml/sec steady flow. Subjects were at rest, sitting down, having refrained from eating and exercise for at least 1 h, and breathed NO-free air (99.5% O₂; containing NO <1 ppb) without a nose-clip before the single exhalation maneuver. Ambient air NO was recorded before and after each test. The analyzer was calibrated daily with a zero signal (air filter scrubber, potassium permanganate, and charcoal, ACT 01400; Sievers Instruments Inc.) and certified NO gas containing 10 ppm. NO gas (BOS Mitan, Ankara, Turkey). eNO levels were measured at the plateau (≥ 2 sec during an exhalation ≥ 6 sec) of the end exhaled reading and expressed as ppb. At least three measurements that varied by <10% or two measurements that varied by <5% were recorded. The mean value of the respective plateau was retained according to specific guidelines.

Adenosine Monophosphate Bronchial Challenge

Adenosine 5'-monophosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was made up freshly in 0.9% saline solution in doubling concentrations from 0.39 to 400 mg/ml. AMP was delivered by a DeVilbiss 646 nebulizer (DeVilbiss Co., Somerset, PA) attached to a compressor which produced an output of 0.13 ml/sec (Pulmo Aide compressor By DeVilbiss) Bronchial challenge was done by 2-min tidal breathing method. AMP was administered through a mouth piece at 2 min intervals after a diluent step in doubling dilutions until a 20% reduction in FEV₁ was recorded. Spirometry was performed 30 and 90 sec

after each level and the best maneuver was selected. The provocative concentration of AMP causing a 20% decrease in forced expiratory volume in one second (PC₂₀AMP) was calculated with a computer-assisted program by linear interpolation from the log dose-response curve. Although there has been no epidemiologic data for PC₂₀AMP, a cut-off value of ≤ 200 mg/ml is generally accepted as airway responsiveness to AMP in both children and adult patients with asthma. Therefore, we also applied this threshold to define our patients as responsive (PC₂₀AMP ≤ 200 mg/ml) and non-responsive (PC₂₀AMP > 200 mg/ml) to AMP. Bronchial challenge was postponed for at least 6 weeks in children with respiratory tract infection.¹⁸

Methacholine Bronchial Challenge

Methacholine (acetyl- β -methylcholine chloride) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim) solution was prepared daily from a stock solution in doubling concentrations from 0.031 to 16 mg/ml. Bronchial challenge with methacholine was performed with the same type of nebulizer using the same method as in AMP challenge. The cut off value for methacholine was accepted as <16 mg/ml according to American Thoracic Society Guidelines.¹⁹

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Results are given as mean and standard deviation for age and age at diagnosis, median and minimum-maximum for eNO and cellular components of sputum or number, and percent for non continuous parameters. Results of BHR are given as geometric mean and minimum-maximum. To compare characteristics of the subgroups, the Kruskal-Wallis test was used for continuous variables and if significantly different, the Mann-Whitney *U*-test with Bonferroni's correction was used to compare the different groups and chi-square tests were used to compare discontinuous parameters. The correlation analyses were performed using Spearman's rank correlation. Comparisons were two-tailed and *P*-values of <0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Characteristics of Patients

We studied 30 intermittent, 26 mild persistent asthmatic children, and 21 control subjects ranging from 8 to 16 years of age. Median age of the whole group was 11 years (min 8–max 16 years). There was no difference in age, sex, and ETS exposure between groups. Atopy was not different between groups. There was not any difference between intermittent and mild persistent

TABLE 1—Demographic Data of Study Groups

| | Intermittent asthma (n = 30) | Mild persistent asthma (n = 26) | Control group (n = 21) | P-value |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------|
| Sex, male n (%) | 20 (66.7) | 13 (50) | 12 (57.1) | 0.444 |
| Age ¹ | 12 (8–16) | 11 (8–16) | 11 (8–15) | 0.449 |
| Atopy n (%) | 20(66.7) | 18 (69.2) | 8 (38.1) | 0.059 |
| ETS exposure, n (%) | 11 (42.3) | 13 (44.8) | | 1.000 |
| FVC ¹ | 98 (80–116) | 103 (85–134) | 105 (84–130) | 0.052 |
| zFVC ¹ | −0.4 (−1.9–1.1) | −0.01 (−1.5–2.6) | 0.18 (−1.6–2.3) | 0.052 |
| FEV1 ¹ | 91.5 (79–113) | 97 (78–126) | 102 (84–130) | 0.013 ³ |
| zFEV1 ¹ | −0.4 (−1.5–1.4) | 0.06 (−1.6–2.5) | 0.49 (−1.0–2.9) | 0.013 ³ |
| Age at diagnosis ² | 7.4 ± 3.2 | 8.4 ± 3.3 | | 0.435 |
| Disease duration ² | 6.1 ± 5.1 | 4.4 ± 3.5 | | 0.393 |
| Attacks in the last year ² | 0.4 ± 1.1 | 0.8 ± 1.3 | | 0.652 |

¹Results are given as median and minimum maximum.

²Results are given as mean and standard deviation.

³The difference is between intermittent and control groups ($P = 0.005$).

asthmatic groups in terms of atopic sensitization, age at diagnosis, duration of the disease, number of attacks in the last year. Pulmonary function test parameters were also similar in the two groups (Table 1).

Sputum Induction

A satisfactory sputum sample was obtained from 19 of intermittent asthmatics (63.3%), 18 of mild persistent asthmatics (69.2%), and 13 of control subjects (61.9%) with a total of 50 samples (64.9%). There was no difference in the proportion of children able to produce a sample between study groups ($P = 0.84$). None of the patients developed bronchospasm during induction. There were only minor adverse events, including nausea ($n = 4$) and sore throat ($n = 3$).

Sputum Eosinophil Count

Eosinophil count of children with intermittent and mild persistent disease was higher than that of control children ($P = 0.045$ and 0.007 , respectively) but no difference was detected between asthmatic groups ($P = 0.187$). Sputum eosinophil percent of children with neither intermittent nor mild persistent asthma was not found to be related with symptom scores ($P = 0.473$, $r = 0.170$ and $P = 0.394$, $r = 0.202$, respectively) and the number of days with symptoms ($P = 0.942$, $r = -0.018$ and $P = 0.937$, $r = -0.019$, respectively).

The proportion of children with eosinophilia was also not different between children with intermittent and persistent disease ($P = 0.433$) (Table 2). Symptom scores, number of days with symptoms, age at diagnosis,

TABLE 2—Sputum Cell Profiles, eNO, and Bronchial Hyperreactivity of Study Groups

| | Intermittent asthma (n = 30) | Mild persistent asthma (n = 26) | Control group (n = 21) | P-value |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------|
| eNO > 20 ppb | 18 (60) | 13 (52) | 5 (29.4) | 0.127 |
| PC ₂₀ methacholine (mg/ml) | 3.44 (0.25–32) | 1.25 (0.05–8.41) | 13.5 | 0.058 |
| PC ₂₀ AMP (mg/ml) | 641.7 (18.8–800) | 195.9 (0.88–800) | — | 0.029 |
| BHR to methacholine, n (%) | 23 (76.7) | 26 (100) | 1 (4.7) | <0.001 ¹ |
| BHR to AMP, n (%) | 3 (10.0) | 8 (30.8) | 0 (0) | 0.002 ² |
| | Intermittent asthma (n = 19) | Mild persistent asthma (n = 18) | Control group (n = 13) | P-value |
| Eosinophil count (%) | 0 (0–11) | 2.0 (0–15) | 0 (0–1) | 0.009 ³ |
| Neutrophil count (%) | 2.5 (0–19) | 19.4 (0–68) | 1.78 (0–24) | <0.001 ⁴ |
| Eosinophilia, n (%) | 7 (36.8) | 8 (44.4) | 0 (0) | 0.016 ⁵ |
| Neutrophilia, n (%) | 3 (15.8) | 11 (61.1) | 1 (7.7) | <0.001 ⁶ |

Eosinophil and neutrophil counts were presented as median (min–max); PC₂₀ methacholine and AMP were presented as geometric mean (min–max).

¹Control group was different from intermittent ($P < 0.001$) and mild persistent groups ($P < 0.001$), asthmatic groups were also different ($P = 0.012$).

²Control group was different from mild persistent group ($P = 0.005$).

³Control group was different from intermittent asthmatic ($P = 0.045$) and mild persistent asthmatic groups ($P = 0.007$).

⁴Mild persistent asthma group is different from intermittent asthma ($P = 0.014$) and control groups ($P = 0.002$).

⁵Control group was different from intermittent asthmatic ($P = 0.026$) and mild persistent asthmatic groups ($P < 0.001$).

⁶Control group was different from mild persistent asthmatic group ($P = 0.009$). Asthmatic groups were also different ($P = 0.019$).

Pediatric Pulmonology

disease duration, and spirometric parameters were also not different between these two groups.

Sputum Neutrophil Count

Neutrophil count of children with mild persistent asthma was higher than both control and intermittent asthmatic groups ($P < 0.001$ and $P = 0.003$, respectively), whereas there was not any difference between controls and intermittent asthmatics ($P = 0.426$) (Table 2). Sputum neutrophil percent of children with neither intermittent nor mild persistent asthma were related with symptom scores ($P = 0.202$, $r = 0.298$ and $P = 0.245$, $r = 0.273$, respectively) and the number of days with symptoms ($P = 0.186$, $r = 0.317$ and $P = 0.451$, $r = 0.184$, respectively).

Because there is not a general definition for neutrophilia, we accepted the two standard deviation of the mean neutrophil percent of our control group (18.1%) as a cut off point. According to this definition, neutrophilia was more prevalent in the mild persistent group than the intermittent group ($P = 0.007$) (Table 2). Age at diagnosis, disease duration, and spirometric parameters were similar in children with and without neutrophilia but symptom scores and number of days with symptoms was higher in the former group ($P = 0.004$ and $P = 0.006$, respectively).

Exhaled Nitric Oxide

Measurement of eNO was higher than the control group for both intermittent and mild asthmatic groups ($P < 0.001$ and $P = 0.002$, respectively) but was not different between the two groups of asthmatic children ($P = 0.357$). When 20 ppb was used as a cut off value, the number of children with high and normal eNO were not different

between asthmatic groups ($P = 0.551$) and only five subjects had high eNO levels in the control group (Table 2).

BHR to Methacoline

Twenty-three patients (76.7%) in the intermittent, all patients in the mild persistent asthmatic groups had BHR to methacoline ($P = 0.012$). Only one child had mild BHR to methacoline in the control group. The geometric mean of PC₂₀ methacoline values were not different between three groups ($P = 0.058$) (Table 2).

BHR to AMP

Three children in the intermittent and eight children in the mild persistent group had BHR to AMP ($P = 0.211$). There was not any child with BHR to AMP in the control group. The geometric mean of PC₂₀ AMP was lower among patients with mild persistent asthma than their peers with intermittent disease ($P = 0.102$).

Atopy

Sputum eosinophil and neutrophil content, eNO level, PC₂₀ methacoline, PC₂₀ AMP, symptom scores, and number of days with symptoms of patients with and without atopy were similar ($P > 0.05$).

Among patients with atopy, sputum neutrophil count was correlated with symptom scores ($P = 0.008$, $r = 0.467$) and was higher in the mild persistent group than patients with intermittent asthma ($P = 0.038$). Neutrophilia was more prevalent in the mild persistent group (53.3%) than patients with intermittent asthma (12.5%) ($P = 0.023$). Eosinophil count and frequency of eosinophilia was not different between severity groups (Table 3).

TABLE 3—Characteristics of Patients in Severity Groups Arranged According to Atopy

| | Atopic (n = 37) | | | Nonatopic (n = 18) | | |
|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------|------------------------------|--------------------------------|---------|
| | Intermittent asthma (n = 20) | Mild persistent asthma (n = 17) | P-value | Intermittent asthma (n = 10) | Mild persistent asthma (n = 8) | P-value |
| eNO > 20 ppb | 12 (60) | 9 (52.9) | 0.666 | 6 (60) | 4 (50) | 1.0 |
| eNO (ppb) ¹ | 23.5 (4.8–100) | 21.1 (5.9–67.1) | 0.497 | 23.4 (13–45) | 23.5 (10.7–39.7) | 0.883 |
| BHR to methacholine, n (%) | 17 (85) | 17 (100) | 0.096 | 6 (60) | 8 (100) | 0.092 |
| BHR to AMP, n (%) | 3 (15) | 8 (47.1) | 0.069 | 0 | 0 | |
| | Atopic (n = 37) | | | Nonatopic (n = 18) | | |
| | Intermittent asthma (n = 16) | Mild persistent asthma (n = 14) | P-value | Intermittent asthma (n = 3) | Mild persistent asthma (n = 4) | P-value |
| Eosinophil count, % ¹ | 0.0 (0–11) | 3.0 (0–15) | 0.070 | 1.5 (0–4) | 0 (0–3) | 0.405 |
| Neutrophil count, % ¹ | 5.2 (0–63) | 20.5 (0–83) | 0.038 | 0.75 (0–62) | 14.75 (6–24) | 0.245 |
| Eosinophilia, n (%) | 5 (31.3) | 7 (50.0) | 0.457 | 2 (66.2) | 1 (25) | 0.486 |
| Neutrophilia, n (%) | 2 (12.5) | 8 (53.3) | 0.023 | 1 (25) | 2 (66.2) | 1.0 |

¹ Continuous variables are given as median and min–max.

Among patients without atopic sensitization, there was not any difference between severity groups with regards to sputum eosinophil and neutrophil content (Table 3) and there was not any correlation between symptom scores and sputum eosinophil and neutrophil counts ($P > 0.05$).

DISCUSSION

This study demonstrated that steroid naive children with intermittent and mild persistent asthma share similar profiles considering eosinophilic airway inflammation and direct bronchial hyperreactivity. However their features of neutrophilic airway inflammation and indirect bronchial hyperreactivity differ. To our knowledge, our report is the only study comparing children with intermittent and mild persistent asthma defined according to GINA criteria as separate groups. Another distinguishing feature of this study from other studies is inclusion of only steroid-naïve children with asthma eliminating the effect of anti-inflammatory treatment on cell distribution and bronchial hyperreactivity. A larger sample group could be more informative but given the difficulty of obtaining satisfactory sputum samples, we think number of our population may be enough for useful information.

Infiltration and activation of eosinophils in the bronchial mucosa is a well known feature of the asthmatic airway inflammation.²⁰ In our study, the sputum eosinophil count of both intermittent and mild persistent asthma were higher than the control group whereas there was not any significant difference between the two severity groups of asthmatic children. There are studies conducted among children that report a relation between the degree of eosinophilic content of the sputum and disease severity.⁸⁻¹¹ These studies include patients with asthma more severe than mild disease and this may have affected the results. In accordance with our results, there are also reports that could not reveal a relation between eosinophilic inflammation and asthma severity. A study conducted among adults has shown that eosinophilic infiltration was similar in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage fluids of patients with intermittent and persistent asthma.¹² Two bronchoscopic studies conducted among small groups of children reported that BAL eosinophil percentage of patients with intermittent and mild-moderate asthma were similar.^{21,22} In their study using induced sputum, Palomino et al. revealed that children with mild, moderate, and severe asthma had a similar degree of eosinophilic inflammation but the mild group was consisted of intermittent and mild persistent asthmatics.⁸ Wilson et al.^{23,24} have reported that 3/4 of children without symptoms in the last month had eosinophilic inflammation in sputum. There may be many factors behind these contradictory results such as

parameters defining asthma severity, treatment of some patients enrolled in these studies with inhaled corticosteroids and other anti-inflammatory drugs. None of these studies have taken intermittent asthma as a separate group and compared it to children with mild persistent disease. Some of the patients in these studies were using anti-inflammatory treatment. Also a similar measurement of exhaled nitric oxide which is an indirect measure of eosinophilic airway inflammation between children with intermittent or mild persistent asthma supports this issue in our study.

Exhaled nitric oxide is one of the noninvasive markers of eosinophilic airway inflammation. Exhaled NO levels of our patients with intermittent asthma was similar to children with mild persistent disease supporting the results of the sputum eosinophil content. Similar to sputum studies, those evaluating the relation between eNO and asthma severity have also contradictory results.²⁴⁻²⁶ but again there is not any study directly comparing eNO levels of children with intermittent and mild persistent asthma. Supporting the presence of airway inflammation in patients with intermittent disease, Spallarossa et al. reported that steroid naive children with intermittent asthma had eNO levels higher than the control group.²⁷ Also, patients with mild asthma were shown to have higher eNO levels after low dose allergen exposure without worsening of symptoms.²⁸

Although asthmatic inflammation is known to be mainly eosinophilic, there is increasing recognition of noneosinophilic forms of asthma.¹⁰ A strong association has already been established between neutrophilic inflammation of the airways and severe asthma, and a body of evidence is being gathered that asthma of all grades of severity can have neutrophilic inflammation including patients using only bronchodilators as needed.^{10,29} Furthermore there is some data revealing a relation between the intensity of neutrophilic inflammation and asthma severity. Bronchoscopic studies conducted among a small number of asthmatic children reported BAL fluid neutrophil counts of children with more severe asthma to be higher than children with milder disease.^{21,22,30} In addition, recently Li et al.³¹ demonstrated that sputum neutrophil counts were positively correlated with cough frequency among children with mild stable asthma. In accordance with these findings, sputum neutrophil counts of children with mild persistent asthma were higher than their peers with intermittent disease in our study. The relation between neutrophilic inflammation and disease severity does not seem to be related to respiratory infection as patients in the studies relating neutrophilic inflammation with disease severity were reported to be free of clinical symptoms of respiratory infection. Furthermore viral and bacterial assessments performed in some of these studies did not reveal a relation between the presence of pathogens in the

sputum and neutrophil content.^{21,22,32} None of our patients had acute respiratory tract infection in the previous 4 weeks and during the study. However we cannot rule out a subclinical infection as no microbiologic assessment was performed in our sputum samples.

When patients were grouped according to atopy, the relation between severity and sputum neutrophils was only present in the atopic group. When severity groups were divided according to atopy number of patients was low in subgroups (Table 3) and this can cause a type II error but we feel that the results need consideration. Emerging data indicate that there may be a complex relation between allergens, cytokines, neutrophils, and eosinophils in the development of airway inflammation. For example, a recently discovered cytokine, IL-17 is released in response to allergen exposure and leads to neutrophil recruitment to the airways that is resistant to glucocorticoid apoptosis. The level of this cytokine is also increased during prolonged viral infections and this may be a link between the both allergen and viral induced nature of asthma exacerbations among children.³³ Future investigations conducted among larger groups may provide a better explanation for the role of neutrophilic airway inflammation in atopic children.

BHR is one of the main features of asthma and the underlying mechanisms are complex. In this study, children with intermittent asthma had a comparable degree of bronchial hyperreactivity to methacholine. This was in accordance with a previous study that reported similar BHR with methacholine among patients with intermittent and mild persistent asthma.⁷ In our study BHR to AMP was more pronounced among children with mild persistent disease than with intermittent ones. Two previous studies reported that BHR of patients with intermittent asthma was milder than that of patients with more severe disease and methacholine challenge was more sensitive for predicting disease severity.^{34,35} These studies include patients with moderate persistent asthmatics which may be the reason for the difference from our results. Also the number of patients with positive AMP reactivity is very small in our study and this may have affected the statistics. The results of BHR and airway inflammation do not seem to overlap in our study which is probably due to the fact that BHR and airway inflammation reflect different aspects of asthma and cannot be used interchangeably.

In conclusion, this study supports the hypothesis that underlying eosinophilic airway inflammation and direct BHR may not be significantly different in intermittent asthmatic children from their peers with mild persistent disease. In addition, it provided evidence for a possible role of neutrophilic airway inflammation and a more severe BHR to an indirect stimuli in the pathophysiology of mild persistent than intermittent asthma.

REFERENCES

1. Chapman KR. Impact of 'mild' asthma on health outcomes: findings of a systematic search of the literature. *Respir Med* 2005;99:1350-1362.
2. Shahidi N, Fitzgerald JM. Current recommendations for the treatment of mild asthma. *J Asthma Allergy* 2010;3:169-176.
3. Bisgaard H, Szefer SJ. Understanding mild persistent asthma in children: the next frontier. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:708-713.
4. Dusser D, Montani D, Chanez P, de Blic J, Delacourt C, Deschildre A, Devillier P, Didier A, Leroyer C, Marguet C, Martinat Y, Piquet J, Raheison C, Serrier P, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Tunon de Lara M, Humbert M. Mild asthma: an expert review on epidemiology, clinical characteristics and treatment recommendations. *Allergy* 2007;62:591-604.
5. Global Initiative for Asthma Management and Prevention. www.ginasthma.org
6. Skappak C, Saude EJ. Monitoring asthma status. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:174-180.
7. Anderson SD. Indirect challenge tests: airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010;138:25-30.
8. Palomino AL, Bussamra MH, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Nunes Mdo P, Rodrigues JC. Induced sputum in children and adolescents with asthma: safety, clinical applicability and inflammatory cells aspects in stable patients and during exacerbation. *J Pediatr (Rio J)* 2005;81:216-224.
9. Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, Szefer SJ. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:575-582.
10. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, Clancy RL. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:36-41.
11. Gibson PG, Simpson JL, Hankin R, Powell H, Henry RL. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* 2003;58:116-121.
12. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:9-16.
13. Irigoyen JA. Relationship between degree of nonspecific bronchial hyperreactivity and clinical expression in a population of extrinsic asthmatics. *Allergol Immunol Clin* 1999;14:387-394.
14. Eftimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overvel F, Djukanović R. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:19-23.
15. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, Bianchi A, Michetti G. Induced sputum cellularity: reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1172-1174.
16. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J* 2000;16:1008-1015.
17. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. American Thoracic Society; European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930.
18. Holgate ST. Adenosine provocation: a new test for allergic type airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:317-318.

19. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-329.
20. *National asthma education and prevention program. Expert panel report 2. Guidelines for the diagnosis and management of asthma.* Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1997. publication no. 97-4051.
21. Just J, Fournier L, Momas I, Zambetti C, Sahraoui F, Grimfeld A. Clinical significance of bronchoalveolar eosinophils in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:42-44.
22. Barbato A, Panizzolo C, Gheno M, Sainati L, Favero E, Faggian D, Giusti F, Pesscolderung L, La Rosa M. Bronchoalveolar lavage in asthmatic children: evidence of neutrophil activation in mild-to-moderate persistent asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:73-77.
23. Wilson NM, Bridge P, Spanevello A, Silverman M. Induced sputum in children: feasibility, repeatability, and relation of findings to asthma severity. *Thorax* 2000;55:768-774.
24. Wilson NM, James A, Uasuf C, Payne DN, Hablas H, Agrofoti C, Bush A. Asthma severity and inflammation markers in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:125-132.
25. Lim S, Jatakanon A, Meah S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000;55:184-188.
26. Cano-Garcinuño A, Carvajal-Urueña I, Díaz-Vázquez CA, Domínguez-Aurrecochea B, García-Merino A, de Rodas PM, Mora-Gandarillas I. Clinical correlates and determinants of airway inflammation in pediatric asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:303-310.
27. Spallarossa D, Battistini E, Silvestri M, Sabatini F, Fregonese L, Brazzola G, Rossi GA. Steroid-naive adolescents with mild intermittent allergic asthma have airway hyperresponsiveness and elevated exhaled nitric oxide levels. *J Asthma* 2003;40:301-310.
28. de Kluijver J, Evertse CE, Schrupf JA, van der Veen H, Zwinderman AH, Hiemstra PS, Rabe KF, Sterk PJ. Asymptomatic worsening of airway inflammation during low-dose allergen exposure in asthma: protection by inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:294-300.
29. Green RH, Brightling CE, Bradding P. The reclassification of asthma based on subphenotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:43-50.
30. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1533-1540.
31. Li AM, Tsang TW, Chan DF, Lam HS, So HK, Sung RY, Fok TF. Cough frequency in children with mild asthma correlates with sputum neutrophil count. *Thorax* 2006;61:747-750.
32. Le Bourgeois M, Goncalves M, Le Clainche L, Benoist MR, Fournet JC, Scheinmann P, de Blic J. Bronchoalveolar cells in children <3 years old with severe recurrent wheezing. *Chest* 2002;122:791-797.
33. Petersen BC, Lukacs NW. IL-17A and IL-25: therapeutic targets for allergic and exacerbated asthmatic disease. *Future Med Chem* 2012;4:833-836.
34. Avital A, Godfrey S, Springer C. Exercise, methacholine, and adenosine 5'-monophosphate challenges in children with asthma: relation to severity of the disease. *Pediatr Pulmonol* 2000;30:207-214.
35. Fowler SJ, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and beta(2)-receptor genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1318-1322.