

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Stenotrophomonas maltophilia*
KÖKENLERİNDE TRİMETOPRİM-SULFAMETOKSAZOL (SXT) ANTİBİYOTİK
DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esra ÖZKAYA

TRABZON - 2012

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Stenotrophomonas maltophilia*
KÖKENLERİNDE TRİMETOPRİM-SULFAMETOKSAZOL (SXT) ANTİBİYOTİK
DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Esra ÖZKAYA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Faruk AYDIN

TRABZON – 2012

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Prof. Dr. Faruk AYDIN, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK, Doç. Dr. Osman Birol Özgümüş ve Prof. Dr. Cemal SANDALLI'ya; birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma; tüm Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına; bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan Dr. Uğur DİNÇ'e; kıymetli dostlarım Dr. Halide AYDIN ve Dr. Derya ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim sevgili aileme ve eşim Dr. Ahmet Kağan ÖZKAYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı Prof. Dr. Faruk AYDIN yönetiminde 9142 kodlu proje ile destekleyen KTÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Esra ÖZKAYA
TRABZON-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	<i>ii</i>
İÇİNDEKİLER	<i>iii</i>
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	<i>vi</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>viii</i>
RESİMLER DİZİNİ	<i>ix</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>x</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe	3
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	4
2.1.2.1. Morfolojik, Metabolik Ve Üreme Özellikleri	4
2.1.2.2. Biyokimyasal Özellikleri	4
2.1.2.3. Yapısal Özellikleri	6
2.1.2.4. Genomik Özellikleri	7
2.1.2.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri	7
2.1.3. Antibiyotiklere Direnci	9
2.1.3.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç	9
2.1.3.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç	9
2.1.3.3. Kinolon Direnci	10
2.1.3.4. Makrolid Direnci	10
2.1.3.5. Trimetoprim-Sulfametoksazol Direnci	11
2.1.4. Epidemiyoloji	12
2.1.5. Risk Faktörleri	13
2.1.6. Neden Olduğu Enfeksiyonlar	14
2.1.7. Laboratuvar Tanısı	15

2.1.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	15
2.1.9. Tedavi	16
2.1.10. Prognoz	17
2.1.11. Korunma	18
2.2. Antibiyotik Direnci Oluşturan Gen Dizileri	18
2.2.1. İntegron Gen Kasetleri	18
2.2.2. Insertion Element <i>Common Region</i> (ISCR) Elemanları	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. GEREÇ	21
3.1.1. Çalışma Grubu	21
3.1.2. Araç ve Gereçler	23
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	23
3.1.3.1. 2.5 M NaOH	23
3.1.3.2. 1 M Tris HCl	23
3.1.3.3. 0.5 M EDTA (Etilendiamin-Tetra-Asetik Asit)	24
3.1.3.4. TE Tamponu	24
3.1.3.5. Trimetoprim Stok Solüsyonu	24
3.1.3.6. Sulfametoksazol Stok Solüsyonu	24
3.1.3.7. 2.5 mM dNTP Karışımı	25
3.1.3.8. 0.5X TBE (Tris-Borik ast-EDTA) Tamponu	25
3.1.3.9. Etidyum Bromür	25
3.1.3.10. Yükleme Tamponu (<i>Loading Buffer</i>)	25
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	25
3.1.4.1. Luria Bertani (LB) Buyyon ve Agar	25
3.1.4.2. Mueller Hinton Agar Besiyeri	26
3.1.4.3. SXT'li Mueller Hinton Agar Besiyeri	26
3.2. YÖNTEM	26
3.2.1. Kökenlerin Tanımlanması	26
3.2.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	27
3.2.2.1. Agar Dilüsyon Yöntemi	27
3.2.3. Trimetoprim-Sulfametoksazol Antibiyotik Direnç Genlerinin Varlığının Araştırılması	28
3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşlemi	28
3.2.3.1.1. DNA İzolasyonu	28

3.2.3.1.2. Master Mix Solusyonunun Hazırlanması	28
3.2.3.1.3. PZR Analizi İçin Kullanılan Primerler	29
3.2.3.1.4. PZR Uygulanması	29
3.2.3.1.4.1. İntegraz 1 ve 2 PZR	30
3.2.3.1.4.2. İntegron Sınıf I ve II PZR	31
3.2.3.1.4.3. LEC2/REC2 PZR	32
3.2.3.1.4.4. Diğer Gen Bölgeleri İçin Uygulanan PZR Protokolü	33
3.2.3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi	33
3.2.3.2. Nükleotid Dizi Analizi	34
3.2.3.2.1. Kompetant Hücre Hazırlanması	34
3.2.3.2.2. Genin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	34
3.2.3.2.3. PZR ile Elde Edilen İntegron Sınıf I'e Ait Sekansların Birleştirilmesi	35
4. BULGULAR	36
4.1. Kökenlerin Tanımlanması	36
4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	41
4.3. Direnç Genlerinin Varlığının PZR Yöntemiyle Gösterilmesi	42
4.3.1. İntegraz 1 ve İntegraz 2 Genlerinin Amplifikasyonu	42
4.3.2. İntegron Sınıf I Ve II Genlerinin Amplifikasyonu	42
4.3.3. <i>sul1</i> ve <i>sul2</i> Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	43
4.3.4. ISCR Elementleri Gen Bölgelerinin Taranması	43
4.3.5. ISCR2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	43
4.3.6. <i>dhfrA</i> Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	44
4.4. Amplifiye Edilmiş İntegron Sınıf I'in Nükleotid Dizi Analizi Sonucu	44
5. TARTIŞMA	46
6. ÖNERİLER	53
7. ÖZET	54
8. SUMMARY	55
9. KAYNAKLAR	56

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
Bp	: Base pair (Baz çifti)
°C	: <i>Celcius</i> derecesi
CAZ	: Ceftazidim
CFU/mL	: <i>Colony Forming Unit / Mililitre</i>
CLSI	: <i>Clinical and Laboratory Standarts Institute</i>
dATP	: Deoksiadenintrifosfat
dak	: Dakika
dCTP	: Deoksisitozintrifosfat
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
dH₂O	: Deiyonize su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
EDTA	: Etilendiamin-tetra-asetik asit
EMB Agar	: Eozin Metilen Mavisı Agar
g	: Gram
GN	: Gentamisin
g/L	: Gram/litre
IMP	: İmipenem
ISCR	: <i>Insertion Element Common Region</i>
kb	: Kilo baz çifti
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
µg	: Mikrogram

μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MA	: Moleküler ağırlık
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
P	: Poliklinik
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: <i>Revolutions per minute</i> (dakikadaki devir sayısı)
S	: Servis
sn	: Saniye
SXT	: Trimetoprim-Sulfametoksazol
taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TA	: Trakeal aspirasyon örneği
TBE tamponu	: Tris-borat-EDTA tamponu
TE tamponu	: Tris-EDTA tamponu
w/v	: Ağırlık/Hacim (<i>weight/volume</i>)
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>S. maltophilia</i> 'nin Biyokimyasal Özellikleri	5
Tablo 2. <i>S. maltophilia</i> İçin Zon Çapı ve Mik Yorumlama Standartları	16
Tablo 3. Çalışma Kapsamına Alınan <i>S. maltophilia</i> Kökenlerinin Dağılımı	22
Tablo 4. PZR Analizlerinde Kullanılan Primer Dizileri	29
Tablo 5. İntegraz 1 ve 2 PZR İşlemi İçin Kullanılan <i>Master Mix</i> Bileşenleri	30
Tablo 6. İntegron Sınıf I ve II'nin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı	31
Tablo 7. ISCR2'nin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı	32
Tablo 8. <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , CRF, <i>flo</i> , <i>dfra2</i> , <i>dfr9</i> ve <i>dfrA10</i> 'nun Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı	33
Tablo 9. <i>S. maltophilia</i> Kökenlerinin İzole Edildiği Hastaların Klinik Birimlere Göre Dağılımı	36
Tablo 10. <i>S. maltophilia</i> Kökenlerinin İzole Edildikleri Materyallere Göre Dağılımı	37
Tablo 11. SXT Dirençli Kökenlerin İzole Edildiği Hastaların Klinik Birim ve Materyallere Göre Dağılımı	38
Tablo 12. SXT Dirençli <i>S. maltophilia</i> Enfeksiyonu Görülen Hastaların Taşıdıkları Risk Faktörleri	39
Tablo 13. SXT Dirençli <i>S. maltophilia</i> Üremesi Görülen Hastalarda Bu Organizmaya Eşlik Eden Diğer Bakterilerin Dağılımı	40
Tablo 14. SXT Dirençli <i>S. maltophilia</i> Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları	41

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. %1'lik Fosfotungstik Asit İle Negatif Boyanmış <i>S. maltophilia</i> 'nin Elektron Mikroskopi Görüntüsü	7
Resim 2. 30°C ve 35°C'de İnkübasyon Sonrası Antibiyotiklerin Zon Çapları	10
Resim 3. Agar Dilüsyon Göüntüsü	42
Resim 4. İntegron Sınıf I Bandı Görülen İzolata Ait Jel Görüntüsü	42
Resim 5. <i>sul1</i> Bandı Görülen İzolata Ait Jel Görüntüsü	43
Resim 6. <i>dfrA9</i> , <i>dfrA10</i> , <i>dfrA20</i> Amplifikasyon Ürünlerinin Yürütüldüğü Jel Görüntüsü	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Trimetoprim ve Sulfametoksazol'un Moleküler Yapısı	11
Şekil 2. İntegron Sınıf I'in Yapısı	19
Şekil 3. İntegron Sınıf I, In6 ve In7 Kompleksinin Yapısı	20
Şekil 4. TSM-30 suşunun İntegron Sınıf I Gen Kaseti Nükleotit Dizisi	45
Şekil 5. TSM-30 Suşunun İntegron Sınıf I Gen Kasetinin İçerdiği Direnç Genlerinin Şematik Görüntüsü	45

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Non-fermentatif Gram negatif basil olan *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*)'nın hastane enfeksiyonları ve fırsatçı enfeksiyonlar açısından giderek önemi artmaktadır (1). Özellikle hastane kaynaklı bakteriyemi, kemik iliği enfeksiyonu, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, endokardit, santral sinir sistemi enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı patojendir. Hastanede yatış süresinin uzaması, yoğun bakım ünitelerinde yatış, kronik solunum yolu hastalıkları (kistik fibrozis gibi), geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, malignensiler, immun supresyon, mukokutanöz bariyerin bozulması (mekanik ventilasyon, katater girişimleri, trakeotomi, periton dializi vb.), prematürite gibi risk faktörleri taşıyanlarda görülme sıklığı yüksektir (2).

S. maltophilia dış membran geçirgenliğinde azalma, efluks pompa genlerinin ekspresyonunu artırma, çeşitli enzimlerin üretimi (aminoglikozid modifiye eden enzim, beta-laktamaz vb.) gibi mekanizmaların varlığı nedeniyle aminoglikozidler, beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe direnç gösterir. Bu durum klinisyenlerin ampirik tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır (3, 4).

Son yıllarda farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda, hem etki gücü hem de kullanılabilen hasta profilinin genişliği nedeniyle tedavide ilk tercih olarak önerilen Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT)' ye karşı direnç geliştiği bildirilmeye başlanmıştır (5, 6, 7). Hastanemizde Çaylan ve ark. (8) tarafından yapılan bir çalışmada 2000-2001 yılları arasında izole edilen kökenlerin %2.3'ü SXT dirençli bulunmuşken, 2001-2008 yıllarında Mutlu ve ark. (9) yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen kökenlerle yaptıkları çalışmada %13 oranında SXT direnci belirlemişlerdir. Tespit edilen bu oranlar bizim coğrafi bölgemizde de giderek artan bir direnç sorunu olduğuna işaret etmektedir. Direnç oranlarının saptanması, etkili tedavi protokollerinin planlanmasına olanak vermektedir. Aynı zamanda hastalar arası bulaşı ve sağlık personeli ile aktarımı engelleyecek enfeksiyon kontrol çalışmalarına yol göstermektedir (5).

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarına 2006-2011 yılları arasında tüm birimlerden gönderilmiş olan hasta örneklerinden izole edilen SXT dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarında bu dirence neden olduğu bilinen genlerin (*sul1*, *sul2*, *dhfr*, *ISCR* gen bölgeleri ve Sınıf I, II integron genleri) varlıkları ve kökenlerin izole edildiği hastaların klinik takip dökümanları incelenerek risk faktörleri ile arasındaki ilişkinin irdelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe

Latince “üremesi için çok az besine ihtiyaç duyan ve malt seven bakteri” anlamına gelen *Stenotrophomonas maltophilia* (“stenos”; dar, “trophos”; besleyen, “monas”; birim, “malt”; filizlemiş tohum, “philia”; sevmek) ilk kez 1943 yılında J. L. Edwards tarafından plevral sıvıdan izole edilmiş ve “*Bacterium bookeri*” olarak isimlendirilmiştir (10). Hugh ve Ryschenkow (11) oral karsinomlu bir hastanın orofaringeal sürüntü örneğinden izole ettiği bakterinin adını morfolojik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı 1961 yılında “*Pseudomonas maltophilia*” olarak değiştirmiştir. Swings ve ark. (12) 1981 yılında DNA-rRNA hibridizasyon tekniklerini kullanarak bu türün *Xanthomonas* cinsine ait olduğu düşünülerek “*Xanthomonas maltophilia*” olarak yeniden sınıflandırmıştır. Palleroni ve Bradbury (12) 1993’te yaptıkları çeşitli taksonomik çalışmalar sonucunda flajella sayısı, nitrat redüksiyonu, ekstrasellüler polisakkarit yapısı gibi birçok fizyolojik ve 16S rRNA amplifikasyonlarında bantların uyumsuzluğu, DNA yapısındaki guanin-sitozin nükleotidlerinin toplam sayısı gibi bazı genomik farklılıklar saptamaları sonucu bakterinin ne “*Pseudomonas*” ne de “*Xanthomonas*” cinsine ait olmadığını göstermişlerdir. Böylece “*Stenotrophomonas*” adında yeni bir cins tanımlanmış; “*Stenotrophomonas maltophilia*” türü ise bu cinsin tek üyesi olarak yerini almıştır (10). Son yıllarda bu cins içinde altı farklı tür daha bulunduğu gösterilmiştir: *S. maltophilia*, *S. nitritireducens*, *S. acidaminiphila*, *S. rhizophila*, *S. koreensis*, *S. humi*, *S. terrae* (13, 14).

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

2.1.2.1. Morfolojik, Metabolik ve Üreme Özellikleri

S. maltophilia Gram negatif boyanan, düz ya da hafif kıvrık, 0,5 - 1,5 µm boyutunda, tek veya çiftler halinde görünen basil morfolojisinde bir bakteridir. Polar flajelları sayesinde hareketlidir ve spor oluşturmaz (10, 15).

Zorunlu aerob olan *S. maltophilia*, normal atmosferde veya %5 CO₂'li ortamda üreyebilir. En iyi 35°C'de üremekle birlikte 5-40°C arasında üreyebilir (10).

Mikrobiyoloji laboratuvarında rutin kullanılan %5 koyun kanlı agar, Eozin Metilen Blue (EMB) agar, Mueller-Hinton agar (MHA) gibi besiyerlerinde ürer ancak bazı kökenler metiyonin, sistein veya glisine ihtiyaç duyar (3, 10, 16). Kanlı agarda açık sarı ya da lavanta yeşili; EMB agar, MacConkey agar gibi besiyerlerinde laktöz negatif şeffaf; MHA gibi saydam besiyerlerinde kahverengimsi pigmenti olan, düzgün kenarlı, parlak koloniler oluşturur. Kanlı agarda beta-hemoliz oluşturur ancak bazen hemolizin gözlenmesi üç güne kadar uzayabilir (10, 16). Çevre örnekleri ve solunum sistemi sekresyonları gibi steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklerin VIA agar (vankomisin, imipenem, amfoterisin B) gibi antibiyotik içeren selektif besiyerlerine ekilmesiyle diğer bakterilerin baskılanması önerilmektedir (3, 16).

2.1.2.2. Biyokimyasal Özellikleri

Non-fermentatif bakteri grubunda olan *S. maltophilia* maltozdan asit oluşturabiliyor olmasına rağmen glukozu fermente edemez. Katalaz testi pozitif olan bakteri eskülin hidrolizi yapar ve DNaz üretir. Oksidaz, fenillalanin deaminaz, indol, metil red ve üreaz testleri negatiftir (10, 16). Biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *S. maltophilia*'nın Biyokimyasal Özellikleri (10).

Test	Reaksiyon	Test	Reaksiyon
İndofenol oksidaz	- ^a	Hidroliz	
Katalaz	+ ^b	Eskülin	+
Üreme		Jelatin	+
5°C	-	Tween 80	+
18°C	+	DNA	+
37°C	+	Nişasta	-
Hareket		Üre	-
18°C	+	Karbon kaynağı	
37°C	D ^c	Adonitol	-
İndol	-	Arabinoz	-
Lizin-dekarboksilaz	+	β-Hidroksibutirat	-
Ornitin-dekarboksilaz	-	Sellobioz	D
Metil red	-	Dulsitol	-
Voges-Proskauer	-	Glukoz	+
Hidrojen sülfid	-	Fruktoz	D
Nitrat redüksiyonu	D	Galaktoz	D
Sitrat	D	Mannitol	-
Fenilalanin deaminaz	-	Mannoz	D
β-Galaktosidaz (ONPG)	D	Ramnoz	-
		Salisin	-
		Sorbitol	-
		Trehaloz	-

^a -: <% 15 pozitif^b +: >% 85 pozitif^c D: % 16 - 84 pozitif

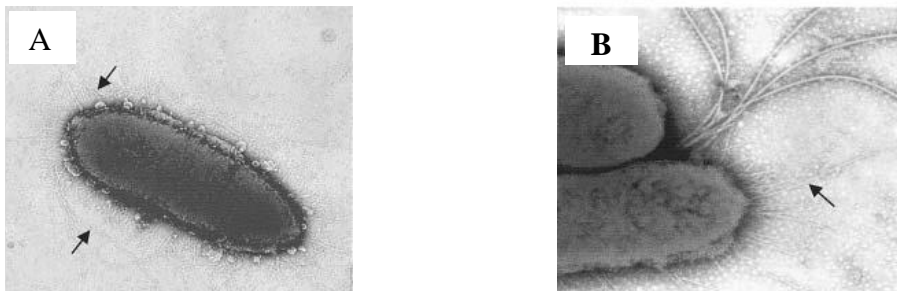
2.1.2.3. Yapısal Özellikleri

S. maltophilia'nin diğer Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısına benzer duvar yapısı vardır. Somatik O ve flajellar H antijenleri bulunmaktadır (10, 11). En sık O3 antijeni saptanmakla birlikte toplam 31 adet O antijeni bulunmakta ve bu antijenler epidemiyolojik çalışmalarda bakteri tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (10, 17). Ayrıca somatik antijenlerinin *Brucella spp.*, *Renibacterium salmoninarum*, *Legionella pneumophila* ile çapraz reaksiyon verdiği gösterilmiştir (10).

S. maltophilia'nin hücresel yağ asidi oranı dallanan yağ asitleri yönünde fazladır. Ayrıca kendisine benzer diğer bakterilerden farklı olarak 2-hidroksi-9-metildekanoik asit, 3-hidroksi-9-metildekanoik asit ve 3-hidroksi-11-metildodekanoik asit dallanan zincirli hidroksi yağ asitlerini içermesi bakteriyi tanımlamada kullanılmaktadır (10, 18).

Elektron mikroskopisiyle yapılan çalışmalarda bazı kökenlerde tek flajella bulunurken bazılarında birden fazla bulunduğu görülmüştür. Yaklaşık 45 nm genişliğinde, 15 µm uzunluğunda filamentleri olan polar flajellaları bulunması bakteriyeye hareketli olma özelliği kazandırmaktadır. *S. maltophilia* flagellasının SM_{FliC} adı verilen 38 kDa'luk yapısal proteini bulunmaktadır (14, 19, 20).

S. maltophilia, elektron mikroskopisinde 5-7 nm genişliğinde görünen fimbriaları sayesinde epitel hücrelerine ve katater gibi plastik yüzeylere tutunabilir. Fimbrial adherans ya bakterinin direkt olarak konak hücreye bağlanmasıyla ya da birlikte kolonizasyon yaptığı bakterilerle gerçekleştirilir. Fimbrialarında SMF-1 adı verilen 17 kDa'luk fibrin altbirimlerden oluşan bir polipeptid yapısı bulunmaktadır (19).



Resim 1. %1'lik Fosfotungstik Asit İle Negatif Boyanmış *S. maltophilia*'nin Elektron Mikroskopi Görüntüsü (19). A: Pili Görüntüsü, B: Flagella Görüntüsü

S. maltophilia'nin önemli yapılarından biri de efluks pompa sistemidir. Efluks pompası; membran füzyon proteini, enerji bağımlı taşıyıcı ve dış membran proteininden

oluşmaktadır. Hücre membranında bulunan bu yapı proton göçü mekanizmasıyla bakterinin içindeki maddeleri dışarı atar. Böylece hücreye zarar verecek olan antimikrobiyaller gibi maddeler uzaklaştırılmış olur (21, 22). *S. maltophilia*'da efluks pompası ilk kez 2000 yılında Alonso ve Martinez tarafından *smeDEF* ismiyle tanımlanmıştır (22). Western-blot yöntemiyle yapılan çalışmalar, pompanın varlığının eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve kinolonlarda MİK yükselmesine neden olduğunu göstermiştir (22, 23). *SmT* geni, *smeDEF* pompa sistemini baskılayıcı bir gen bölgesidir. Eğer *SmT* geninde mutasyon gelişirse kökenlerin *smeDEF* pompasını aşırı ürettiği tespit edilmiştir (21, 24). Li ve ark (25) 2002 yılında *SmeABC* pompa sistemini keşfetmişlerdir. Bu sistemde sadece *SmeC* dış membran proteini antibiyotik direncinden sorumludur ve tek başına L2 beta-laktamaz üretimini artırmaktadır (21). Sözü edilen sistemlerin dışında *SmeJ*, *SmeK* ve *SmeZ* gibi diğer efluks pompa sistemleri de intrensek dirence neden olmaktadır (3).

2.1.2.4. Genomik Özellikleri

S. maltophilia'nın genetik yapısı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (10). *Repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction* (REP-PCR) yöntemiyle *gyrB* ve DIR primerleri kullanılarak 5 (A-E) farklı genotipi olduğu gösterilmiştir (26, 27).

İmmünolojik olarak insan koryonik hormonuna (hCG) benzeyen koryonik gonadotropin benzeri hormon sentezleyen bir gen bölgesi belirlenmiştir. Bu gen bölgesi aynı zamanda L1 ve L2 beta-laktamaz enzimlerini de kodlamaktadır (10).

2.1.2.5. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Fimbriyaları ve flajellasının varlığı ile epitel hücrelerine ve plastik, cam, teflon gibi inorganik yüzeylere tutunabilir (10, 19, 20, 28). Hücrelere tutunmanın ardından ekstrasellüler enzimler salgılayarak dokulara invazyon başlar. Bu ekstrasellüler enzimler DNaz, RNaz, fibrinolizin, lipaz, proteaz, elastazdır. En önemli virülans faktörü *StmPr1* geni tarafından kodlanan alkalın serin proteaz grubundan olan proteaz enzimidir. Bu enzim kollajen, fibronektin ve fibrinojenin protein komponentlerini yıkar; lokal doku hasarı ve hemoraji oluşturur (23, 29). Bottone ve ark (10) yaptıkları bir çalışmada lösemi hastalarında görülen *P. aeruginosa* sepsisi ile ilişkili ektima gangronosumda, *S.*

maltophilia'nın görülmesinin patogeneizde rol oynayan proteaz ve elastaz salınımını artırdığını tespit etmişlerdir.

S. maltophilia'nın dış membranında polisakkarid yapısının olması önemli virülans faktörlerinden biridir. Bu yapı bakterinin kolonizasyon yapmasıyla ve kompleman aracılıklı hücre savunmasından korunmasıyla ilişkilidir. Lipopolisakkarid yapısında bulunan Lipid A komponenti, alveolar makrofajları ve monositleri uyarak tümör nekroz faktör α (TNF α) üretimini artırıp inflamasyon oluşumunda rol oynar. Aynı zamanda *S. maltophilia* interlökin-8 (IL-8) salınımını ve polimorfonükleer lökosit göçünü uyarmaktadır (29).

S. maltophilia'yı konak savunma sisteminden koruyan ve antimikrobiyal ajanların bakteriye karşı etkinliğini azaltan biyofilm yapısının oluşum mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Ancak yayınlanan çalışmalar bakterinin pozitif yüklü hücre yüzeyinin santral venöz katater, üriner sistem kataterleri ya da kalp kapakçıkları gibi negatif yüklü organik olmayan yüzeylere tutunduğunu göstermiştir. Biyofilm oluşumu ise bakterinin ekstrasellüler slime faktör (glikokaliks) ve ekpolisakkarit matriks üretmesiyle yakın hücrelerin birbirine ve yüzeylere yapışması sonucu gerçekleşir. Di Bonaventura ve ark (21) yaptıkları çalışmada bakterinin 2 saatlik inkübasyon sonrasında polistren tabakaya hızla yapıştıklarını ve biyofilm formasyonunun 24 saatte maksimum düzeye çıktığını göstermişlerdir.

Son yıllarda glukoz-1-fosfat timidiltransferaz (*rmlA* geni) ve sis-11-metil-2-dodekanoik asit (*rpfF* geni) gen bölgelerindeki mutasyonların biofilm formasyonunu azalttığına dair yayınlar raporlanmıştır. Bu genlerin yanı sıra, *P. aeruginosa*'da lipopolisakkarit ve aljinat sentezinden sorumlu olan *algC* genine homolog özellik gösteren, fosfoglukomutaz ve fosfomannomutaz enzim aktivitelerinden sorumlu *spgM* bulunmaktadır. *S. maltophilia*'nın *spgM* geninde mutasyon gerçekleşmesiyle kompleman aracılıklı hücre lizisine duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Bu mutasyon aynı zamanda lipopolisakkarit yapısında değişiklikler meydana getirerek bakterinin antibiyotiklere olan direncini de azaltmaktadır (30, 31, 32).

Total parenteral nutrisyon sıvısı ve diyaliz sıvılarında canlı kalıp çoğalabilmektedir. Diyaliz sıvısında düşük moleküler ağırlıklı pirojenler salgılayarak hastalarda pirojenik reaksiyonlara yol açtığı düşünülmektedir (10).

Quorum sensing sistemi bakterinin regülasyon mekanizmasıdır. N-açil homoserin lakton yapısındaki sinyal molekülleri salgılayarak uygun olmayan çevresel koşullara adaptasyon sağlayabilir (33, 34).

2.1.3. Antibiyotiklere Direnci

2.1.3.1. Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç

S. maltophilia beta-laktam grubu antibiyotiklerin çoğuna dirençlidir ve dirençten beta laktamaz ailesine ait olan L1 ve L2 beta-laktamaz enzimleri sorumlu tutulmaktadır (10). Bu enzimlerin ekspresyonu kromozomal genler tarafından düzenlenmektedir (21).

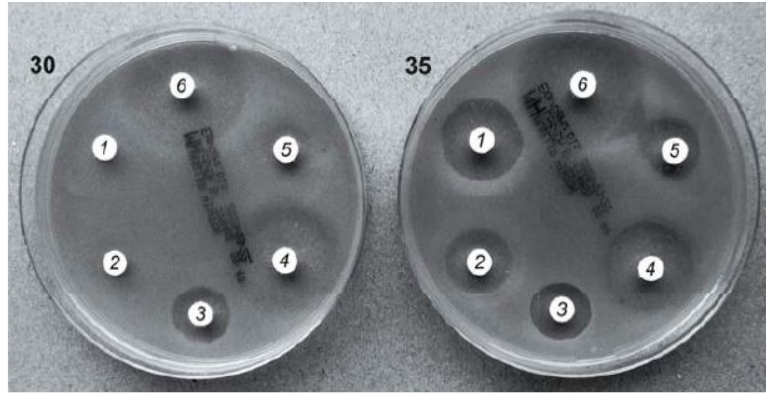
Hemen hemen tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere dirence sebep olan L1-metallo-beta-laktamaz; 18 kDa ağırlığında, homotetramer yapısında, aktifleşmek için Zn^{+2} 'ya ihtiyaç duyan bir enzimdir. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemleri hidrolize edebilirken, monobaktamlara etkili değildir. L2 serin-beta-laktamaz ise sefalosporinaz grubundan olup aztreonamı hidrolize edebilmektedir. Beta-laktamaz inhibitörlerinden klavulanik asit tarafından L1 beta-laktamaz inhibe olmazken, L2 beta-laktamaz parsiyel olarak inhibe olur (21).

Avison ve ark (21) 2000 yılında klinik örnekten izole ettikleri bir kökende transpozon ile bakteri genomuna aktarılmış TEM-2 beta-laktamaz genini tespit etmişlerdir. Bu bulgu *S. maltophilia*'nın mobil beta-laktamazlar için rezervuar görevi üstlenebileceğini düşündürmektedir.

2.1.3.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç

S. maltophilia'nın aminoglikozidlere karşı direncinde pek çok mekanizma rol oynamaktadır. O-nükleotidiltransferaz, O-fosfotransferaz ve 6'N-asetiltransferaz grubu enzimler aminoglikozidleri modifiye etmektedirler. Özellikle *aac(6')-Iz* enzimi gentamisin direncine neden olmaktadır (3, 10, 21).

S. maltophilia ısıya bağlı dış membran değişikliği yaparak aminoglikozid ve polimiksin B grubu antibiyotiklere duyarlılığını azaltmaktadır. Bu direnç 30°C'de gözlenirken 37 °C'de görülmez. Sıcaklık değişimiyle bakteri membranında bulunan lipopolisakkarid yapısındaki O-polisakkarid ve fosfat parçalarının büyüklüklerini değiştirmekte ve bu değişim sonucu membranın akışkanlığı bozulmaktadır (3, 10, 16, 21).



Resim 2. 30°C ve 35°C'de İnkübasyon Sonrası Antibiyotiklerin Zon Çapları.
1:Amikasin, 2:Gentamisin, 3:Kolistin, 4:Ofloksasin, 5: Seftazidim, 6:SXT (3)

Efluks pompaları ve hedef bölgelerin değişimi (16S rRNA metilasyonu veya ribozomal mutasyonlar) gibi nedenlerle de aminoglikozidlerin etkinliği azalabilir (3, 21).

2.1.3.3. Kinolon Direnci

Kromozomal olarak taşınan ya da plazmid aracılıklı alınan *SmQnr* geni, *S. maltophilia*'nın hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV enzimlerini kinolonların etkisinden korumaktadır. Ayrıca *SmeDEF* pompası bu grup antibiyotiklere dirençte önemli görev almaktadır (3, 35). SENTRY'nin (Antimicrobial Surveillance Program) 1997-2003 yılları arasında tüm dünyadan topladıkları 2076 kökende yaptığı antimikrobiyal etkinlik çalışması sonucunda yeni kinolonların daha etkili olduğu gösterilmiştir: siprofloksasin %30.9 iken levofloksasin % 86.1, ganfloksasin ise % 69.6 oranında duyarlı bulunmuştur (7).

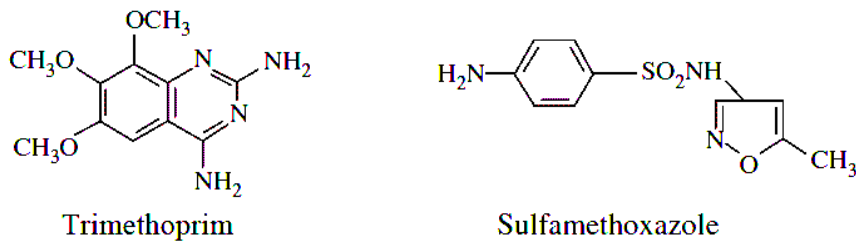
2.1.3.4. Makrolid Direnci

S. maltophilia efluks pompaları kullanarak ve membran geçirgenliğinde oluşturduğu azalma ile makrolidlere duyarlılığını oldukça azaltmayı başarmıştır. Bu mekanizmaların yanı sıra Gram-pozitif bakterilerden gen transferi yaparak ağır metallere ve antibiyotik gruplarına karşı farklı direnç mekanizmaları edinmektedir. Alonso ve ark. (36) daha önce *Staphylococcus aureus*'da gösterilmiş olan eritromisine karşı direnç

oluşturan *mphBM*, kadmiyumun hücreden atılmasını sağlayan *cadC* ve *cadA* gen bölgelerinin plazmid aracılığıyla *S. maltophilia* 'ya aktarılabilceğini göstermişlerdir.

2.1.3.5. Trimetoprim-Sulfametoksazol Direnci

Trimetoprim-sulfametoksazol düşük maliyeti, uygun toksisite profili, hem oral hem parenteral yoldan uygulanabilmesi, kuvvetli bakterisidal etkisinin varlığı gibi avantajları olması nedeniyle birçok patojene karşı tüm dünyada kullanılmaktadır (37). Trimetoprim ve sulfonamid grubundaki sulfametoksazolün 1/19 oranında birleştirilmesiyle oluşmuştur (38). Trimetoprim ve Sulfametoksazol'ün moleküler yapısı şekil 1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 1. Trimetoprim ve Sulfametoksazol'ün Moleküler Yapısı (37)

Bakteriler memelilerden farklı olarak DNA sentezi için gerekli olan folik asidi kendileri sentezler, memeliler ise vitamin olarak dışardan alırlar. Trimetoprim ve sulfametoksazol birbirini takip eden iki basamağı engelleyerek bakterilerin folik asit sentezini engellerler. Sülfonamidler, p-aminobenzoik asit (PABA) ile yarışmaya girerek dihidrofolat sentezini engellerler. Trimetoprim ise dihidrofolat redükaz enzimini inhibe ederek dihidrofolattan tetrahidrofolat üretimini engeller. Bu inhibisyon timidin, bazı pürinler, metiyonin ve glisin oluşumunu bloke eder (2, 15).

SXT'nin etki spektrumu oldukça geniştir. Birçok Gram pozitif kok ve *Pseudomonas aeruginosa* hariç çoğu Gram negatif basile etkilidir. Akut ve kronik üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi ve profilaksisinde mükemmel sonuçlar gösterir. Komplikasyonsuz ürogenital gonore, şankroid, seyahat diyaresi, Whipple hastalığı, *Pneumocystis jirovecii* pnömonisinin tedavisinde kullanılmaktadır. Etkili olduğu diğer mikroorganizmalar: *Brucella* türleri, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Isospora belli*, *Cyclospora* türleridir (2, 39, 57).

Yapılan pek çok çalışmada *Streptococcus pneumoniae*'da bu ilaca karşı %10–50 direnç gösterilmiştir. Enterokoklar üremek için sadece timidin kullandıkları ve folik asidi ekzojen olarak alabildikleri için SXT'ye dirençlidir. *Mycobacterium tuberculosis* bu antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalar arasındadır. Son yıllarda etkili olduğu bilinen pek çok enterik bakteride direnç gözlenmeye başlamıştır (2, 39).

SXT, *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde CLSI tarafından önerilen ilk ilaçtır (38). Fakat son yıllarda bu ilaçla ilgili pek çok direnç oranı yayınlanmaya başlamıştır. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program'ın 1997–1999 yıllarında beş coğrafik bölgeden toplanan kökenlerde yapılan araştırma sonucunda Kanada ve Latin Amerika'da SXT direnci %2 oranında saptanmışken, Avrupa'da bu oran %10'ları bulmuştur (40); 1997–2001 tarihleri arasında yaptıkları incelemede ise genel olarak tüm bölgelerde SXT direnç oranını %5 olarak belirlemişlerdir (41). Pediatrik yaş grubunda yaptığı çalışmada ise 2004 yılında SXT direnç oranı %3.8 olarak bildirmiştir (42). Malezya'da dördüncü basamak araştırma hastanelerinde 2008 yılında izole edilen 64 *S. maltophilia* kökeninden bir tanesinde SXT direnci belirlenmiş (43). Suudi Arabistan'ın tüm coğrafi bölgelerini kapsayan bir çalışmada ise şaşırtıcı olarak %20.5 gibi yüksek bir oran bulunmuştur (44). Türkiye'de Tatman Otkun ve ark. (45) dördüncü basamak üniversite hastanesinde 1998-2002 yılları arasında izole ettikleri 52 kökende bu antibiyotiğe direnci %1.9 şeklinde saptamışken, hastanemizde 2000-2001 yıllarında Çaylan ve ark (8) inceledikleri 44 kökende %2.3 olarak tespit etmişlerdir.

S. maltophilia'nın horizontal geçişle Gram pozitif bakterilerden bile antibiyotik direnç genleri alabileceği gösterilmiştir. İntegronlar bu aktarımda önemli rol oynamaktadır. Özellikle *sull* veya *sul2* sulfonamid direnç genlerini taşıyanlar son yıllarda sıkça rapor edilmektedir. Benzer şekilde bir aktarımla dihidrofolat enzim inhibisyonu yapan *dhfrA* genlerini elde etmesiyle bakteri trimetoprime karşı da direnç kazanmış olmaktadır (3, 6, 46, 47).

Küçük koloni varyasyonlarının oluşumu ve biyofilm formasyonu SXT'ye direnç gelişimine sebep olan diğer mekanizmalardır. Ancak bu konularda çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (46).

2.1.4. Epidemiyoloji

Stenotrophomonas maltophilia kaynak suları, toprak, bitki gibi doğal ortamlarda yaşar. Bitkilerin (buğday, yulaf, mısır, salatalık, üzüm, patates vb.) rizosferine yerleşir ve

patojenlere karşı antagonistik etki göstererek bitkilerin gelişmelerine katkı sağlar. Ayrıca bakterinin musluk suyu, kanalizasyon atıkları, pişmemiş süt, donmuş balık, insan ve hayvan feçesinde ürediği gösterilmiştir (4, 14, 15, 16, 40).

Hastane ortamında yaygın olarak bulunan *S. maltophilia*; infüzyon solusyonları, steril sular, musluk suları, plastik şişeler, dezenfektanlar, preoperatif temizlik malzemeleri gibi bölgelerde kontaminant olarak tespit edilmiştir (3, 16, 29). Yapılan pek çok çalışma bakterinin gastrointestinal sistem, orafarenks, vajen ve sağlık personelinin ellerinde kolonize olabileceğine dair bilgiler sunmaktadır (10).

S. maltophilia'nın az sayıda olguda toplum kaynaklı enfeksiyonları rapor edilmiş olsa da genellikle karşımıza hastane kaynaklı enfeksiyonlar şeklinde çıkmaktadır (29, 40, 48, 49). Klinik örneklerden izole edilen nonfermentatifler arasında *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp*'den sonra üçüncü sırada yer almaktadır (10, 41, 44). *S. maltophilia* izolasyon hızı araştırma yapılan hastaneye ve coğrafik bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; İspanya'da yapılan bir çalışmada izolasyon oranı 100,000 hastada 3.4-12.1 arasında saptanmışken, Almanya'da 34 yoğun bakım ünitesi incelendiğinde 1000 hastada 0-7.6 arasında olduğu gözlemlenmiştir (29). Bununla birlikte tüm dünyada farklı hastanelerde yapılan araştırmalarda *S. maltophilia* görülme insidansının %7.1-37.7 arasında değişmekte olduğu görülmüştür (21).

2.1.5. Risk Faktörleri

S. maltophilia kolonizasyonu veya enfeksiyonu ile ilgili risk faktörleri

- malignensi,
- immunitiyi baskılayan sistemik hastalık,
- kronik solunum yolu hastalıkları,
- ventilatör ilişkili pnömoni,
- santral venöz katater,
- uzun süre hastanede yatış,
- invaziv işlemler,
- geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi,
- total parenteral nutrisyon ile beslenme

şeklinde sıralanabilir (21, 29, 48, 50). Hastaların *S. maltophilia* ile karşılaşma anındaki klinik durumları enfeksiyonun mortalitesi ile doğrudan ilişkilidir (50, 51).

Pankreas, ter bezleri gibi salgı bezlerini tutan hastalıklar, solunum sistemini etkileyen kistik fibrozis veya kalıtsal metabolik hastalıklara sahip olan kişilerde *S. maltophilia* genellikle kolonize olmaktadır (21).

Kistik fibrozisli hastalarda yapılan araştırmalarda son yıllarda *S. maltophilia* enfeksiyonlarının görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir. Örneğin Hollanda'da bir üniversite hastanesinde izlenen takiplerde 2002 yılında *S. maltophilia* prevalansı %1.4 iken 2007 yılında %10'a ulaşmıştır (52); Parkins ve ark (53) ise kolonizasyon oranını % 4-15 şeklinde ifade etmişlerdir.

2.1.6. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

S. maltophilia ile ilişkilendirilmiş hastalıklar:

- kan akımı enfeksiyonu,
- endokardit,
- pnömoni,
- mastoidit,
- deri ve yumuşak doku enfeksiyonları,
- kemik ve bağ dokusu enfeksiyonları
- üriner sistem enfeksiyonları,
- menenjit,
- intra-abdominal enfeksiyonlar,
- endoftalmit

şeklinde sıralanabilir (21, 49). SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans programı 1997-1999 sonuçlarına göre bu klinik tablolar arasında en sık solunum yolu enfeksiyonlarının görüldüğü belirtilmiştir. Tüm coğrafik bölgeler yıllara göre *S. maltophilia* pnömonisi görülen vakalar yönünden sıralandığında en yüksek oranların %4.7-6.1 ile Kanada'ya ait olduğu gösterilmiştir. Kan dolaşımı enfeksiyonları incelendiğinde ise, tüm coğrafik bölgelerde ortalama %0.8 prevalansa sahip olduğu belirtilmiştir; en yüksek oran ise %1.3 ile Asya-Pasifik bölgesine aittir. Yara ve üriner sistem enfeksiyonlarının ise <%1-1 oranı ile oldukça nadir olduğu belirlenmiştir (40).

2.1.7. Laboratuvar Tanısı

S. maltophilia rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan kanlı, çikolatamsı, EMB agarda; normal atmosferde; 37°C’de bir gecelik inkübasyon sonrası kolaylıkla ürer. Floral bölgelere alınan örnekler VIA gibi *S. maltophilia* için seçici besiyerlerine ekilerek ayırd edilmeleri kolaylaştırılabilir (10).

Tiplendirmede biyokimyasal testlerin yanı sıra otomatize ve yarı otomatize sistemler de kullanılabilir (2).

Tiplendirme işlemlerinde, koloni yapıları ve biyokimyasal reaksiyonlara benzer yanıtlar vermesi nedeniyle diğer nonfermentatif Gram negatif basillerle karıştırılabilir. Bu durumlarda DNaz testi önem kazanmaktadır (2, 16).

Fenotipik yöntemlerle tiplendirmede problemlerin çıkması üzerine Whitby ve ark (54) duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olan türe özgü rRNA amplifiye eden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)’yi geliştirmişlerdir.

Epidemiyolojik amaçlı araştırmalarda veya nazokomiyal salgınlarda türler arasındaki ilişkiyi incelemek için pulsed-field jel elektroforez (PFGE) kullanılarak tüm genom makrorestriksiyon profili analizi ile genotiplendirme yapılmaktadır. *S. maltophilia*’nın genotiplendirilmesinde PFGE’den farklı olarak *Randomly Amplified Polymorphic DNA Typing* (RAPD), *Respetitive Sequence PCR Typing* gibi çeşitli PZR temelli yöntemler de kullanılmaktadır (2).

2.1.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Trimetoprim-sulfametoksazol en etkili ajandır, ABD’de birçok laboratuvar sadece SXT aktivitesini bildirmekte, isteğe bağlı olarak minosiklin, seftazidim, tikarsilin-klavulonat, siprofloksasin ve levofloksasin duyarlılıklarını çalışmaktadır. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI), SXT disk diffüzyon duyarlılık testi kriterlerini belirlemiş olsa da bu ajan için sıvı dilüsyon ya da agar dilüsyon yöntemlerinin çalışılması önerilmektedir (2). CLSI’ın belirlediği zon çapları ve MİK değerleri tablo 2’de gösterildiği gibidir.

Tablo 2. *S. maltophilia* İçin Zon Çapı ve MİK Yorumlama Standartları (38)

Test/ Bildirim Grubu	Antimikrobik İlaç	Disk İçeriği	Zon çapı sınır değerleri Yaklaşık mm			MİK Yorumlama Standardı (µg/mL)		
			S ^a	I ^b	R ^c	S	I	R
β-LAKTAMAZ/ β-LAKTAMAZ İNHİBİTÖR KOMBİNASYONLARI								
B	Tikarsilin- klavulanik asit	-	-	-	-	≤16/2	32/2- 64/2	≥128/ 2
SEFEMLER								
B	Seftazidim	-	-	-	-	≤8	16	≥32
TETRASİKLİNLER								
B	Minosiklin	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
FLOROKİNOLONLAR								
B	Levofloksasin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
FOLAT YOLU İNHİBİTÖRLERİ								
A	Trimetoprim- sufametoksazol	1.25/ 23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76
FENİKOLLER								
B	Kloramfenikol	-	-	-	-	≤8	16	≥32

a: Duyarlı

b: Orta derece duyarlı

c: Dirençli

2.1.9. Tedavi

S. maltophilia enfeksiyonlarının tedavisi yüksek düzey intrinsek direnç ve giderek artan kazanılmış direnç olması nedeniyle çözümü zor bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan in-vitro çalışmalar kombine ilaçların monoterapilerden daha etkili olduğunu göstermiştir. Tedavide ilk seçenek olarak SXT önerilmektedir. Fakat hipersensitivite reaksiyonları gelişmesi ve hastaların intoleransı ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. SXT kullanılmayan hastalarda ikinci tercih olarak tikarsilin-klavulanat önerilmektedir (6, 29, 41, 46).

Aztreonam ve klavulanik asit kombinasyonu da tedavi seçenekleri arasında bulunmaktadır ve bu kombinasyona tikarsilin eklendiğinde etki gücünün arttığı gösterilmiştir (29, 46).

İn-vitro çalışmalarda üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin, özellikle seftazidimin, aktivitesi gösterilmiş olsa da bu antibiyotiklere hızla direncin geliştiği

unutulmamalıdır. Direnç gelişiminde indüklenebilir beta-laktamazlar suçlanmış ve beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmiştir ama in-vitro etki gözlenmemiştir.

Klinafloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, trovafloksasin gibi yeni florakinolonların *S. maltophilia* üzerine siprofloksasin ve levofloksasinden daha etkili oldukları görülmüştür. Bu antibiyotiklerin etkisi doz bağımlıdır ve akciğerlerdeki konsantrasyonu serumdakinin beş katına ulaşabilmektedir. Yukarıda söz edilen diğer antibiyotikler gibi bu gruba da hızla direnç gelişmektedir; bu nedenle kullanımda tedbirli olunmalıdır (6, 29, 41, 46).

Kloramfenikolün sulfonamid ve gentamisin ile kombine tedavisinin 1970'lerde menenjit vakalarında başarılı olduğu görülmüş fakat sonra yan etkilerinden dolayı bu ilaç terk edilmiştir (29).

Tetrasiklin türevi olan minosiklin ve doksisisiklin antibiyotiklerinin in-vitro etkinliği gösterilmiştir, ama bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Diğer nonfermentatif Gram negatif basillerde etkili olan geniş spektrumlu tigesiklinin *S. maltophilia* üzerine etkisi oldukça iyi bulunmuş, hatta SXT dirençli kökenlerin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Ancak bu konuda yapılan çalışma sayısı yetersizdir. Benzer şekilde kolistin ve polimiksin B'nin başarı düzeyi %70'lerde bulunmuş olmasına rağmen duyarlılık testlerindeki sorunların giderilmesi ve in-vitro elde edilen bilgilerin klinik değerinin tam olarak anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (6, 29, 46).

2.1.10. Prognoz

Klinisyenlerin nonfermentatif Gram negatif bakterilerin enfeksiyonlarını tedavi etmede kısıtlı antibiyotik seçeneklerinin bulunması, bu enfeksiyonların mortalite oranlarını yükseltmektedir (41). Falagas ve ark (48) 2009 yılında yayınladıkları derlemede *S. maltophilia* enfeksiyonuna bağlı ölüm oranının %37.5'e kadar yükseldiğini belirtmişlerdir. *S. maltophilia* bakteriyemisinin mortalite oranı %26.7 olarak görülmüş ve kontrol altına alınamayan olgularda bu oranın %21–69 arasında değiştiği saptanmıştır (21, 50). Hanes ve ark (50) yoğun bakım ünitelerinde takip edilen pnömoni hastalarını incelemiş ve *S. maltophilia* enfeksiyonuna bağlı ölüm oranını yaklaşık %23.1 olarak kaydetmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada kanser hastalarında altta yatan nedenin hematolojik hastalıklar olması ve yoğun bakım ünitelerinde kalmaları mortalite açısından bağımsız risk faktörü olarak tanımlanmıştır. SXT dirençli *S. maltophilia* enfeksiyonunun mortalitesinde ise organ disfonksiyonu bağımsız risk faktörü olarak gösterilmiştir (50).

2.1.11. Korunma

S. maltophilia enfeksiyonunu önlemede sürveyans programları oldukça önemli yer tutmaktadır. Bu programlar *S. maltophilia*'nın kolonizasyon ve enfeksiyon oranlarını ve buna bağlı olarak antibiyotik tüketimlerini içermelidir. Uzun süreli antibiyotik tedavisi uygulanan veya santral venöz katater gibi yabancı maddeler kullanılan hastaların takibinde gerekli tedbirler alınmalıdır. Ayrıca solunum yolu ekipmanları, hemodiyalizatörler, ameliyatta kullanılan malzemelerin gerekli bakımlarının yapılması ve uygun sterilizasyon yöntemlerinin kullanılması göz önünde tutulması gereken diğer noktalardır. Nazokomiyal epidemilerde sağlık personelinin el hijyen kurallarına uyması kolonizasyonu önleyecektir; bu nedenle düzenli eğitim programları uygulanmalıdır (10, 29).

2.2. Antibiyotik Direnci Oluşturan Gen Dizileri

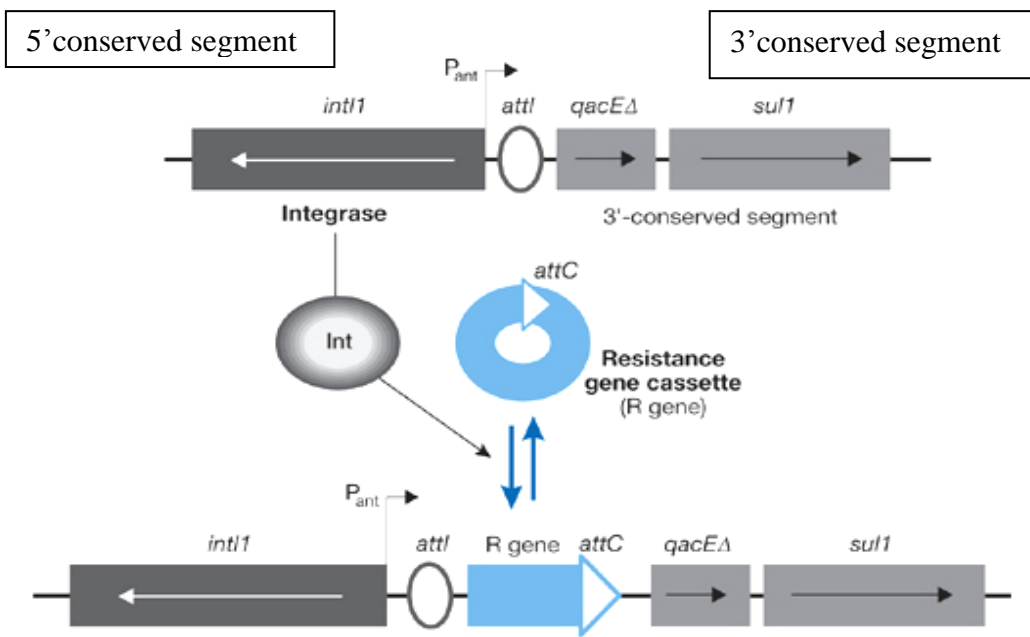
2.2.1. İntegron Gen Kasetleri

Yaklaşık son elli yıldır bakterilerde çoklu ilaç gelişiminin asıl nedeninin bakterilerin plazmid veya transpozon gibi mobil gen bölgeleriyle ekzojen genleri bünyelerine dahil etmeleri olduğuna işaret edilmektedir (55).

İntegron; kromozom, transpozon ve plasmidler üzerinde bulunabilen, çoğunlukla antibiyotik direnç genlerini içeren, mobil gen kasetlerinin integrasyonunu ve ekspresyonunu sağlayan gen bölgeleridir (56). Mobil ve kromozomal süperintegron olmak üzere iki çeşidi vardır. Mobil olanlar sekans dilimlerine göre 5 sınıfa ayrılmıştır: Sınıf I, II, III, IV, V. İnsersiyon segmentleri, transpozonlar ve plazmidler aracılığıyla taşınırlar (57). İntegrasyon işlemi bu gen bölgelerinde bulunan tirozin rekombinaz ailesinden olan integras enzimi tarafından “conservative site-specific recombination mekanizması” ile yapılır (56). Klinik izolatlarda çoğunlukla sınıf I ve II integron bulunur. Antibiyotik direncinin taşındığı gen kasetlerinin büyük bölümü sınıf I integron içinde bulunurken, sınıf II integron daha az miktarda direnç geni içerir. Bu farklılık integras enziminin (*intI2*) kodon 179 (ochre 179) bölgesinde non-sense mutasyon, doğal süpresörlerin etkisi ya da farklı bir integrasın varlığı gibi nedenlerle ilişkilidir (57).

Tüm integronlarda eksojen geni alabilmesi için üç anahtar bölgenin bulunması gerekir: (i) integras genini kodlayan bölge (*intI*), (ii) primer rekombinasyon bölgesi (*attI*), (iii) promotor bölge.

5' korunmuş segmentte (5'CS) gen kasetlerinin eklenip çıkartılması için gerekli enzimleri kodlayan *intI* geni bulunur. Bu bölgenin hemen yanında ise primer rekombinasyon bölgesi (*attI*) bulunur. sınıf I integronlar 5'CS bölgesinde P1 ve P2 olmak üzere iki promotor içerir. Eklenen gen kasetlerinin promotor bölgesi olmadığı için ortak promotor bölgesinden eksprese olurlar. 3'CS bölgesinde ise gen kasetlerinin bağlanabilmesi için '*attC*'ve '*qacED1*'bölgeleri bulunmaktadır (şekil 2). Böylece yeni gen kasetlerinin integron içine alınması sağlanır. Bilinen en az 60 gen kaseti vardır. Bunlar beta-laktam, aminoglikozit, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, sulfonamid, rifampisin, antiseptik ve dezenfektanlara dirençten sorumludur (55, 57, 58, 59, 60).

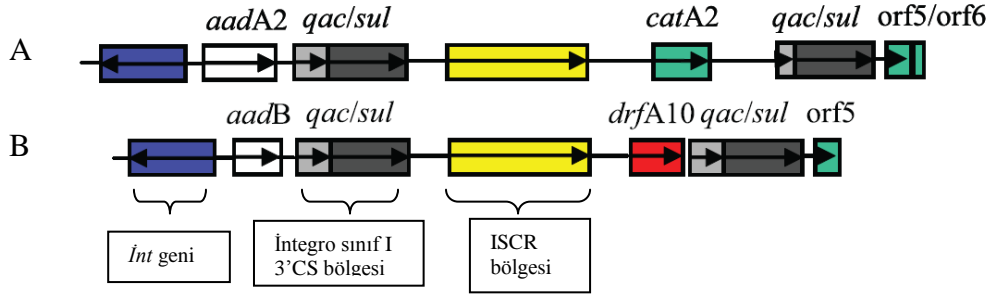


Şekil 2. İntegron Sınıf I'in yapısı (61).

2.2.2. Insertion Element *Common Region* (ISCR) Elemanları

Bakteriler arasında horizontal gen transferinde transpozonlar, plasmidler ve integronların rol aldığı bilinmektedir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda, antibiyotik direncinin yayılımını açıklamada sadece bu sistemlerin varlığının yetersiz kaldığı ortaya çıkmıştır. Bu aşamadan sonra "*common regions*" (CRs) olarak adlandırılan gen bölge tanımlanmıştır.

Common regions ilk kez 1990'ların başlarında keşfedilmiştir. *In6* ve *In7* şeklinde adlandırılan bu bölgeler, şekil 3'te de gösterildiği gibi integron sınıf I'in yanında bulunan 2,154 bp'lik DNA dizileridir.



Şekil 3. Sınıf 1 integron, In6 ve In7 kompleksinin yapısı. A: In6, B: In7 (60).

CRs, genellikle integron sınıf I'in 3'korunmuş bölgesine çok yakın lokalize olurlar. Karşılaştırmalı yapılan çalışmalarda CRs'lerin birbirleriyle ilişkili olduğu ve "insertion sequences'lara (ISs) benzediği görülmüştür. CRs genleri kendilerine yapışık DNA bölgelerinin 'rollig-circle replication' yöntemi ile kopyalarını oluşturarak bu bölgelerin diğer bakterilere aktarımını sağlarlar. Böylece tüm antibiyotik gruplarına karşı direnç geliştirebilecek genleri taşıyabilirler (60). ISCR mobil elementlerine spesifik bölgeleri amplifiye eden primerler CRF/CRFF olarak dizayn edilmiştir (6).

SXT direncinden sorumlu genler arasında bulunan *sul2* geni ISCR2 geninin hemen yanında yer almaktadır. Bu da *S. maltophilia*'ya *sul2*'nin transferine imkan sağlamaktadır. ISCR2 elementi *sul2* geni dışında *dhfr*, *flo*, *tet*, *str* genlerinin taşınmasına da imkan sağlayarak sırasıyla trimetoprim, kloramfenikol, tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli bakteriler oluşturur (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışmada 2006 – 2011 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na tüm birimlerden gönderilen farklı klinik örneklerden izole edilen *S.maltophilia* kökenleri incelendi. Bu süreç içinde 339 hastaya ait 618 hasta örneğinde *S.maltophilia* tanımlandı ve bunların içinden SXT dirençli kökenler seçildi. Aynı hastaya ait birden fazla izolat çalışmaya dahil edildi. Bu izolatların seçilmesinde antibiyotik direnç paterninin farklı olması baz alındı. İnceleme sonucunda toplam 32 adet SXT dirençli *S. maltophilia* kökeninde antibiyotik direnç genleri araştırıldı. Çalışma kapsamına alınan kökenlerin dağılımı tablo 3'te verildi.

Agar dilüsyon yönteminde kontrol kökeni olarak *E.coli* ATCC 24922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* K12 JM101 kökenleri kullanıldı.

Tiplendirme ve antibiyogram işlemleri tamamlanan kökenler, PZR işlemi uygulanana kadar %15 gliserol (Merck, Almanya) içeren triptik soy buyyon besiyerinde (Fluka, 22092) -80°C'de saklandı (62).

Tablo 3. Çalışma Kapsamına Alınan *S. maltophilia* Kökenlerinin Dağılımı

İzolasyon No	Geliş Tarihi	İzolasyon Tarihi	Materyal	Materyalin Gönderildiği Birim
TSM-01	24.02.2010	25.02.2010	Yara Sürüntüsü	Kalp Damar Cerrahi Servisi
TSM-02	26.07.2011	06.09.2011	TA ^a	Pediyatri YBÜ ^c
TSM-03	27.11.2007	11.02.2008	TA	Pediyatri - Süt Çocuğu Servisi
TSM-04	20.06.2011	28.06.2011	İdrar	Dahiliye - Onkoloji Servisi
TSM-05	24.04.2006	10.05.2006	Katater	Cerrahi YBÜ
TSM-06	15.01.2010	17.01.2010	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-07	12.08.2008	01.09.2008	TA	Pediyatri - Süt Çocuğu Sservisi
TSM-08	06.04.2008	05.07.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-09	04.03.2006	03.04.2006	TA	Nöroloji Servisi
TSM-10	27.08.2007	19.09.2007	TA	Cerrahi YBÜ
TSM-11	10.07.2008	26.08.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-12	09.09.2008	17.11.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-13	27.07.2007	31.08.2007	BAL ^b	Dahiliye - Hematoloji Servisi
TSM-14	28.08.2009	11.10.2009	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-15	28.02.2006	05.04.2006	BAL	Psikiyatri Polikliniği
TSM-16	24.03.2007	29.07.2007	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-17	09.02.2010	10.02.2010	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi
TSM-18	23.09.2009	12.01.2010	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-19	15.03.2006	07.04.2006	BAL	Göğüs Hastalıkları Servisi
TSM-20	10.09.2009	30.10.2009	TA	Pediyatri - Süt Çocuğu Servisi
TSM-21	14.04.2006	05.07.2006	İdrar	Dahiliye - Gastroenteroloji Servisi
TSM-22	09.09.2008	27.11.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-23	08.08.2008	02.10.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-24	19.09.2007	16.01.2008	İdrar	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği
TSM-25	25.09.2008	09.10.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-26	24.03.2007	06.08.2007	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-27	20.09.2008	11.12.2008	TA	Yenidoğan YBÜ
TSM-28	31.08.2009	22.10.2009	Yara Sürüntüsü	Ortopedi Polikliniği
TSM-29	19.07.2009	21.07.2006	BAL	Göğüs Hastalıkları Servisi
TSM-30	02.05.2006	31.07.2006	BAL	Dahiliye - Hematoloji Servisi
TSM-31	01.05.2008	27.05.2008	TA	Nöroloji YBÜ
TSM-32	16.01.2008	21.01.2008	İdrar	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği

a: Trakeal aspirasyon örneği

b: Bronkoalveolar Lavaj

c: Yoğun Bakım Ünitesi

3.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; 37°C'lik etüv (Mettler BM 600, Almanya), biyogüvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, Teknomar, Ankara), bunsen beki, -20°C (BEKO D7210 SMF, Türkiye) ve -80°C soğutucu (New Brunswick Scientific Mod U570 premium, Thermo, ABD), +4°C buzdolabı (Arçelik, 2008), pastör fırını (Heraeus T550, Portekiz), dikey model otoklav (Kermanlar, İstanbul), Phoenix™ 100 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) cihazı, CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson Diagnostic Systems), otomatik pipetler (Lab-mate, İngiltere), çalkalayıcı su banyosu (Mettler GFL 1086, Almanya), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, İstanbul), vorteks (Heidolph, Almanya), santrifüj (Thermo, ABD), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), mikrodalga fırın (Beko 1550, Türkiye), termal döngü cihazı (Techne, TC 512, ABD), elektroforez tankı (Owl), dijital güç kaynağı (EC-105), jel dökümantasyon sistemi (Bio-rad, İstanbul), UV illüminatör (Wilber Lourmat, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, İstanbul) ve distile su cihazı (GFL, Ankara) gibi cihazlar; 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri, 0.2 mL'lik PCR tüpleri (Grainer bio-one, Almanya), pipet ucu (10 µl, 100 µl, 1000 µl) gibi sarf malzemeler kullanıldı. Cam biyokimya tüpleri, 250 mL'lik erlenmayer, 50 mL'lik mezür, cam balon joje, 50 mL'lik ve 15 mL'lik falkon tüpler, kaynatma kabı, jel dökme tepsisi ve tarak kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. 2.5 M NaOH

0.5 g NaOH (Merck, Almanya) (MA: 40) tartılıp 5 mL deiyonize suda eritildi.

3.1.3.2. 1 M Tris HCl

12.1 g Tris HCl (Sigma, Almanya) (MA: 121.14) distile su ile çözüldükten sonra konsantre NaOH (Merck, Almanya) ilave edilerek pH: 8'e ayarlandı ve hacmi distile su ile 100mL'ye tamamlandı. 121°C'de 15 dak otoklavlanarak steril edildi.

3.1.3.3. 0.5 M EDTA (Etilendiamin-Tetra-Asetik Asit)

29.2 g EDTA (Sigma, Almanya) (MA:292.2) tartılıp behere konup, üzerine bir miktar distile su ilave edildi. Karışımın çözünmesi manyetik karıştırıcı kullanıldı. Rengi berraklaşana kadar içine konsantre NaOH pelletleri eklendi. Homojen çözünme gerçekleşince pH: 8'e ayarlandı ve distile su ile hacmi 200 mL'ye tamamlandı. Sonrasında 121°C'de 15 dak otoklavlanarak steril edildi.

3.1.3.4. TE Tamponu

Final konsantrasyonları 10 mM Tris HCl (Sigma, Almanya), 1 mM EDTA (Sigma, Almanya) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

3.1.3.5. Trimetoprim 20X Stok Solusyonu

12.8 mg trimetoprim (Sigma, Almanya) tartılıp 5 mL deiyonize su ilave edildi. Ardından CLSI önerileri doğrultusunda son hacmin %10'u kadar HCl eklenip tam çözünmesi sağlandıktan sonra deiyonize su ile son hacmi 10 mL'ye tamamlandı. 1280 m μ /mL konsantrasyonunda hazırlanan 20X stok solusyon 0.45 μ m'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Ardından distile su kullanılarak yarı yarıya dilüsyonları yapıldı. Böylece 1280-1.25 m μ /mL arası 11 dilüsyon elde edildi.

3.1.3.6. Sulfametoksazol 20X Stok Solusyonu

243.2 mg sulfametoksazol (Sigma, Almanya) tartılıp 5 mL deiyonize su ilave edildi. Ardından CLSI önerileri doğrultusunda 5 mL sıcak su ve eritecek en az miktarda 2.5 mol/L NaOH eklendi. 24320 m μ /mL konsantrasyonunu elde etmek üzere deiyonize su ile son hacmi 10 mL'ye tamamlandıktan Hazırlanan 20X stok solusyon 0.45 μ m'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Bu işlemin ardından deiyonize su ile yarı yarıya seyreltmeler yapılarak 24320 – 23.75 m μ /mL arası 11 dilüsyon hazırlandı.

3.1.3.7. 2.5 mM dNTP Karışımı

100 mM'lık dATP (deoksiadenintrifosfat), dGTP (deoksiguanozintrifosfat), dCTP (deoksisitozintrifosfat), dTTP (deoksitimidintrifosfat) (Roche, Almanya, Fermentas, ABD) stoklarından 20'şer µL alınıp 720 µL deiyonize suda çözülerek 2.5 mM'lık stok karışım elde edildi.

3.1.3.8. 0.5X TBE (Tris-Borik ast-EDTA) Tamponu

Final konsantrasyonları 44.5 mM Trisma base (MA. 121.1 g/mol), 44.5 mM borik asit (MA: 61.83, 1mM EDTA (0.5 M pH:8.0) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

3.1.3.9. Etidyum Bromür

50 mg Etidyum bromür 10 mL distile su ile son konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde manyetik çalkalayıcı üzerinde karıştırılarak homojen biçimde çözünmesi sağlandı. Işıktan muhafazalı olarak oda ısısında saklandı.

3.1.3.10. Yükleme Tamponu (*Loading Buffer*)

Final konsantrasyonları %20 glycerol (Merck, Almanya), 1 mg/mL (w/v) bromphenol blue (BioRad, ABD), 1 mg/mL (w/v) xylene cyanole (Sigma, Almanya) olacak şekilde deiyonize su ile hazırlandı.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

3.1.4.1. Luria Bertani (LB) Buyyon ve Agar

10 g Triptan (Bacto), 5 g yeast ekstrakt (Oxoid, UK), 10 g NaCl (Merck, Almanya) bir miktar distile suda çözüldükten sonra konsantre sodyum hidroksit kullanılarak pH: 7.5'e ayarlandı. Hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilmek üzere 121°C 1 atm basınçta 15-20 dak otoklavlandı.

3.1.4.2. Mueller Hinton Agar Besiyeri

38 g Mueller Hinton Agar Besiyeri 1000 mL distile suda eritildi ve 1 atm basınç ve 121°C’de 15 dak otoklavlandı. 55°C’ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında döküldü.

3.1.4.3. SXT’li Mueller Hinton Agar Besiyeri

38 g Mueller Hinton Agar Besiyeri 1000 mL distile suda eritildi ve 1 atm basınçve 121°C’de 15 dak otoklavlandı. 55°C’ye kadar soğutulduktan sonra 18 mL’lik hacimlere bölündü. Hazırlanmış olan her bir trimetoprim ve sulfametoksazol dilüsyonundan 18 mL’lik MHA besiyerine 1’er mL ilave edildi. Böylece toplam besiyeri hacmi 20 mL; ilave edilen antibiyotikler ise 1/20 oranında seyreltilmiş oldu. Alt-üst edilen besiyeri soğumasına izin vermeden petri plaklarına 4 mm kalınlığında döküldü.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kökenlerin Tanımlanması

Klinik örnekler %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye), Eosin Methylene Blue (EMB) agara (Oxoid, İngiltere) ve çikolatamsı agar (Salubris, Türkiye) besiyerlerine ekilerek 24–48 saat 37°C’de aerobik ortamda inkübe edildi ve üreyen koloniler değerlendirilmeye alındı. Boyalı mikroskopik incelemede Gram negatif basil görünümünde olan katalaz pozitif, oksidaz negatif, non-fermentatif bakteriler klasik yöntemlere ilaveten Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) otomotize mikrobiyoloji sistemi ile üretici firma önerileri doğrultusunda tür düzeyinde tanımlandı ve antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı.

Kolonilerden CrystalSpec™ nephelometer (Becton Dickinson company, ABD) kullanılarak ID buyyon içerisinde 0.5 McFarland standartına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Antimicrobial susceptibility test (AST) buyyon tüpüne 25 µL hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan eklendi, ardından bir damla Phoenix™ AST indikatörü damlatıldı. Hazırlanan paneller 35°C inkübasyon sıcaklığı sağlayan ve 20

dakikada bir okuma yapan Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) cihazına yerleştirildi (63, 64).

3.2.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

S. maltophilia olarak tiplendirilen kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları, NMLC/ID35 kullanılan BD Phoenix sisteminin yanı sıra Kirby-Bauer metoduna göre Mueller-Hinton Agar (MHA) kullanılarak standart disk difüzyon yöntemi ile de araştırıldı (65). Sonuçlar Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) kriterlerine göre duyarlı ve dirençli olarak kategorize edildi (64, 66).

3.2.2.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi sonucuna göre SXT dirençli bulunan kökenlere MİK belirlemek üzere agar dilüsyon yöntemi uygulandı. Literatürdeki bildirimler ve kalite kontrol kökenlerinin değer aralıklarını kapsayacak şekilde Trimetoprim-Sulfametoksazol oranları 0.06/1.19 - 64/1216 µg/mL arası 11 dilüsyon içeren MHA besiyeri petrilere hazırlandı.

Test edilecek bakterilerin %5 koyun kanlı agara tek koloni pasajları yapıldı. 37°C’de 24 - 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler % 0.9’luk tuzlu su içinde süspanse edildi. İnokulum $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (0.5 McFarland) olacak şekilde standartize edildi. Bu işlemin ardından 1/10 oranında seyreltilip hazırlanmış olan SXT’li MHA besiyeri petrilere 1’er µL bakteri süspanسیونlarından benekleme usulü inokulasyon yapıldı (67). Buna göre en küçük dilüsyondan başlanıp en büyük dilüsyona doğru ekim yapıldı. Kalite kontrol kökeni olarak *E.coli* ATCC 24922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kökenleri kullanıldı. Her deneyde üremenin kontrolü için antimikrobiyal içeren petrilere ekimden önce ve sonra herhangi bir antimikrobiyal ajan içermeyen MHA besiyeri petrilere aynı şekilde inokulasyon yapıldı. Tüm petrilere 37°C’de 24 - 48 saat inkübe edildikten sonra gözle görünür koloni oluşumu not edilerek her köken için MİK değerleri saptandı (38).

3.2.3. Trimetoprim-Sulfametoksazol Antibiyotik Direnç Genlerinin Varlığının Araştırılması

3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İşlemi

3.2.3.1.1. DNA İzolasyonu

PZR yapılacak bakterilerin DNA'larını izole etmek amacıyla saklanan kökenler önce % 5 koyun kanlı agara (Salubris, Türkiye) ekildi. Üreyen bakterilerin Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine tek koloni pasajları yapıldıktan sonra çalkalamalı su banyosunda bir gece inkübe edildi. Bu süspansiyondan 1.5 mL alınarak 5000 rpm'de 5 dak santrifüj edilip süpernatantı atıldı. Kalan çökelti bir kez 1 mL Tris-EDTA tamponu (TE) ardından da bir kez 1 mL steril distile su ile yıkandı. Kalan çökeltiye 500 µL steril distile su eklenerek 15 dak kaynayan suda bekletildi. Kaynatma işleminden sonra 13000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmından pellete değmeden 400 µL alınıp ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Böylece PZR işleminde kullanılacak kalıp DNA'ları elde edildi (68).

3.2.3.1.2. Master Mix Solusyonunun Hazırlanması

Tüm aşamaların buz üzerinde gerçekleştirilebilmesi için öncelikle boş bir kutunun içi buzla dolduruldu. Buz üzerine 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirildi. Bu işlemde kullanılacak kimyasallar -20°C dondurucudan çıkarıldı. Taq polimeraz işlem sırası geldiğinde çıkarıldı. Çözünen kimyasallar 5-10 sn vortekslenip kısa bir süre santrifüjlendikten sonra PZR işlemleri için gerekli reaksiyon karışımları mikrosantrifüj tüpleri içine pipetlendi. Taq polimeraz enzimi vortekslenmeksizin kısa süre santrifüjlendikten sonra yukarı aşağıya pipetleyerek tüpe aktarıldı. Steril deiyonize su kullanıldıktan sonra 30 sn vortekslenen master miks 0.2 mL'lik PZR tüplerine 40 µL dağıtıldı. Tüplerin üzerine yazılan örnek numaralarına göre kalıp DNA'lar her bir tüpe 10'ar µL aktarıldı. Negatif kontrol olarak deiyonize su kullanıldı.

3.2.3.1.3. PZR Analizi İçin Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primer dizileri (IDT, ABD, Biomers, Almanya), tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. PZR Analizi Kullanılan Primerler

Primerler	Dizi (5' -3')	Gen bölgesi	Ürün büyüklüğü	Referans
<i>Int1-1F</i> <i>Int1-1R</i>	GGTCAAGGATCTGGATTTGG ACATGCGTGTAATCATCGTC	<i>Int1</i>	500 bp	69
<i>Int1-2F</i> <i>Int1-2R</i>	CACGGATATGCGACAAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	<i>Int2</i>	740 bp	69
<i>5' CS</i> <i>3' CS</i>	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	İntegron sınıf I	-	70
<i>Hep 74</i> <i>Hep 51</i>	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	İntegron sınıf II	-	71
<i>sul1-F</i> <i>sul1-R</i>	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTGA CTAGGCATGATCTAACCTCGGTCT	<i>sul1</i>	840 bp	6
<i>sul2-F</i> <i>sul2-R</i>	GAATAAATCGCTCATCATTTTCGG CGAATTCTTGCGGTTTCTTTCAGC	<i>sul2</i>	704 bp	6
<i>CRF</i> <i>CRFF-r</i>	CACTWCCACATGCTGTKKC CGCTTGAGSCGTTGCRYCC	CRF	740 bp	6
<i>CRFF</i> <i>CRF-r</i>	GGRYGCAACGSCCTCAAGCG GMMACAGCATGTGGWAGTG	CRF	740 bp	6
<i>LECR2</i> <i>RECR2</i>	CACTGGCTGGCAATGTCTAG CTTTGGACCGCAGTTGACTC	ISCR2	1793 bp	6
<i>FloF</i> <i>FloR</i>	TCGACATCCTGGCTTCACTG ATTACAAGCGCGACAGTGCC	<i>flo</i>	718 bp	6
<i>dhfrA20F</i> <i>dhfrA20R</i>	GGGAAACACCGAGAAATGGG TTCTTCTTCCCATTCTCCCC	<i>dhfrA20</i>	700 bp	6
<i>dhfrA9F</i> <i>dhfrA9R</i>	CAGATTCCGTGGCATGAACC GACCTCAGATACGAGTTTCC	<i>dhfrA9</i>	700 bp	6
<i>dhfrA10F</i> <i>dhfrA10R</i>	TGTAGCGCGTGGTGTAACG ACGTCTACGTGAGTATCCGC	<i>dhfrA10</i>	700 bp	6

3.2.3.1.4. PZR Uygulanması

S.maltophilia kökenlerinin DNA izolasyonu yapıldıktan sonra integras 1 ve 2, integron sınıf I ve II, sulfonamid direncini gösteren *sul1* ve *sul2*, trimetoprim direncini gösteren *dfrA*, ISCR (Insertion Element Common Region) moleküllerinin tamamını tanıyan CRF ve CRFF, kloramfenikol direncini gösteren *flo* gen bölgelerinin varlığını araştırmak üzere PZR işlemi uygulandı.

3.2.3.1.4.1. İntegraz 1 ve 2 PZR

Her bir örnek için toplam hacim 50 μ L olacak şekilde buz üstünde PZR tüplerine tablo 5'teki malzemeler konuldu. Pozitif kontrol olarak integras 1 ve 2 geni bulunduğu bilinen *E.coli* izolatlarından elde edilen DNA 10 μ L eklendi.

Tablo 5. İntegraz 1 ve 2'nin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı

Malzemeler	Stok Konsantrasyonu	Miktar (μ L)
10x taq polimeraz tamponu	1x	5
dNTP 2.5mM stok solusyonu	50 μ mol	1
MgCl ₂ (25mM)	2.5 mM	5
<i>İnt1-R / int2-R</i> primeri (10 pmol/ μ L)	0.3 pmol/ μ L	1.5
<i>İnt1-F / int2-F</i> primeri (10 pmol/ μ L)	0.3 pmol/ μ L	1.5
taq DNA polimeraz (Promega 5 U/ μ L)	0.03 U/ μ L	0.3
DNA		10
dH ₂ O		25.7
Toplam		50

Amplifikasyon koşulları

94°C.....12 dak	ilk denatürasyon	
94°C	1 dak denatürasyon	} 35 döngü
59 °C	45 sn bağlanma	
72 °C..... 2 dak	uzama	
72 °C..... .4 dak	son uzatma	

3.2.3.1.4.2. İntegron Sınıf I ve II PZR

İntegron sınıf I PZR için 3'CS ve 5'CS primerleri kullanılırken; integron sınıf II için *Hep74* ve *Hep 51* primerleri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak integron sınıf 1 ve 2 geni bulunduğu bilinen *E.coli* izolatlarından elde edilen DNA 10 µL eklendi.

Tablo 6. İntegron Sınıf I Ve II'nin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı

<i>Master mix</i>	Konsantrasyon	Miktar (µL)
5x taq polimeraz tamponu	1x	10
dNTP 2.5mM stok solusyonu	200 µmol	4
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	4
3'CS / <i>Hep74</i> primeri (10 pmol/µL)	2 pmol/µL	2.5
5'CS / <i>Hep 51</i> primeri (10 pmol/µL)	2 pmol/µL	2.5
taq DNA polimeraz (Promega 5 U/µL)	0.02 U/µL	0.2
DNA		10
dH ₂ O		16.8
Toplam		50

Amplifikasyon koşulları

94°C.....5 dak	ilk denatürasyon	
94 °C.....30 sn	denatürasyon	} 30 döngü
55 °C.....30 sn	bağlanma	
72 °C.....3 dak	uzama	
72 °C.....4 dak	son uzatma	

3.2.3.1.4.3. *LEC2/REC2* PZR

LEC2/REC2 primerleri ISCR2 elementini araştırmak için kullanıldı.

Tablo 7. *LEC2/REC2* 'nin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı

<i>Master mix</i>	Konsantrasyon	Miktar (μ L)
5x taq polimeraz tamponu	1x	5
dNTP 2.5 mM stok solusyonu	200 μ mol	4
MgCl ₂ (25mM)	2 nM	4
<i>Sul1-R / sul2-R</i> primeri (10 pmol/ μ L)	0.2 pmol/ μ L	1
<i>Sul1-F / sul2-F</i> primeri (10 pmol/ μ L)	0.2 pmol/ μ L	1
taq DNA polimerz (Fermentas 5 U/ μ L)	0.02 U/ μ L	0.2
DNA		10
dH ₂ O		24.8
Toplam		50

Amplifikasyon koşulları

95°C.....5 dak	ilk denatürasyon	
95 °C	1 dak denatürasyon	} 30 döngü
55 °C	2.5 dak bağlanma	
72 °C...	3 dak uzama	
72 °C.....4 dak	son uzatma	

3.2.3.1.4.4. Diğer Gen Bölgeleri İçin Uygulanan PZR Protokolü

sul1, *sul2*, *CRF/CRFF-r*, *CRFF/CRF-r*, *flo*, *dfra2*, *dfr9*, *dfrA10* gen bölgelerini amplifiye etmek için aşağıdaki protokol izlendi.

Tablo 8. *sul1*, *sul2*, *CRF*, *flo*, *dfra2*, *dfr9*, *dfrA10*'un Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı

<i>Master mix</i>	Konsantrasyon	Miktar (μL)
5x taq polimeraz tamponu	1x	5
dNTP 2.5mM stok solüsyonu	200 μmol	4
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	4
Revers primeri (10 pmol/ μL)	0.2 pmol/ μL	1
Forward primeri (10 pmol/ μL)	0.2 pmol/ μL	1
taq DNA polimeraz (Fermentas 5 U/ μL)	0.02 U/ μL	0.2
DNA		10
dH ₂ O		24.8
Toplam		50

Amplifikasyon koşulları

95°C.....5 dak	ilk denatürasyon	
95 °C	1 dak	denatürasyon
55 °C	1 dak	bağlanma
72 °C...	1.5 da	uzama
72 °C.....4 dak	son uzatma	

} 30 döngü

3.2.3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi

Elektroforez işlemi için %2'lik agaroz jel hazırlamak üzere 1 gr agaroz 50 mL TBE tamponu ile karıştırılıp mikrodalga fırında agaroz partikülleri tamamen eriyinceye kadar

ısıtıldı. İçinde erimiş agaroz bulunan erlen, 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk bekletildi. İstenilen sıcaklığa ulaşan agarozu son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Geniş kuyucuk oluşturan tarak, düz bir zemindeki tepsi üzerine oturtuldu. Hazırlanmış olan jel tepsiye döküldükten sonra katılaşması için oda ısısına bırakıldı. Katılaşan agarozdan tarak çıkarıldıktan sonra tepsi ile birlikte yatay elektroforez tankının içine yerleştirildikten sonra jelin üzerini kapatacak şekilde TBE tamponu döküldü. DNA ağarlaştırılarak kuyucuklara pipetleyebilmek ve yürüyen DNA konumunu belirlemek için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µl PCR ürünü 3 µl yükleme tamponu (loading buffer) ile karıştırılarak kuyucuklara pipetlendi. Ürün büyüklüklerine göre 1 kb DNA marker (MBI Fermentas) veya 100 bp DNA marker (Biolabs, New England) ilk veya son kuyucuklara 5 µL pipetlendi. Örnekler ilk 10 dak 80 voltta yürütüldükten sonra 100 volta çıkarılıp 30 dak daha doğru akımda elektroforez edildi. Oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi ve VersaDoc.™. Imaging System ile görüntülendi.

3.2.3.2. Nükleotid Dizi Analizi

3.2.3.2.1. Kompetant Hücre Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* JM101 kökenine ait komponent hücreler kalsiyum klorür metodu takip edilerek hazırlandı (72). Öze ile 3 mL LB besiyerine 1 gece önceden tek bir koloni seçilerek ekim yapıldı. Sıvı kültür gece boyunca 37 °C'de 200 rpm'de sallanarak inkübe edildi. Hazırlanan gece kültürü 600 nm'de ölçülerek yoğunluğu belirlendi ve 0.1 olacak şekilde tekrar 30 mL LB yeni besiyerine ekim yapıldı. Optik yoğunluk 600 nm'de 0.4-0.6 arasına ulaşınca hücreler 4°C'de 4000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilerek toplandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 10 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ ilave edilerek çözüldü ve 30 dak buz içinde bekletildi. Sonrasında 4°C'de 4000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi ve pellet 2 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisinde süspansiyeye edilerek 200 µL hacimlerde steril mikrosantrifüj tüplerine bölünerek kullanıldı.

3.2.3.2.2. Genin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

Baz sırasının belirlenmesi için PZR ürünlerinin pGEM-T easy vektörüne (Promega) ligasyonu sağlandı ve bu amaçla üretici firmaya ait protokol takip edildi. Ligasyon ürünleri daha önceden hazırlanan *E. coli* JM101 komponent hücrelerine transforme edildi (72).

PZR ürününü taşıyan plazmidi içeren hücreler 1 mM IPTG ve X-Gal içeren ampisilinli (50 µg/mL) LB agar petrilerine yayma ekim ile ekildi ve mavi-beyaz renk oluşumuna bakılarak hücreler ayrıldı. Yirmi koloni beyaz hücreden plazmid izole edildi (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega) ve EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek agaroz jelde yürütüldü. Kontrol olarak PZR ürünü kullanıldı ve PZR ürünü ile aynı parçayı veren plazmidler pozitif kontrol kabul edildi ve nükleotid dizi analizi Macrogen Inc.'de (Amsterdam) yaptırıldı.

3.2.3.2.3. PZR ile Elde Edilen İntegron Sınıf I'e Ait Sekansların Birleştirilmesi

Ters PZR ile elde edilen sekanslara ait çakışma bölgeleri BLAST programı (URL–1, 2005) kullanılarak belirlendi. Üst üste çakışan kısımlar alt alta getirilerek birleştirildi ve gene ait tam uzunlukta sekans elde edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kökenlerin Tanımlanması

Ocak 2006 – Ekim 2011 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na tüm birimlerden gönderilen farklı klinik örneklerden izole edilen 339 hastadan 618 *S. maltophilia* kökeni incelendi. Kökenlerin gönderildiği birimlere ve materyallere göre dağılımı Tablo 9 ve Tablo 10'da verildi.

Tablo 9. *S. maltophilia* Kökenlerin İzole Edildiği Hastaların Klinik Birimlere Göre Dağılımı

BÖLÜM	SAYI	YÜZDE (%)
Erişkin yoğun bakım üniteleri	83	24.5
Yenidoğan yoğun bakım ünitesi	52	15.3
Erişkin dahili birim servisleri	81	23.9
Pediyatri servisleri	25	7.4
Cerrahi bölüm servisleri	65	19.2
Erişkin dahili birimler poliklinikleri	6	1.8
Pediyatri Poliklinikleri	4	1.2
Cerrahi Birim Poliklinikleri	13	3.8
Diğer birimler	10	2.9
TOPLAM	339	100

Tablo 10. *S. maltophilia* Kökenlerinin İzole Edildikleri Materyallere Göre Dağılımı

MATERYAL	SAYI	YÜZDE (%)
Balgam	25	4.0
BAL ^a	20	3.2
TA ^b	320	51.8
İdrar	76	12.3
Kan	72	11.7
Yara	35	5.7
Diren Sıvısı	20	3.2
Steril Vücut Sıvıları	19	3.1
Diğer	31	5.1
TOPLAM	618	100

a: Bronkoaveoler lavaj

b: Trakeal aspirasyon örneği

İncelenen *S. maltophilia* kökenleri içinde SXT antibiyotiğine dirençli bulunan 32 köken ileri çalışmaya alındı. Bu kökenlerin izole edildiği hastaların hangi birimde tedavi aldığı ve hangi materyallerinden üretildiği tablo 11’de gösterilmiştir. Kökenlerin %90.63’ü hastane kaynaklı iken %9.37’si toplum kaynaklı idi.

Tablo 11. SXT Dirençli Kökenlerin İzole Edildiği Hastaların Klinik Birim Ve Materyallere Göre Dağılımı

BÖLÜM	MATERYAL						TOPLAM	YÜZDE %
	BAL ^a	Balgam	TA ^b	İdrar	Yara	Katater kültürü		
Poliklinikler							4	12.5
Psikiatri	1						1	3.1
Pediyatri Nefroloji				2			2	6.3
Ortopedi					1		1	3.1
Servisler							12	37.5
Göğüs hastalıkları	2	1					3	9.4
Dahiliye Hematoloji	2						2	6.3
Dahiliye onkoloji				1			1	3.1
Dahiliye Gastroenteroloji				1			1	3.1
Nöroloji			1				1	3.1
Pediyatri Süt Çocuğu			3				3	9.4
Kalp Damar Cerrahisi					1		1	3.1
YBÜ							16	49.9
Yenidoğan YBÜ ^c			12				12	37.5
Nöroloji YBÜ			1				1	3.1
Pediyatri YBÜ			1				1	3.1
Cerrahi YBÜ			1			1	2	6.2
TOPLAM	5	1	19	4	2	1	32	100

a: Bronkoaveoler lavaj

b: Trakeal aspirasyon örneği

c: Yoğun Bakım Ünitesi

SXT dirençli *S. maltophilia* enfeksiyonu görülen hastaların taşıdığı risk faktörleri YBÜ’de uzun süreli yatış, malignensi, hematolojik malignite, kalıtsal nörolojik hastalıklar, immun süpresyon yapan organ disfonksiyonu, diabetes mellitus hastalığı, solid organ transplantasyonu, tüberküloz, solunum sistemi patolojisi, şeklinde sıralandı. Bu bağlamda hasta sayıları ve taşıdıkları risk faktörleri tablo 12’de belirtildi.

Tablo 12. SXT Dirençli *S. maltophilia* Tespit Edilen Olgulara Eşlik Eden Etkenler

Eşlik Eden Etken	Hasta sayısı	Yüzde
YBÜ'de uzun süreli yatış	14	43.8
Malignensi	5	15.6
Hematolojik malignite	2	6.3
Nörolojik hastalıklar	3	9.4
İmmün süpresyon yapan organ disfonksiyonu	3	9.4
Diabetes mellitus	2	6.3
Solid organ transplantasyonu	1	3.1
Tüberküloz	1	3.1
Solunum sistemi patolojisi	1	3.1

Çalışmaya dahil edilen SXT dirençli *S. maltophilia* üremesi görülen hastaların tedavi aldıkları klinik birimler, üremenin görüldüğü materyaller bu organizmayla birlikte üreyen diğer bakterilerin dağılımı tablo 13'de gösterildi. Bu inceleme sonucunda materyallerin %59.4'ünü trakeal aspirasyon örnekleri oluştururken; %15.6'sını bronkoalveolar lavaj, %12.5'ini idrar, %6.25'ini yara sürüntüsü, %3.1'ini katater ve %3.1'ini balgam örneklerinin oluşturduğu görüldü.

SXT dirençli *S. maltophilia* üremesi görülen materyallerde *S. maltophilia*'ya eşlik eden diğer bakteriler incelendiğinde hastaların %53.1'inde *S. maltophilia* üremesi tek başına görülürken, eşlik eden bakterilerin içinde %15.6 ile ilk sırayı *Pseudomonas aeruginosa* almaktaydı. *Pseudomonas aeruginosa*'dan sonra sırasıyla *Staphylococcus aureus* (%9.4), *Klebsiella pneumoniae* (%6.3), *Acinetobacter baumannii complex* (%6.3), *Enterococcus faecalis*(%6.3), *Escherichia coli* (%3.1), *Achromobacter species* (%3.1), *Staphylococcus haemolyticus* (%3.1), *Candida species* (%3.1) üremeleri gözlemlendi.

Tablo 13. SXT Dirençli *S. maltophilia* Üremesi Görülen Materyallerde *S. maltophilia*'ya Eşlik Eden Diğer Bakteriler

İzolot No	Materyal	Materyalin Gönderildiği Birim
TSM-01	Yara	<i>S. haemolyticus</i>
TSM-02	TA ^a	<i>A. baumannii complex Enterococcus faecalis</i>
TSM-03	TA	<i>P. aeruginosa</i>
TSM-04	İdrar	<i>Achromobacter spp., Candida species</i>
TSM-05	Katater	YOK
TSM-06	TA	<i>E. coli</i>
TSM-07	TA	<i>S. aureus</i>
TSM-08	TA	YOK
TSM-09	TA	<i>S. aureus</i>
TSM-10	TA	<i>A. baumannii complex</i>
TSM-11	TA	<i>K. pneumoniae</i>
TSM-12	TA	YOK
TSM-13	BAL ^b	<i>Pseudomonas spp</i>
TSM-14	TA	YOK
TSM-15	BAL.	YOK
TSM-16	TA	<i>E. clocae</i>
TSM-17	Balgam	YOK
TSM-18	TA	YOK
TSM-19	BAL	YOK
TSM-20	TA	<i>P. aeruginosa</i>
TSM-21	İdrar	YOK
TSM-22	TA	YOK
TSM-23	TA	YOK
TSM-24	İdrar	YOK
TSM-25	TA	YOK
TSM-26	TA	<i>P. aeruginosa</i>
TSM-27	TA	<i>K. pneumoniae, E. faecium, S. aureus</i>
TSM-28	Yara	YOK
TSM-29	BAL	YOK
TSM-30	BAL	YOK
TSM-31	TA	<i>P. aeruginosa</i>
TSM-32	İdrar	YOK

a: Bronkoaveoler lavaj

b: Trakeal aspirasyon örneği

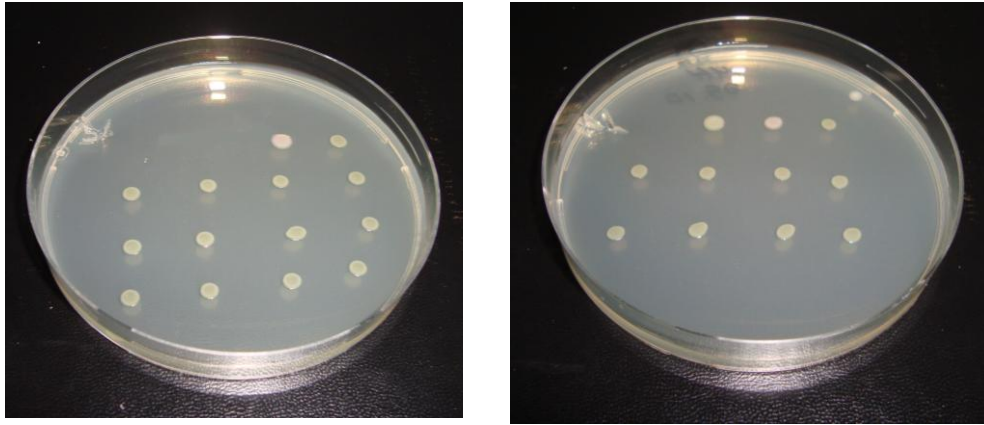
4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

SXT dirençli *S. maltophilia* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları tablo 14 'de gösterildi. SXT duyarlılığı agar dilüsyon yöntemi ve Phoenix otomatize sistemiyle; seftazidim, levofloksasin Phoenix otomatize sistemiyle; minosiklin ise disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı.

Tablo 14. SXT Dirençli *S. maltophilia* Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolat No	SXT		CAZ	LEV	MİN
	SXT Phoenix	Agar Dilüsyon MİK değeri			
TSM-01	R	32/608	S	S	S
TSM-02	R	64/1216	R	S	S
TSM-03	R	64/1216	R	R	R
TSM-04	R	64/1216	R	S	S
TSM-05	R	64/1216	S	S	S
TSM-06	R	64/1216	R	S	S
TSM-07	R	64/1216	R	S	S
SM-08	I	64/1216	S	S	S
TSM-09	R	64/1216	R	S	S
TSM-10	R	64/1216	S	R	S
TSM-11	R	32/608	R	I	S
TSM-12	R	64/1216	R	R	S
TSM-13	R	64/1216	S	S	I
TSM-14	R	64/1216	R	R	S
TSM-15	R	64/1216	S	S	S
TSM-16	R	>64/1216	R	R	S
TSM-17	R	64/1216	R	S	S
TSM-18	R	>64/1216	R	R	S
TSM-19	R	64/1216	S	S	S
TSM-20	I	>64/1216	S	R	I
TSM-21	R	64/1216	R	R	S
TSM-22	R	>64/1216	R	R	S
TSM-23	R	64/1216	R	S	I
TSM-24	R	8/152	R	R	S
TSM-25	R	>64/1216	R	S	S
TSM-26	R	64/1216	R	R	S
TSM-27	R	>64/1216	I	R	S
TSM-28	R	>64/1216	I	I	S
TSM-29	R	>64/1216	S	S	S
TSM-30	R	>64/1216	S	I	S
TSM-31	R	>64/1216	R	S	R
TSM-32	R	64/1216	R	R	S

CAZ: seftazidim; LEV: Levofloksasin; MİN: Minosiklin; SXT: Trimetoprm-sulfametoksazol



Resim 3. Agar Dilüsyon Görüntüsü

4.3. Direnç Genlerinin Varlığının PZR Yöntemiyle Gösterilmesi

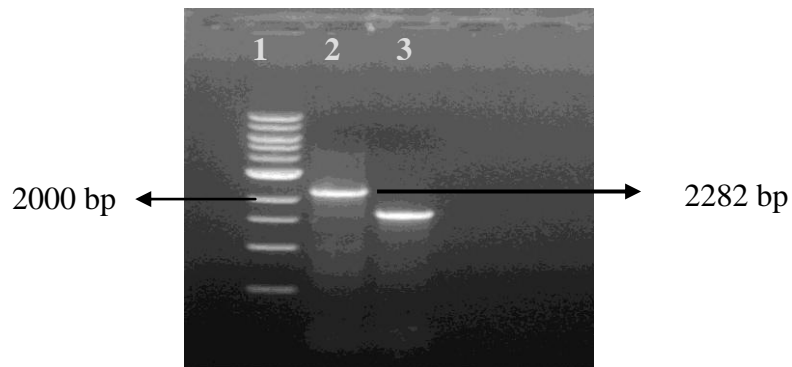
4.3.1. İntegraz 1 ve İntegraz 2 Genlerinin Amplifikasyonu

Intl-1 ve *intl-2* primerleri kullanılarak uygulanan amplifikasyon sonucunda 32 hasta izolatının 2 tanesinde 500 bp büyüklüğünde bant görüldü.

4.3.2. İntegron Sınıf I Ve II Genlerinin Amplifikasyonu

5'CS ve *3'CS* primerleriyle yapılan integron sınıf I taramasında sadece bir izolatta 2290 bp büyüklüğünde bant görüldü, diğer kökenlerde bant görülmedi.

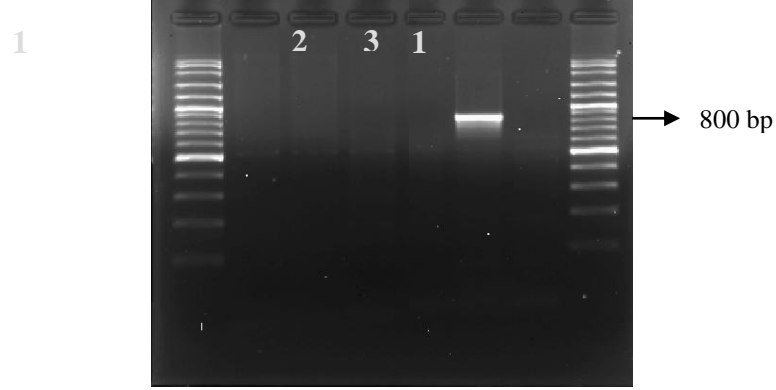
hep51 ve *hep74* primerleriyle integron sınıf II taraması sonucunda hiçbir izolatta bant görülmedi.



Resim 4. İntegron Sınıf I Bandı Görülen İzolata Ait Jel Görüntüsü 1; 1kb DNA Marker, 2; İntegron Sınıf I Taşıyan *S. maltophilia* Kökeni, 3; Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan İntegron Sınıf I Taşıdığı Bilinen Köken, 4; Negatif Kontrol.

4.3.3. *sul1* ve *sul2* Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

sul1 primerleri kullanılarak taraman sulfonamid direnci sadece integron sınıf I bulunan hastada 840bp büyüklüğünde bant görüldü. *sul2* ile yapılan taramada pozitif sonuç bulunamadı.



Resim 5. *sul1* Bandı Görülen İzolata Ait Jel Görüntüsü. 1; 100bp DNA Marker, 2; *sul1* Taşıyan *S. maltophilia* Kökeni, 3; Negatif Kontrol.

4.3.4. ISCR Elementleri Gen Bölgelerinin Taranması

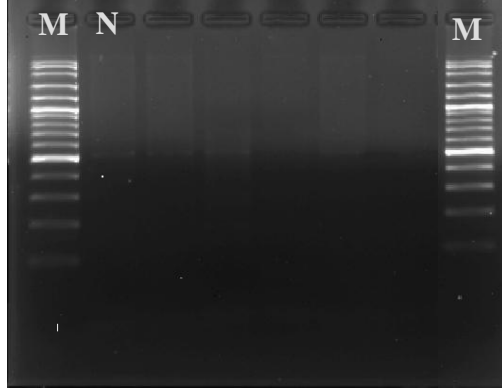
CRF/CRFF-r ve CRFF/CRF-r primerleri kullanılarak tüm ISCR elementlerinin varlığı araştırıldı. Hiçbir izolatta saptanamadı.

4.3.5. ISCR2 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

ISCR2 elementinin gen bölgesini amplifikasyonu için *LECR2/RECR2* primerleri kullanıldı, pozitif izolat bulunamadı.

4.3.6. *dhfrA* Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Trimetoprim direncini gösteren *dhfr* gen bölgelerinin varlığı *dfrA9F/dfrA9R*, *dfrA10F/dfrA10R*, *dfrA20F/dfrA20R* primerleri ile tarandı. Hiçbir örnekte bant görülmedi



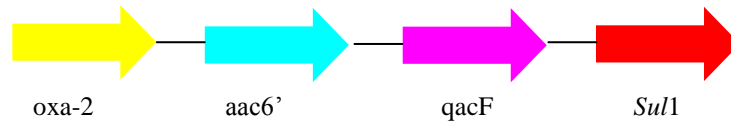
Resim 6. *dfrA9*, *dfrA*, *dfrA20* Amplifikasyon Ürünlerinin Yürütüldüğü Jel Görüntüsü. M: 100bp Dna Marker, N: Negatif Kontrol

4.4. Amplifiye Edilmiş İntegron Sınıf I'in Nükleotid Dizi Analizi Sonucu

PCR yöntemiyle amplifiye edilen TSM-30 kökenine ait integron sınıf I gen kasetinin (2290 bp) nükleotid dizi analizi sonucu şekil 4 gösterildi. Gen kasetinin sırasıyla beta-laktamaz enzimlerinden biri olan oksasilinaz (Oxa-2), aminoglikozid direncine neden olan aminoglycoside 6'N asetyltransferase (aac6') ve kuarterner amonyum bileşikleri direnç genlerini taşıdığı tespit edildi. İntegron gen kasetinin hemen yanında ise sulfonamid direncine neden olan *sul1* geni bulunmaktaydı.

GGCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGTATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAG
 CAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAATGGCAATCCGAATCTTCGCGATACTTT
 TCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTTTTCGCGCATGCGCAAGAAGGCACGCTAGCACGTTCTGACTGGAGGAAGTT
 TTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAAGGCACGATAGTTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTT
 TTTGATCCTGTGCGATCGAAGAAAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTC AAGATACCTCATACTTTTTGCAC
 TTGATGCAGGCGCTGTTTCGTGATGAGTTCCAGATTTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTCAGGCCA
 CAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTATTTGCAAAGGAA
 ATTGGTGATGACAAAAGCTCGGCGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCAACGCCGATCCTTCGACAAGTAATG
 GCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGCAATCTCGGCGCAGGAGCAAATTCATTTCTCAGGAAGCTCTATCG
 TAACGAGCTGCCCTTTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGTGGAAGCCGGTCGCAAC
 TGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGTTGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTG
 GCTCCGTATTCTTCGCACTGAATATTGATACGCCAAACAGAATGGATGATCTTTTTCAAGAGGGAGGCAATCGT
 GCGGGCAATCCTTCGCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAAAC
 CGCGCAGCGCCGGTTACTTCAACGTTAGGCCGACGGAATCAACATCTCATGTCCGCCAACAATGCCGCAATA
 GTTCTACGAGTCATGGCCGAGAACGATCTGCCAATGCTCCATGCTTGGCTGAACCGCCCCACATAGTCGAGT
 GGTGGGGCGGCGAGGATGAACGCCCAACTCTTGACGAAGTCTTAGAACACTATTCGCCCGAAGTCTGGCAAA
 GCAAGCTGTAGTGCCTTACATCGCAATGCTAGATGACGAACCCATCGGCTACGCCAATCTTACATCGCACTT
 GGAAGTGGCGATGGATGGTGGGAAGACGAACTGATCCAGGGTCCGCGGGATTGACCAGTCTTTGGCTAATC
 CATCACAGTTAAACAAGGGGTTGGGTACAAAGCTCGTACGCTCGCTCGTTGAACCTCTGTTTAGCGACCCGGC
 CGTAACGAAAATCCAAACCGATCCATCTCCTAGCAACCATCGCGCCATTCGCTGCTACGAGAAGGCCGGGTTT
 GTTCAAGAAAAAATCCTCACACCTGACGGCCCTGCGGTGTACATGGTCCAAACACGCCAGGCGTTTCAAAA
 GCCTGCGCAATGCTGCCTAAAAATGAGGTC AAGGCGGCTCGCGTTCATGAAGAGCCTCATCATCACTCTATCC
 ATTCGCATCTCGGCGTGTFTTTCCTACGCCTTGGCATCTGTCCCTAGCCTA ACTGGGCGCTCAACTGGACATCA
 ACGTGCTGCGCACGTTGCTGCCAGTTAACTGGGGCGTTAGATGCCAGATTTGGCGTTGCGTATGCTCACAGAA
 AATCGATAGCCGCAAGACTGTTTTTGGCAACTCATAGCCACTACAATTTCTCCTTACATACCGTAGAGGAGATT
 GCGCGTGAAGAACTGGATATTTCTGGCTGTTTCAATCCTTGGCGAGGTCATCGCAACTTCCGCACTGAAGTCT
 AGCCATGGATTCATAGGTTAGTTCCTTCCGTTGTAGTTGTGGCTACGGGCTTGGCTTCTATTTCTTGT
 CTCTCGCGCTCAAGTCCATTCCGGTCGGTATTGCTTACGCTGTATGGGCTGGGCTTGGCATCGTGTGTTGGC
 AGCTATTGCTTGGATTTTCCATGGCCAAAAC TAGACTTCTGGGCGTTTCAATTGGCATGGGACTTATCGTCAGT
 GGCGTCGCCGTTCTAAACCTGCTATCCAAGGTCAGCGCACATTGACCGGGTTGGCATCTAACAATTCATTCAA
 GCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAATTCAGGCGTTAGATGCACATAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAAC
 TATCAGGTCAAGTCTGCTT

Şekil 4. TSM-30 Kökeninin İntegron Sınıf I Gen Kaseti Nükleotit Dizisi. Sarı: Oxa-2;
 Mavi aac6'; Pembe: qacF



Şekil 5. TSM-30 Kökeninin İntegron Sınıf I Gen Kasetinin İçerdiği Direnç Genlerinin Şematik Görüntüsü.

5. TARTIŞMA

S. maltophilia, çevremizde kaynak suları, musluk suları, toprak, bitkiler gibi pek çok ortamda bulunabilen, mortalite ve morbiditeyi artıran enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerden biridir (10, 16). Toplum kaynaklı enfeksiyonlarının varlığına dair yayınlar bulunsa da asıl olarak hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan nonfermentatif Gram negatif bir ajandır (29, 40, 48, 49). Hastane ortamında musluk başları, banyolar gibi genel kullanım alanları dışında ultrasonografik görüntüleme cihazlarının başlıkları ve bu işlemde kullanılan jeller, diyalizatörlerin aparatları gibi malzemelerde üreyerek kontaminasyonlara yol açabilmektedir.

Bir enfeksiyonun hastane enfeksiyonu şeklinde tanımlanması için etken olan mikroorganizmanın, hastanın hastaneye yatışından en az 48 saat sonra izole edilmesi gereklidir (73). Bizim çalışmamızdaki SXT dirençli *S. maltophilia*'ların çoğunluğu (%90.63'ü) hastane kaynaklı idi.

S. maltophilia; hastanelerde, özellikle YBÜ'lerinde, uzun süreli yatan, geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavi alan, kistik fibrozisli, transplantasyon hastaları ve maligniteli olgularda enfeksiyon oluşturma eğilimindedir (50, 51). Çalışmamızda 2006 - 2011 yılları arasında laboratuvarımızda izole edilen 339 hastaya ait 618 *S. maltophilia* kökeni retrospektif olarak incelemeye alınmış ve kökenlerin %39.8'le en sık YBÜ'lerinde saptandığı görülmüştür. İleri incelemeye aldığımız SXT dirençli *S. maltophilia* kökenlerinin olduğu grupta da %49.9 ile YBÜ'lerinin sırası değişmemektedir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Samonis ve ark (74) Yunanistan'da 2005–2010 yılları arasında bir üniversite hastanesinde *S. maltophilia* enfeksiyonunu YBÜ'sinde %20 şeklinde tespit etmişlerdir. Fransa'da dokuz eğitim hastanesinin katıldığı bir çalışmada 2001 - 2008 yılları arasında çeşitli hasta örneklerinden izole edilen nonfermentatif bakterilerin prospektif incelenmesi yapılmıştır. Bu süre içinde 31 hasta YBÜ tedavi görmüş ve onların 19 tanesinde *S. maltophilia* üremesi görülmüştür (75). Ülkemizde Yıldırım ve ark (76) 36 günlük YBÜ izlemde 5 vaka tespit etmişken; Öztürk ve Şahin (77) izole ettikleri 33 *S. maltophilia* kökeninin 26'sının YBÜ kaynaklı olduğunu saptamıştır. Bizim hastanemizde

2001 yılında yapılan incelemede Çaylan ve ark (8) YBÜ'lerinde %59 oranında bulmuşlardır.

Literatürdeki veriler daha çok erişkin popülasyona ait olsa da *S. maltophilia* yenidoğan ve pediatrik yaş grubu için görülme sıklığı artan hastane enfeksiyonu etkenleri arasındadır. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program'ın 2004 yılında yaptıkları araştırmada Latin Amerika, Kuzey Amerika ve Avrupa'da pediatrik yaş grubundan etken patojen olarak toplanan kökenler arasında *S. maltophilia* tüm bölgeler içinde 15., Latin Amerika'da 10., Kuzey Amerika'da ise 13. sırayı almıştır; Avrupa'da ise patojen olarak görülmemiştir (42). Bizim çalışmamızda hem SXT dirençli hem de SXT duyarlı *S. maltophilia* üretilen hasta grupları incelendiğinde, büyük kısmını yenidoğan YBÜ'indeki bebeklerin oluşturduğu göze çarpmaktadır. Bu izolatların birbirlerine yakın tarihlerde üretildiklerini göz önünde tutulursa nasocomial çapraz enfeksiyon olabileceği akla gelmektedir. 2006 - 2008 yılları arasında Mutlu ve ark (9) hastanemiz yenidoğan YBÜ'sinde izole edilen *S. maltophilia* kökenleriyle ilgili vaka-kontrol çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada trakeal aspirasyon örneklerinde %46 enfeksiyon oranı tespit etmişler ve risk faktörleri olarak uzun süreli hastanede yatış, invaziv girişimler ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımını belirlemişlerdir. Hastaların gerekli tedavileri için invaziv işlemlerden uzaklaşmak mümkün olamayacağından çapraz enfeksiyonları engellemede sağlık personelinin el hijyenine önem verilmesine dikkat çekmişlerdir (9). Benzer yorum Gulcan ve ark (78) tarafından 2004 yılında yenidoğan YBÜ'nde tespit ettikleri 3 vakada da söz konusu olmuştur.

S. maltophilia solunum yolu enfeksiyonu, endokardit, üriner sistem enfeksiyonları, endoftalmit, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi pek çok klinik tabloya yol açabilmektedir (21, 49). Çalışma sürecinde izolasyon yapılan örnekler retrospektif olarak incelendiğinde %58 ile birinci sırayı solunum yolu örneklerinin aldığı göze çarpmaktadır. Solunum yolu örneklerinin ardından; idrar, kan ve yara örnekleri gelmektedir. Gopalakrishnan ve ark. (79) Ohlo'da iki farklı hastanede YBÜ'lerinde izole edilen *S. maltophilia* kökenlerinin retrospektif incelemesini yaptıkları çalışmalarında ve kendi araştırmalarıyla karşılaştırma yaptıkları beş farklı yayında bizim sonuçlarımıza benzer oranlar saptanmıştır. Kore'de dördüncü basamak bir hastanede 2009 yılı boyunca toplanan kökenler ise sırasıyla solunum yolu örnekleri, idrar, kan ve pü örneklerinden izole edilmiştir (80). Gülmez ve ark (5) ise bizimle uyumlu olarak en sık solunum yolu örneklerinden *S. maltophilia* kökeni izole etmişlerdir. Kendi hastanemiz verilerine baktığımızda ise Çaylan ve ark (8) en sık %47 ile kan ve %34 ile trakeal aspirat

kültürlerinde *S. maltophilia* ürettiklerini bildirmişlerdir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, mikroorganizmanın üretildiği enfeksiyon bölgelerinde yıllar içinde büyük farklılıklar gelişmediğini göstermektedir. Çalışmamızın asıl inceleme alanı olan SXT dirençli *S. maltophilia* kökenlerinde de genel bakıştaki durum değişmemekte ve aynı şekilde en sık materyal türü olarak solunum yolu örnekleri görülmektedir.

S. maltophilia enfeksiyonları açısından risk altındaki hasta popülasyonu tüm dünyada hızla artmaktadır. Bu olumsuz gidişatta kemoteropatik ilaçlar ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, invaziv girişimlerin medikal tedavinin bir parçası haline gelmesi gibi unsurlar önemli rol oynamaktadır (81). Çalışma grubumuza baktığımızda risk faktörleri: YBÜ’de uzun süreli yatış, malignensi, hematolojik malignite, kalıtsal nörolojik hastalıklar, immun süpresyon yapan organ disfonksiyonu, diabetes mellitus, solid organ transplantasyonu, tüberküloz, solunum sistemi patolojisi şeklindedir. Malignensi hastalarında, enfeksiyonlar yönünden diğer hasta gruplarından farklı olarak kemoterapinin indüklediği nötropeni, oraintestinal mukozada hasarlanma, *graft-versus-host* hastalığı ve diyare gibi ek faktörler de bulunabilmektedir. Birçok kanser tedavi merkezinde Gram pozitif bakteriler Gram negatiflerden daha fazla görülmektedir. Fakat bu durum nonfermentatif Gram negatifler penceresinden bakıldığında değişmektedir. Malignensi hastalarında nonfermentatif Gram negatif basillerin, özellikle *S. maltophilia*, enfeksiyonları giderek artmaktadır (82). Bizim inceleme grubumuzdaki SXT dirençli *S. maltophilia* üreyen hastaların %21.9’unda çeşitli kanser türleri bulunmaktadır. Bunların %6.3’ünü hematolojik maligniteler oluşturmaktadır.

Komorbidite etkenlerinden sayılan diabetes mellitus da göz ardı edilemeyecek noktalardandır. Gopalakrishnan ve ark. (79) 1999 yılında yaptıkları retrospektif bir çalışmada 143 hastada %18.2 şeklinde saptamıştır. Bizim çalışmamıza dahil edilen SXT dirençli *S. maltophilia* kökenlerinin ürediği 32 hastanın %25’inde diabetes mellitus hastalığı bulunmaktadır.

Otozomal resesif geçiş gösteren kistik fibrozis hastalığı yaşam süresini kısaltan yaygın hastalıklardan biridir. CFTR (kistik fibrozis transmembran kondüktans regülatörü) proteininde oluşan bozukluk nedeniyle akciğerlerde kronik hastalıklara yol açmaktadır. Bu hastalarda en sık alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olan patojen *Pseudomonas aeruginosa*’dır. Ancak son yıllarda *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* da tehdit oluşturan ajanlar arasına girmiştir (83). *S. maltophilia* enfeksiyonları için risk faktörlerinden biri olan kistik fibrozis hiçbir hastamızda bulunmamaktadır.

Çalışmamızdaki SXT dirençli kökenler %53.1'i monomikrobiyal, %46.9'u polimikrobiyaldir. En sık eşlik eden mikroorganizma %15.6 ile *Pseudomonas aeruginosa*'dır. İkinci sırada ise %9.4 ile *Staphylococcus aureus* gelmektedir. Singapur'da 18 yaşından büyük, *S. maltophilia* kültürü pozitif hastalarda yapılan bir çalışmada monomikrobiyal kültür oranını %37.7, *Pseudomonas aeruginosa* birlikteliğini ise %23.3 olarak bulmuşlar. Bunun yanı sıra Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (%24.7), *Enterococcus spp.* (%22), *Acinetobacter baumannii* (%22), *Klebsiella spp.* (%17.3), *Escherichia coli* (%9.3)'nin birlikte üremeleri gösterilmiştir (84). Coğrafik açıdan yakın komşumuz olan Yunanistan'da 2005 -2010 yıllarında yapılan restrospektif çalışmada tüm birimlerden gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen *S. maltophilia* kökenlerine sıklık sırasına göre *Klebsiella pneumoniae* (%10.3), *Pseudomonas aeruginosa* (%8.8), *Acinetobacter spp.* (%5.9), *Achromobacter xylosoxidans* (%2.9), *Escherichia coli* (%1.5)'nin eşlik ettiği tespit edilmiştir (74). Ülkemizde Hacettepe Üniversitesi hastanesinde Gülmez ve ark (5) yaptıkları çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer şekilde *S. maltophilia*'ya eşlik eden diğer bakterileri şöyle sıralamışlardır: *Pseudomonas aeruginosa* (%24.7), *Staphylococcus aureus* (%20.1), *Klebsiella spp.* (%12.1), *Acinetobacter spp.* (%10.3).

Günümüzde farklı coğrafik bölgelerden hatta farklı hastanelerden izole edilen kökenlerin antibiyotik duyarlılık profillerinin değişiklikler gösterdiği bilinmektedir (6, 41). *S. maltophilia* karbepenemler gibi geniş spektrumlu pek çok antibiyotiğe doğal direnç taşımaktadır (10). Taşıdığı intrensek dirençlere ek olarak her geçen gün dünyanın farklı bölgelerinden kazanılmış direnç raporları bildirilmektedir (6, 43, 47). Kazanılmış dirençlerle ilgili olarak çoğunlukla mobil gen bölgeleri suçlanmaktadır (55). Bu konuyla ilgili olarak özellikle son yıllarda kendilerine komşu genleri yanıda taşıyabilen ISCR elemanları gündeme gelmeye başlamıştır (60). Bu durum klinisyenlerin elinde *S. maltophilia* tedavisinde kullanabilecekleri az sayıda ajan kalmasına neden olmaktadır. Pek çok otör ilk tercih edilmesi gereken ilacın SXT olduğunu bildirmektedir. Ancak bu ajana karşı da direnç geliştiği yönünde sesler giderek yükselmektedir (6, 40, 41, 42). Çalışmamızda 2006–2011 yılları arasında izole edilen 339 hastaya ait *S. maltophilia* suşlarını incelenmiş ve %9.4'ünü SXT dirençli olduğunu görülmüştür. Sader ve Jones'nın (7) SENTRY Antimicrobial Surveillance Programı (1997-2003) dahilinde yaptıkları çalışmada tüm dünyadan çeşitli örneklerden toplanan 3059 nonfermentatif Gram negatif basillerin (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* suşları hariç) en büyük kısmını %59.2 (2076) ile *S. maltophilia* suşları oluşturmaktadır. Bu *S. maltophilia* suşlarının

%4.7'sinde SXT direnci saptanmıştır (7). Malezya'da Neela ve ark (43) 2008 Ocak - Aralık tarihleri arasında 56 *S. maltophilia* üremiş hasta izolatu içinde bir tane SXT dirençli suş saptamışlardır. Kore'de 2009 yılında toplanan 90 örnekte %4 oranında direnç saptanmıştır (80). Hu ve ark (47) Çin'de yaptıkları çalışmada *S. maltophilia* üremiş 102 hastada %30.4 oranında direnç saptamışlardır. Yunanistan'da ise direnç oranı %13.2 olarak bulunmuştur (74). Ülkemizde bu konuda yapılan yayınları incelediğimizde 2005'te Tatman Oktun ve ark (45) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yaptıkları araştırmada çeşitli örneklerden izole ettikleri 52 suşta %98.1 oranında duyarlılık düzeyi görmüşlerdir. Nazik ve ark (85) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde kistik fibrozisli hastalardan üretilen *S. maltophilia* suşlarında SXT duyarlılığını %100 olarak belirlemişlerdir. Türk Dağı ve ark (86) Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2007 - 2010 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen *S. maltophilia* izolatlarında SXT direncini %10 olarak saptamışlardır. Gülmez ve ark (86) 2010 yılındaki yayınlarında SXT direnç oranını %4 olarak bulmuşken, 2005 yılındaki yayınlarında %28.3 olarak tespit etmişlerdir (5). Zer ve ark (88) Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı mikrobiyoloji birimine Ocak 2007 - Ocak 2008 tarihleri arasında gönderilen çeşitli örneklerde yaptıkları çalışmada SXT duyarlılığını %97.3 olarak belirtmişlerdir. Hastanemiz verilerini incelersek Çaylan ve ark (8) 2004'te tüm yaş gruplarında ve tüm örneklerde *S. maltophilia*'da SXT direnç oranı %2.3, Mutlu ve ark (9) yenidoğanlarda yaptıkları çalışmada %3 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamız sonucunda görüldüğü üzere tüm dünyada olduğu gibi bizim hastanemizde de *S. maltophilia* direnç sorunu giderek artmaktadır.

S. maltophilia SXT'ye karşı direnç efluks pompa sistemi, biyofilm oluşumu gibi nedenlere bağlı olabileceği gibi bizim çalışmamızda araştırdığımız mobil direnç genleriyle de gelişebilir. Lévesque ve ark (70) kullandığı 3'CS ve 5'CS primerleriyle yaptığımız tarama sonucunda 32 hasta suşunun sadece bir tanesinde integron sınıf I geni tespit edilmiştir. Toleman ve ark. (6) *sulI-F* ve *sulI-R* primerleriyle yapılan taramada ise integron sınıf I tespit ettiğimiz suşta *sulI* geni de pozitif bulunmuştur. Bizim sonucumuza benzer şekilde Neela ve ark (43) da 64 suştan birinde integron sınıf I ve *sulI* genlerini tespit etmişlerdir. Toleman ve ark (6) tüm dünyadan toplanan 25 SXT dirençli *S. maltophilia* suşunun 17'sinde integron sınıf I ve *sulI* geninin birlikteliğini göstermişler ve bu çalışmayla Kuzey Amerika ve Avrupa'da ilk defa *sulI* taşıyan *S. maltophilia* izolatu raporlamışlardır. Kore'de Song ve ark (89) 2007 - 2009 yılları arasında üç üniversite hastanesinde toplanan 120 *S. maltophilia* suşunun 19'unu SXT dirençli bulmuş, bu suşların

içinde de 10 tanesinde integron sınıf I ve *sul1* birlikteliğini saptamışken; aynı durum Çin'de 2006 - 2009 yılları arasında 31 adet SXT dirençli *S. maltophilia* suşunun 21'inde görülmüştür (47).

Çalışmamızda bir izolatta PZR işlemi ile amplifiye ettiğimiz integron sınıf I gen kasetinin nükleotid dizi analizini incelediğimizde beta-laktamaz geni (*oxa2*), aminoglikozid direnç geni (*aac6'*) ve kuarter amonyum direncine yol açan *qacF* genin varlığı görülmüştür. Bu dizilimin hemen yanında ise *sul1* geni bulunmaktadır. İntegronların aktarılabilir olan gen bölgeleri oldukları göz önünde tutulursa tespit ettiğimiz gen kasetini taşıyan *S. maltophilia* suşunun direnç genleri açısından rezervuar rol oynayabileceğini düşünürmektir.

Literatürde çalışmamıza benzer araştırmalar incelendiğinde Tayvan'da ve Malezya'da kuarterner amonyum direnç genleri bulunmuş ve bu genleri SXT direnci oluşmasında etkili olduğu vurgulanmıştır. Bu maddeyi içeren dezenfektanların önerilen dozların üzerinde kullanılması hastanelerde direnç miktarının artmasına neden olacağına değinmektedirler (43). SENTRY'nin 2007'deki beş farklı kıtada yaptığı çalışmada amplifiye ettikleri sınıf I integronların içerikleri; Almanya ve Brezilya suşlarında *sul* ve *qac* genlerini, ABD ve Şili suşlarında *aacA4* genini, Meksika'dan gönderilen 2 suşa ise *aacA7* ve *aadA5* genlerini tespit etmişlerdir (6). Çin'de yapılan çalışmalarda ise çoğunlukla *aminoglycoside-3''-adenyltransferases* (*aadA*), *aac*, *dfrA*, *chloramphenicol acetyltransferase* (*cat*) genlerinin farklı birlikteliklerini içeren gen kasetleri tespit etmişlerdir (47, 90). Kore'de ise *aacA4*, *aadA1*, *aac6''-II* ve *qac* genlerinden oluşan integron sınıf I bulunmuştur (89). Tayvan'da yapılan bir çalışmada bizim sonucumuza benzer dirençler içerse de dizilimleri (*aacA4*, *aadB*, *aacC4*, *aacA6-Ib*, *smr*, *smr/aacA4*, *qac*, *cmlA*, *catB2* ve *blaIMP-8/aac6''-II/aadA5*) farklıdır (32). Bütün bu incelemelerin sonucun çalışmamızda tespit ettiğimiz integron sınıf I gen kasetinin sahip olduğu gen dizilimi ilk kez çalışmamızda bulunmuştur.

Çalışmamızda Teloman ve ark (6) kullandığı SXT direncini gösteren diğer primerlerle yapılan PCR'larda *sul2*, *dfrA9*, *dfrA10* ve *dfrA20* genlerinin boyutlarında bant tespit edilmemiştir. Ayrıca mobil ISCR genlerini genel olarak tarayan CRF primerleriyle yapılan PCR sonucu amplifikasyon bandı saptanamamıştır. *sul* geniyle beraber bulunabilen kloramfenikol direncini gösteren *flo* geni PCR'la amplifiye edilmeye çalışılmış ama jel elektroforezde bant görülmemiştir (6).

Sonuç olarak; PZR işleminde amplifikasyon göremediğimiz SXT dirençli *S. maltophilia* suşlarının SXT antibiyotigine karşı direnç geliştirmesinin çalıştığımız genler

dışında kalan gen bölgelerinin varlığına bağlı olabileceği ya da efluks pompa sistemi, biyofilm oluşturma gibi farklı mekanizmalardan kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır. İntegron gen kasetlerinin aktarılabilir olabileceği göz önünde tutularak sadece *S. maltophilia*'da değil farklı türdeki bakterilerin tedavisinde de zorluklara yol açabileceği unutulmamalıdır.

6. ÖNERİLER

- İntegron sınıf I gen kaseti tespit edilen suşta genin aktarılabılır olduğu konjugasyonla yöntemi ile araştırılmalıdır.
- Uygulanan PZR işlemlerinde amplifikasyon görülmeyen suşlarda SXT direncine neden olan diğer mekanizmalar araştırılmalıdır.
- *S. maltophilia* 'nın SXT direnç oranlarını düşürebilmek için;
 - uygun antibiyotik politikaları geliştirilmeli,
 - yabancı cisimlerin uzun süre kullanılmasından kaçınılmalı,
 - gerekli enfeksiyon kontrol politikaları uygulanmalı,
 - hasta ve sağlık personeline hastane enfeksiyonlarını önlemeye yönelik eğitimler verilmeli,
 - ampirik tedavide başarıyı belirleyen bakteri-ilaç ilişkisinin bilinmesi için sık aralıklarla direnç araştırmaları yapılmalı,
 - farklı coğrafik bölgelerde antimikrobiyal duyarlılıkları izlemek amacıyla sürveyans çalışmaları düzenlenmelidir.

7. ÖZET

Non-fermentatif Gram negatif basil olan *Stenotrophomonas maltophilia*, hastane enfeksiyonları ve fırsatçı enfeksiyonlar açısından giderek artan bir öneme sahiptir. Çeşitli mekanizmaları kullanarak aminoglikozidler, beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe direnç gösterir. Bu durum klinisyenlerin ampirik tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) hem etki gücü hem de kullanılabilen hasta profilinin genişliği nedeniyle tedavide ilk tercih olarak önerilen antibiyotiktir. Ancak son yıllarda farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda bu antibiyotiğe karşı da direnç görüldüğü bildirilmeye başlanmıştır.

Çalışmamızda 339 hastaya ait 618 izolat *S. maltophilia* olarak tanımlandı. Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi ve agar dilüsyon yöntemi ile SXT direnci saptanan 32 farklı *S. maltophilia* izolatında dirence neden olduğu bilinen genler (*sul1*, 2, *dhfr* geni, *ISCR* gen bölgeleri ve sınıf I ve II integron gen kasetleri) özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle araştırıldı. Ardından amplifiye edilen ürünlerin nükleotit dizi analizleri yapıldı. Bu işlemlerin sonucunda bir izolatta İntegron Sınıf I gen kaseti ve *sul1* geninin varlığı tespit edildi. Gen kasetinin nükleotit dizi analizi incelendiğinde ise *oxa2*, *aac'6* ve *qacF* direnç genlerini içerdiği belirlendi. Literatür taraması sonucunda çalışmamızda tanımlanan antibiyotik direnç genleri dizisinin daha önce raporlanmadığı görüldü.

İntegronların aktarılabilir gen kasetleri oldukları göz önünde tutulduğunda, tespit edilen suşun direnç genleri açısından rezervuar olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak hastanemizden izole edilen *S. maltophilia* kökenlerinde SXT antibiyotiğine karşı direnç oluşturacak genlerin varlığına dair epidemiyolojik veriler elde edildi. Bu veriler hastanemizdeki *Stenotrophomonas maltophilia* salgınlarının takibi, nazokomiyal bulaşın önlenmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerini desteklemede kullanılacaktır.

8. SUMMARY

Stenotrophomonas maltophilia which is a non-fermentative Gram-negative bacilli has an increasing importance in terms of nosocomial infections and opportunistic infections. By using the various mechanisms, it shows resistance to many broad-spectrum antibiotic such as aminoglycosides, beta-lactams, and tetracyclines. This situation is quite limiting for empirical treatment options for clinicians. Because of the potency and the width of the patient profile that can be used, trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) is recommended as the first choice antibiotic treatment. However, in recent years, studies in different geographical regions have been reporting a resistance against this antibiotic.

In our study, 618 isolates of 339 patients identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. The genes that are known as SXT resistance determining genes (*sul1*, 2, *dhfr* gene, ISCR gene regions and class I, II, integron gene cassettes) studied by using specific primers for polymerase chain reaction method in 32 isolates which had been detected the presence of SXT resistance by Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) automate microbiology system and agar dilution methods. As a result of this assay in one strain class I integron gene cassette and *sul1* gene detected. Nucleotide sequence analysis of the gene cassette is determined that it contains *oxa 2*, *aac'6* and *qacF* resistance genes. The literature review identified that this antibiotic resistance genes which are detected by our study were not reported before.

Integrations are mobile gene cassettes therefore they can be a reservoir of resistance genes. Thus, the strain which is identified through the study is important for the transfer of resistance genes to other bacteria. As a conclusion, epidemiological data obtained for the presence of SXT resistance genes in *Stenotrophomonas maltophilia* strains that are isolated at our hospital. These data can be used to support follow up of outbreaks, prevention transmission and taking control measures of nosocomial infections of *Stenotrophomonas maltophilia* in our hospital.

9. KAYNAKLAR

1. NC Gordon, DW Wareham: Novel variants of the Smqnr family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Antimicrobial Chemother, 65: 483–489, 2010.
2. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA: Klinik Mikrobiyoloji (Çev Edit. AC Başustaoğlu). 9. Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, cilt 1: 734-802, 2009.
3. Nyč O, Matějková J: *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant Contemporary Hospital Pathogen. Folia Microbiologica, 55(3): 286–294, 2010.
4. Pages D, Rose J, Conrod S, Cuine S, Carrier P, Heulin T, Achouak W: Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS ONE, 3(2): e1539, 2008.
5. Gülmez D, Hasçelik G: *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. Clinical Microbiology and Infection, 11(11): 880-886, 2005.
6. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DMC, Jones RN, TR Walsh: Global Emergence of Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* Mediated by Acquisition of *sul* Genes. Emerging Infectious Diseases, www.cdc.gov/eid, 13(4), 2007.
7. Sader HS, Jonesa RN: Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. International Journal of Antimicrobial Agents, 25: 95–109, 2005.

8. Çaylan R, Kaklıkkaya N, Aydın K, Aydın F, Yılmaz G, Özgümüş B, Köksal İ: An Epidemiological Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains in a University Hospital. Japanese Journal of Infectious Diseases, 57: 37-40, 2004.
9. Mutlu M , Yılmaz G, Aslan Y, Bayramoğlu G: Risk factors and clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in neonates. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 44: 467-472, 2011.
10. Denton M, Kerr KG: Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews: 57–80, 1998.
11. Hugh R, Ryschenkow E: *Pseudomonas maltophilia*, an Alcaligenes -like Species, Journal of General Microbiology, 26: 123-132, 1961.
12. Palleroni NJ, Bradbury JF: *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. *Xanthoronas* 1983. International Journal Of Systematic Bacteriology, July: 606-609, 1993.
13. Heylen K, Vanparys B, Peirsegeale F, Lebe L, De Vos P: *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2056–2061, 2007.
14. Hayward AC, Fegan N, Fegan M, Stirling GR: *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. Journal of Applied Microbiology, 108(3): 756-770, 2010.
15. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, Çeviri editörü: Başustaoğlu AC: Tıbbi Mikrobiyoloji, 6. Baskı, Atlas Kitapçılık, 2010.
16. Looney WJ: Role of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection. British Journal of Biomedical Science, 62(3): 145-54, 2005.

17. Schable B, DL Rhoden, R Hugh, RE Weaver, N Khardori, PB Smith, GP Bodey, RL Anderson: Serological classification of *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) based on heat-stable O antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 1011–1014, 1989.
18. Moss CW, Samuels SB, Liddle J, Mc Kinney RM: Occurrence of branched chain hydroxy fatty acids in *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology*, 114: 1018-1025, 1973.
19. de Oliveira-Garcia D, Dall’Agnol M, Rosales M, Azzuz ACGS, Alcántara N, Martinez MB, Girón JA: Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular Microbiology*, 5(9): 625–636, 2003.
20. de Oliveira-Garcia D, Dall’Agnol M, Rosales M, Azzuz ACGS, Martinez MB, Girón J A: Characterization of Flagella Produced by Clinical Strains of *Stenotrophomonas maltophilic*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 918-923, 2002.
21. Nicodemo AC, Paez JIG: Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *European Journal of Clinical Microbiology of Infection Disease*, 26: 229-237, 2007.
22. Alonso A, Martinez JL: Cloning and Characterization of SmeDEF, a Novel Multidrug Efflux Pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 44(11): 3079-3086, 2000.
23. Alonso A, Martí’Nez JL: Expression of Multidrug Efflux Pump SmeDEF by Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45(6): 1879–1881, 2001.
24. Gould VC, Avison MB: SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 1070-1076, 2006.

25. Li XZ, Zhang L, Poole K: SmeC, an Outer Membrane Multidrug Efflux Protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 46(2): 333-343, 2002.
26. Zhong L, Men TY, Li H, Peng ZH, Gu Y, Ding X, Xing TH, Fan JW: Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections after liver transplantation: Spectrum and risk factors. *Journal of Infection*, 64: 299-310, 2012.
27. Nunvar J, Drevinek P, Licha I: DNA profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* by PCR targeted to its species-specific repetitive palindromic sequences. *The Society for Applied Microbiology*, 54: 59–66, 2011.
28. Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, Fiscarelli E, Zarrilli R, De Carolis E, Petrucca A, Nencioni L, Colonna B, Casalino M: *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: Genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *International Journal of Medical Microbiology*, 301: 34-43, 2011.
29. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K: *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infectious Diseases*, 9: 312-23, 2009.
30. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, Fiscarelli E, Dicuonzo G, Savini V, D'Antonio D, Di Bonaventura G: Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiology*, 11: 159, 2011.
31. McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K: Role of Phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Virulence, and Antibiotic Resistance: *Infection And Immunity*, 71(6): 3068–3075, 2003.

32. Liawa SJ, Leea YL, Hsuehb PR: Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial*, 35: 126–130, 2010.
33. Zhu H, Thuruthyil SJ, Willcox MDP: Production of *N*-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 29: 150–152, 2001.
34. Khmel'IA, Veselova MA, Metlitskaia AZ, Klein S, Lipasova VA, Maiatskaia AV, Chernin LS: Synthesis of signaling *N*-acyl-homoserine-lactones participating in quorum sensing in rhizosphere and soil bacteria *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Genetika*, 38(4): 568-570, 2002.
35. Sánchez MB, Martínez JL: SmQnr Contributes to Intrinsic Resistance to Quinolones in *Stenotrophomona maltophilia*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 34(1): 580-581, 2010.
36. Alonso A, Sanchez P, Martí'Nez JL: *Stenotrophomonas maltophilia* D457R Contains A Cluster Of Genes From Gram-Positive Bacteria Involved In Antibiotic and Heavy Metal Resistance: *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 44(7): 1778-1782, 2000.
37. Goldberg E, Bishara J: Contemporary unconventional clinical use of co-trimoxazole. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 8-17, 2012.
38. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard 7th ed. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
39. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, cilt 1: 248-252, 2002.

40. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J: Emerging importance of *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in severely ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance program (1997–1999). *Clinical Infectious Diseases*, 32(Suppl): 104-113, 2001.
41. Jones RN, Sader HS, Beach ML: Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18 569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 551-556, 2003.
42. Fedler KA, Biedenbach DJ, Jones RN: Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among paediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on three continents. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56: 427-36, 2006.
43. Neela V, Rankouhi SZR, van Belkum A, Goering RV, Awang R: *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim–sulfamethoxazole resistance. *International Journal of Infectious Diseases*, 16: 603–607, 2012.
44. Memish1 ZA, Shibl AM, Kambal AM, Ohaly YA, Ishaq A, Livermore DM: Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29: 32-41, 2012.
45. Tatman-Otkun M, Gürcan Ş, Özer B, Aydoslu B, Bukavaz Ş: The antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* solates using three different methods and their genetic relatedness. *BMC Microbiology*, 5(24), 2005.
46. Sanchez, Hernandez, Martinez: *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiology*, 4(6): 655-660, 2009.

47. Hua LF, Changa X, Yea Y, Wangc ZX, Shaoa YB, Shia W, Lia X, Li JB: *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated smif 1 integron. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 230-234, 2011.
48. Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Rafailidis PI, Kapaskelis AM, Dimopoulos G: Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiology*, 4(9): 1103–1109, 2009.
49. Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Dimopoulos G: Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28: 719-730, 2009.
50. Garcia Paez JI, Costa SF: Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 70: 101-108, 2008.
51. Garazi M, Singer C, Tai J, Ginocchio C C: Bloodstream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review. *Journal of Hospital Infection*, Feb: 1-5, 2012.
52. de Vrankrijker AMM, Wolfs TFW, Van der Ent CK: Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 11: 246–254, 2010.
53. Parkins MD, Elborn JS: Newer antibacterial agents and their potential role in cystic fibrosis pulmonary exacerbation management. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65: 1853-1861, 2010.
54. Whitby PW, Carter KB, Burns JL, Royall JA, LiPuma JJ, Stull TL: Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12): 4305-4309, 2000.

55. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J: Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel and Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6): 1568–1574, 2000.
56. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH: IntI2 Integron Integrase in Tn7. *Journal of Bacteriology*, 184(6): 1712-1721, 2002.
57. Mazel D: Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Publishing Group*, 4: 608-620, 2006.
58. Kuyucu N: Antibiyotik Direnci, *Çocuk Enfeksiyonları Dergisi*, 1: Özel Sayı 1; 33-8, 2007.
59. Köseoğlu Ö: İntegronlar. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 38, s: 308-312, 2004.
60. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR: ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 70(2): 296–316, 2006.
61. Davies J: Microbes have the last word. *EMBO reports*, 8(7): 616-618, 2007.
62. Robson RL, Essengue S, Reed NA, Horvat RT: Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 58(2):185-90, 2007.
63. <http://www.bd.com/ds/>
64. O'Hara CM: Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST System and NID Panel for Identification of Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, and Commonly Isolated Nonenteric Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 928-933, 2006.

65. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disc Susceptibility Tests; Approved Standards-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute Document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 ABD, 2006.
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informatinal Supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1887-1898 ABD, 2007.
67. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standart M7-A4. In: National Committee for Clinical Laboratory Standarts., ed. Villanova, Pa.: 1997:4.
68. Begum D, Strockbine NA, Sowers EG, Jackson MP: Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(12): 3153-3156, 1993.
69. Lim KT, Yasin R, Yeo CC, Puthuchearu S, Thong KL: Characterization of Multidrug Resistant ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Malaysia. *Journal of iomedicine and Biotechnology*, Article ID 165637, 2009.
70. Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH: PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 185-191, 1995.
71. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD: Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 2658–2661, 2001.
72. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

73. Alexander L L: Nosocomial Infections. Accreditation Council for Continuing Medical Education Resource, Sacramento, California No:9447, 2007.
74. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Maraki S, Levis P, Dimopoulou D, Spernovasilis N A, Kofteridis D P, Falagas ME: *Stenotrophomonas maltophilia* Infections in a General Hospital: Patient Characteristics, Antimicrobial Susceptibility, and Treatment Outcome. PLoS ONE | www.plosone.org, 7(5), 2012.
75. Fihman V, Le Monnier A, Corvec S, Jaureguy F, Tankovic J, Jacquier H, Carbonnelle E, Bille E, Illiaquer M, Cattoir V, Zahar JR: *Stenotrophomonas maltophilia* The most worrisome threat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: A prospective multicenter study. Journal of Infection, 64(4): 391-398, 2012.
76. Yıldırım F, K Kart Yaşar, G Şengöz, R Yamanlar, F Nayman, K İdin: Erişkin Yoğun Bakım Ünitesinde *Stenotrophomonas maltophilia* İnfeksiyonu ve Kontrolü. ANKEM Dergisi, 23(4):166-171, 2009.
77. Öztürk R, Şahin N: Değişik klinik örneklerden üretilen *Stenotrophomonas maltophilia* kökenlerinde kotrimoksazol ve diğer antibiyotiklere karşı direnç durumu. ANKEM Dergisi, 15(2): 170, 2001.
78. Gulcan H, Kuzucu Ç, Durmaz R: Nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection: Three cases in newborns. American Journal of Infection Control, 32: 365-368, 2004.
79. Gopalakrishnan R, Bradford Hawley H, Czachor JS, Markert RJ, Bernstein JM: *Stenotrophomonas maltophilia* infection and colonization in the intensive care units of two community hospitals: A study of 143 patients. HEART & LUNG, 28(2): 134-141, 1999.

80. Chung H, Hong SG, L Yangsoon, Kim M, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y: Antimicrobial Susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from a Korean Tertiary Care Hospital. *Yonsei Medical Journal*, 53(2): 439-441, 2012.
81. Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, Matthaiou DK, Hsueh PR: Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 889–894, 2008.
82. Safdar A, Rolston KV: *Stenotrophomonas maltophilia*: Changing Spectrum of a Serious Bacterial Pathogen in Patients with Cancer. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 1602–1609, 2007.
83. Lambiase A, Raia V, Del Pezzo M, Sepe A, Carnovale V, Rossano F: Microbiology of airway disease in a cohort of patients with Cystic Fibrosis. *BMC Infectious Diseases*, 6:4, 2006.
84. Kwa ALH, Low JGH, Lim TP, Leow PC, Kurup A, Tam V H: Independent Predictors for Mortality in Patients with Positive *Stenotrophomonas maltophilia* Cultures. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 37: 826-830, 2008.
85. Nazik H, Öngen B, Erturan Z, Şalcıoğlu M: Genotype and Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 60: 80-86, 2007.
86. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ: Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antibiyotik Direnci. *ANKEM Dergisi* 25(1): 27-30, 2011.
87. Gülmez D, Çakar A, Şener B, Karakaya J, Haşçelik G: Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing. *Journal of Infection and Chemotherapy*, May, 2010.
88. Zer Y, Karaoğlu İ, Çevik S, Erdem M: *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının İrdelenmesi. *Klimik Dergisi*, 22(1): 21-24, 2009.

89. Song JH, Sung JY, Kwon KC, Park JW, Cho HH, Shin SY, Ko YH, Kim JM, Shin KS, Koo SH: Analysis of Acquired Resistance Genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 30:295–300, 2010.
90. Wua K, Wanga F, Suna J, Wanga Q, Chenb Q, Yub S, Ruia Y: Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40: 264– 267, 2012.