



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK FİBROZ HASTALARINDA SAPTANAN  
POLİMİKROBİYAL ENFEKSİYON ETKENLERİ ARASINDAKİ  
ETKİLEŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

MEHMET MÜCAHİT GÜNCÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. M. BURAK AKSU

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK FİBROZ HASTALARINDA SAPTANAN  
POLİMİKROBİYAL ENFEKSİYON ETKENLERİ ARASINDAKİ  
ETKİLEŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

MEHMET MÜCAHİT GÜNCÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. M. BURAK AKSU

2019-İSTANBUL

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Mehmet Mücahit GÜNCÜ  
Tez Başlığı : Kistik Fibröz hastalarında saptanan polimikrobiyal enfeksiyon etkenleri arasındaki etkileşimlerin araştırılması  
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Sınav Tarihi : 19.06.2019

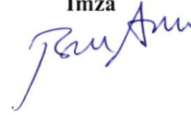
Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

### Kurumu

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Burak AKSU Marmara Üniversitesi

### İmza



### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Güner SÖYLETİR Marmara Üniversitesi



Prof. Dr. Tanıl KOCAGÖZ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17.07.2019. tarih ve 154 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Mehmet Mücahit GÜNCÜ

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasındaengin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımı, hoşgörüsü, sevgisi ve sonsuz sabrı ile daima bana destek olan, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren değerli öğretmenim ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi M.Burak AKSU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince başta bilimsel fikir ve düşünceleri olmak üzere, bana her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Güner SÖYLETİR'e, Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN'a, Prof. Dr. Münevver Ufuk HASDEMİR'e, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU'na, Prof. Dr. Nurver ÜLGER'e, ve Prof. Dr. Zeynep Arzu İLKİ'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yaşamımın her döneminde olduğu gibi bu aşamada da desteklerini esirgemeyen, başta annem ve babam olmak üzere canım aileme, yüksek lisans arkadaşlarıma, laboratuvardaki tüm çalışan arkadaşlarıma, Kamil Hajiyeve ve can dostlarıma gönülden teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-110618-0302 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Mehmet Mücahit GÜNCÜ

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| BEYAN.....                                                                                                            | i   |
| ÖNSÖZ.....                                                                                                            | ii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                     | iii |
| KISALTMA VE SİMGELER.....                                                                                             | v   |
| ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ.....                                                                                    | vii |
| ÖZET .....                                                                                                            | 9   |
| SUMMARY .....                                                                                                         | 10  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                                                                 | 11  |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                                                | 14  |
| 2.1. Kistik Fibroz .....                                                                                              | 14  |
| 2.1.1. Kistik fibroz mikrobiyolojisi .....                                                                            | 15  |
| 2.1.2. Kistik fibrozda polimikrobiyal enfeksiyonlar .....                                                             | 17  |
| 2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                               | 21  |
| 2.2.1. Karakteristik özellikleri .....                                                                                | 21  |
| 2.2.2. <i>S.aureus</i> 'un KF'deki yeri .....                                                                         | 22  |
| 2.2.3. <i>S. aureus</i> KF'da virülansı .....                                                                         | 23  |
| 2.2.3.1. Toksin Üretimi.....                                                                                          | 24  |
| 2.2.3.2. Adaptasyon ve sürekliliği.....                                                                               | 24  |
| 2.2.3.3. Biyofilm üretimi .....                                                                                       | 25  |
| 2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                                                              | 26  |
| 2.3.1. Karakteristik özellikleri .....                                                                                | 26  |
| 2.3.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın KF'deki yeri .....                                                                   | 26  |
| 2.3.3. <i>P. aeruginosa</i> 'nın KF'deki Virülansı .....                                                              | 28  |
| 2.3.3.1. Bağlanma ve hareket.....                                                                                     | 28  |
| 2.3.3.2. Aljinat salgılanması, “quorum sensing” ve biyofilm üretimi.....                                              | 29  |
| 2.3.3.3. Tip III salgılama sistemi .....                                                                              | 30  |
| 2.3.3.4. Piyosiyanin .....                                                                                            | 31  |
| 2.3.3.5. Diğer salgılanan virülans faktörleri .....                                                                   | 31  |
| 2.4. KF'da <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın Birlikte Kolonizasyonu .....                                 | 32  |
| 2.5. <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın Birlikte Neden Oldukları KF Enfeksiyonlarına Klinik Yaklaşım ..... | 35  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....                                                                                            | 36  |
| 3.1. Gereçler .....                                                                                                   | 36  |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1. Besiyerleri.....                                                                                                                         | 36 |
| 3.1.2. Kimyasal maddeler.....                                                                                                                   | 36 |
| 3.1.3. Kullanılan cihazlar .....                                                                                                                | 37 |
| 3.2. Bakteri İzolatlarının Belirlenmesi.....                                                                                                    | 38 |
| 3.3. Bakterilerin İdentifikasyonu .....                                                                                                         | 38 |
| 3.4. Klinik İzolatlardan Çeşitli Hücre Fraksiyonlarının Hazırlanması .....                                                                      | 39 |
| 3.5. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Üreme Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....                                                   | 40 |
| 3.6. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....                                        | 41 |
| 3.6.1. Biyofilm tespiti için kristal viyole boyama yöntemi.....                                                                                 | 42 |
| 3.7. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Araştırılması..... | 42 |
| 3.8. Klinik İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının (MİK Saptama) Belirlenmesi .....                                                       | 43 |
| 3.8.1. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının tobramisin MİK düzeyinin belirlenmesi .....                                                            | 43 |
| 3.8.2. MRSA izolatlarının linezolid ve vankomisin MİK düzeyinin belirlenmesi.....                                                               | 44 |
| 3.9. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Antibiyotik Duyarlılığına Etkisinin Araştırılması .....                                         | 45 |
| 3.9.1. Klinik <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarında MİK değişiminin araştırılması .....                                                   | 45 |
| 3.9.2. Klinik MRSA izolatlarında MİK değişiminin araştırılması .....                                                                            | 46 |
| 3.10. İstatistiksel Analiz.....                                                                                                                 | 46 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                               | 47 |
| 4.1. Klinik İzolatların Üreme Değerleri.....                                                                                                    | 47 |
| 4.2. Klinik İzolatların Biyofilm Üretimi .....                                                                                                  | 56 |
| 4.3. Biyofilm Üretiminin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi .....                                                                   | 63 |
| 4.4. Klinik İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları .....                                                                                        | 69 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                                      | 72 |
| 6. KAYNAKÇA .....                                                                                                                               | 80 |
| EKLER .....                                                                                                                                     | 90 |
| EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU .....                                                                                                                | 90 |
| EK-2 POSTER VE SÖZLÜ SUNUMLAR .....                                                                                                             | 91 |
| EK-3 ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                             | 95 |

## KISALTMA VE SİMGELER

- ADP: Adenozin Difosfat
- $aG_{m1}$ : Glikolipid Asiola-gangliozid
- AI2: Otoindüktör
- AlgT: Aljinat
- ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
- BL: Bakteri Lizatı
- cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat
- CFTR: Kistik Fibroz Transmembran Regülatör
- CO<sub>2</sub>: Karbondioksit
- Cfu: Koloni Oluşturan Ünite
- EUCAST: Avrupa Antimikrobiyal Testi Komitesi
- EF2: Elongasyon Faktör 2
- G1cNAc: N-Asetil Glikozamin
- HQNO: 2-N-Heptil-4-Hidroksikinolon N-Oksit
- HK-MRSA: Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- KF: Kistik Fibroz
- LB: Luria Bertani
- MRSA: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- MSSA: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*
- MDR: Çoklu ilaç Dirençli
- MDR-PA: Çoklu ilaç Dirençli *Pseudomonas aeruginosa*
- MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
- MHB: Müller-Hinton Sıvı Besiyeri
- NO<sub>3</sub>: Azot
- nm: Nanometre
- OD: Optik Yoğunluk
- ÖB: Ölü Bakteri
- PVL: Panton-Valentine Lökosidin
- PBS: Fosfat Buffer Saline
- RSV: Respiratuar Sinsityal Virüs
- RPM: Dakikada Devir Sayısı

- SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu
- SEA: Stafilokok Enterotoksin A
- SCV: Küçük Koloni Varyantı
- SCVs: Stafilokok Küçük Koloni Varyantı
- SN: Süpernatant
- TK-MRSA: Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
- TSTT-1: Toksik Şok Sendromu Toksini
- v/v: Hacim/Hacim
- QS: Çoğunluk (Quorum) Algılanması



## ŞEKİL, RESİM ve TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen, KF hastalarından izole edilmiş bakterilerin yaşlara göre dağılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 16 |
| Şekil 2 KF hastalarında polimikrobiyal akciğer enfeksiyonlarının yeri ve rolü .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 18 |
| Şekil 3 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen KF hastalarından izole edilmiş MSSA ve MRSA suşlarının hasta yaşlarına göre dağılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 23 |
| Şekil 4 <i>S. aureus</i> virülans faktörleri ve etki mekanizmaları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 24 |
| Şekil 5 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen KF hastalarından izole edilmiş <i>P. aeruginosa</i> ve MDR-PA suşlarının hasta yaşlarına göre dağılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Şekil 6 <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın salgıladığı moleküller ve etkileşimleri. <i>P. aeruginosa</i> 'nın salgıladığı ekzotoksinler, <i>S. aureus</i> 'un biyofilm üretimi, oksidatif solunum, ve virülansını değiştirir ve bakterinin parçalanmasına yol açar. <i>S. aureus</i> 'un lizisi ile ortaya çıkan G1cNAc, <i>P. aeruginosa</i> kinolon sinyalinin aktifleştirerek virülans faktörlerinin ifadesini etkilemektedir (Hotterbeekx ve ark., 2017). ..... | 34 |
| Şekil 7 Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin üreme üzerindeki etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| Şekil 8 Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin biyofilm üretimi üzerindeki etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| Şekil 9 Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin antibiyotik duyarlılığına etkisi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 45 |
| Şekil 10 <i>P. aeruginosa</i> 'dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının <i>S. aureus</i> izolatlarının üremesi üzerindeki etkileri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 52 |
| Şekil 11 <i>S. aureus</i> kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart <i>P. aeruginosa</i> 24s SN varlığında üreme değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 53 |
| Şekil 12 <i>S. aureus</i> 'dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının üremesi üzerindeki etkileri .....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 54 |
| Şekil 13 <i>P. aeruginosa</i> kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart <i>S. aureus</i> 24s SN varlığında üreme değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 55 |
| Şekil 14 <i>S. aureus</i> 'dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının biyofilm üretimi üzerindeki etkileri.....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 58 |
| Şekil 15 <i>P. aeruginosa</i> kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart <i>S. aureus</i> 24s SN varlığında biyofilm üretim değerlerinin karşılaştırılması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 59 |
| Şekil 16 <i>P. aeruginosa</i> 'dan elde edilen 8s süpernatant, 24s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının <i>S. aureus</i> izolatlarının biyofilm üretimi üzerindeki etkileri .....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 61 |
| Şekil 17 <i>S. aureus</i> kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart <i>P. aeruginosa</i> 8s SN varlığında biyofilm üretim değerlerinin karşılaştırılması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 62 |

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 18 <i>S. aureus</i> kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart <i>P. aeruginosa</i> 24s SN varlığında biyofilm üretim değerlerinin karşılaştırılması .....                      | 63 |
| Resim 1 Klinik <i>P.aeruginosa</i> (PSE 1094) kökeninin tek başına inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).....                                                               | 64 |
| Resim 2 Birlikte izole edilen <i>S.aureus</i> (SA 1070) 8s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik <i>P.aeruginosa</i> (PSE 1094) kökeninin SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü). .....    | 65 |
| Resim 3 Birlikte izole edilen <i>S.aureus</i> (SA 1070) 24s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik <i>P.aeruginosa</i> (PSE 1094) kökeninin SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü). .....   | 66 |
| Resim 4 Klinik <i>S.aureus</i> (SA 1070) kökeninin tek başına inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).....                                                                    | 67 |
| Resim 5 Birlikte izole edilen <i>P.aeruginosa</i> (PSE 1096) 8s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik <i>S.aureus</i> (SA 1070) kökeninin SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).....      | 68 |
| Resim 6 Birlikte izole edilen <i>P.aeruginosa</i> (PSE 1096) 24s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik <i>S.aureus</i> (SA 1070) kökeninin SEM görüntüleri (2.50 K× büyütmedeki görünümü).....  | 69 |
| Tablo 1. Klinik izolatların monokültürde üreme değerleri (OD 600 nm) .....                                                                                                                            | 47 |
| Tablo 2 Klinik izolatların 8s süpernatantı (8s SN) varlığında üreme değerleri (OD 600 nm) .                                                                                                           | 48 |
| Tablo 3 Klinik izolatların 24s süpernatantı (24s SN) varlığında üreme değerleri (OD 600 nm) .....                                                                                                     | 49 |
| Tablo 4 Klinik izolatların Ölü bakteri (ÖB) fraksiyonu varlığında üreme değerleri (OD 600 nm).....                                                                                                    | 50 |
| Tablo 5 Klinik izolatların Bakteri lizatı (BL) fraksiyonu varlığında üreme değerleri (OD 600 nm).....                                                                                                 | 51 |
| Tablo 6 Klinik izolatların biyofilm üretim değerleri (48s, OD: 550 nm) .....                                                                                                                          | 56 |
| Tablo 7. Klinik <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart <i>S. aureus</i> kökenlerinden hazırlanan çeşitli hücre fraksiyonları varlığında biyofilm üretim değerleri ..... | 57 |
| Tablo 8 Klinik <i>S.aureus</i> izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart <i>P. aeruginosa</i> kökenlerinden hazırlanan çeşitli hücre fraksiyonları varlığında biyofilm üretimleri.....         | 60 |

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 9 Klinik <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının <i>S. aureus</i> 24s SN varlığında tobramisin MİK değerlerinde değişim ..... | 70 |
| Tablo 10 Klinik <i>S. aureus</i> izolatlarının <i>P.aeruginosa</i> 24s SN varlığında vankomisin MİK değerlerinde değişim ..... | 70 |
| Tablo 11 Klinik <i>S. aureus</i> izolatlarının <i>P.aeruginosa</i> 24s SN varlığında linezolid MİK değerlerinde değişim .....  | 71 |



## ÖZET

### Kistik Fibroz Hastalarında Saptanan Polimikrobiyal Enfeksiyon Etkenleri Arasındaki Etkileşimlerin Araştırılması

Mehmet Mücahit Güncü, M.Burak Aksu, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**AMAÇ:** Kistik fibroz (KF) hastalarının klinik örneklerinden birlikte izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları arasındaki karşılıklı etkileşimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Buna yönelik olarak in vitro koşullarda her bir patojenin üreme, biyofilm üretimi, antimikrobiyal duyarlılık paternleri üzerindeki karşılıklı etkileri belirlenmiştir.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmaya KF hastalarının balgam örneklerinden birlikte izole edilmiş 9 MRSA ve 9 *P. aeruginosa* suşu dahil edildi. İzolatlar Luria-Bertani sıvı besiyerinde (LB ) üretildi; 8 ve 24 saatlik kültür süpernatantları (8s SN; 24s SN), mekanik bakteri lizati ve ısı ile öldürülmüş bakteri hücreleri hazırlandı. Her bir izolat kendisiyle birlikte izole edilen suştan hazırlanan yukarıda belirtilen fraksiyonlarla birlikte inkübe edilerek üreme ve biyofilm üretimi (fenotipik yöntem ve taramalı elektron mikroskobu analizi kullanılarak) açısından test edildi. Ayrıca 24s SN varlığında antibiyotik duyarlılık (*P.aeruginosa* için tobramisin; MRSA için vankomisin ve linezolid) değişimleri araştırıldı.

**BULGULAR:** *P. aeruginosa* fraksiyonlarının varlığında MRSA kökenlerinin üreme analizlerinde, 24s SN ile bir artış (%15.3) gözlenirken, ancak diğer fraksiyonlar azalmaya (%-12.1-%-30.3, aralığında) neden olmuştur. *P. aeruginosa* tüm fraksiyonları MRSA'nın biyofilm üretimini artırmıştır (%152.1-%293.1, aralığında).

MRSA fraksiyonlarının varlığında *P. aeruginosa* kökenlerinin üreme analizinde, 24s SN ile artış (%9.3) görülürken, ancak diğer fraksiyonlar varlığında azalma (%-7.2-%-8.6, aralığında) gözlenmiştir. MRSA fraksiyonlarının çoğu ile *P. aeruginosa*'nın biyofilm üretimi artmış (%152.1-%293.1, aralığında), ancak hücre lizati varlığında azalma (%-32.9) görülmüştür. Ayrıca SEM analizi ile de biyofilm artışı belirlenmiştir.

MRSA'nın 24s SN ürünü, *P. aeruginosa*'nın tobramisin duyarlılığında herhangi bir etki göstermemiştir. *P. aeruginosa*'nın 24s SN ürünü, MRSA'nın linezolid MİK değerlerinde 2->32 kat artışa sebep olmuş, ancak vankomisin MİK değerlerinde değişiklik gözlenmemiştir.

**SONUÇLAR:** Her iki bakteri için de durağan fazda salınan faktörlerin (24s SN) üremeyi artırdığı, diğer fraksiyonların ise inhibe ettiği görülmüştür. Genel olarak, hazırlanan tüm bakteri fraksiyonları her iki tür için de (MRSA için *P.aeruginosa* lizati hariç) biyofilm üretimini desteklemektedir. 24s SN varlığında, MRSA kökenlerinin neredeyse tamamında (8/9 köken) linezolid duyarlılıklarında azalma (2->32 kat MİK artışı) ve dirençli kategoriye geçiş saptanmıştır.

Bulgularımız, MRSA ve *P. aeruginosa*'nın polimikrobiyal enfeksiyonlarında patojenler arası etkileşimlere bağlı olarak üreme, biyofilm yapımı gibi fizyolojik süreçlerin yanısıra antibiyotik duyarlılıklarının da değişebileceğini göstermiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalarla polimikrobiyal enfeksiyonlarında patojenler arası etkileşimde rol oynayan faktörlerin saptanması ve altta yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile bu enfeksiyonların patogenezi ve tedavisinde önemli ipuçları elde edilebilecektir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Kistik Fibroz, Polimikrobiyal Enfeksiyon, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *Staphylococcus aureus*

## SUMMARY

### Investigation of Interactions Between Pathogens Isolated From Polymicrobial Infections In Cystic Fibrosis Patients

Mehmet Mücahit Güncü, M.Burak Aksu, Department of Medical Microbiology

**AIM:** The aim of this study was to investigate the interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains co-isolated from clinical samples of cystic fibrosis (CF) patients. For this purpose, the mutual effects of each pathogen on *in vitro* growth, biofilm formation, and antimicrobial susceptibility patterns were determined.

**MATERIALS METHODS:** Nine MRSA and 9 *P. aeruginosa* strains co-isolated from sputum samples of CF patients were included. All isolates were grown in Luria-Bertani broth medium, and 8 and 24 hour culture supernatants (8s SN; 24s SN), mechanically lysed and heat-killed bacterial samples were prepared. Each isolate were tested for growth and biofilm formation (by using phenotypic method and scanning electron microscopy analysis) with the presence of above fractions obtained from its co-isolate. Additionally, effects of 24s SN samples on antibiotic susceptibility (tobramycin for *P.aeruginosa*; vancomycin and linezolid for MRSA) were investigated.

**RESULTS:** Analysis of MRSA growth in the presence of *P. aeruginosa* fractions revealed an increase (mean 15.3%) with 24 SN, but decrease with other fractions (means -12.1% to -30.3%).

MRSA biofilm formation in the presence of *P. aeruginosa* all fractions was significantly increased (means 152.1% to 293.1%).

*P. aeruginosa* growth in the presence of MRSA fractions showed an increase (mean 9.3%) with 24 SN, but decrease with other fractions (means -7.2% to -8.6%). Biofilm formation of *P. aeruginosa* showed increases with fractions prepared from MRSA (means 152.1% to 293.1%) but decreased with cell lysates (mean, -32.9%). These biofilm increases were also observed in the SEM studies.

24s SN from MRSA had no effect on tobramycin susceptibility of *P. aeruginosa* strains. 24s SN from *P. aeruginosa* caused 2->32 fold increase in linezolid MICs of MRSA strains, but no changes observed on vancomycin MICs.

**CONCLUSION:** The factors released at the stationary phase (24s SN) were increased the growth of both bacteria, and other fractions caused growth inhibition. In general, all bacterial fractions (except *P.aeruginosa* cell-lysate) were supported biofilm formation of both species. 24s SN caused decrease in linezolid susceptibility (2->32 fold MIC increase) and change to resistant category in almost all MRSA isolates (8/9).

Our results are shown that interspecies interactions can affect the physiological processes such as growth, and biofilm formation as well as antibiotic susceptibility profiles in polymicrobial infections involving MRSA and *P. aeruginosa*. Future studies conducting to detect the factors related with the interactions of pathogens and highlight the background molecular mechanisms would give important insights and clues for treatment of polymicrobial infections.

**KEY WORDS:** Cystic Fibrosis, Polymicrobial infections, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik bir hastalık olan kistik fibroz (KF), hücrelerde transmembran iletkenlik sistemini düzenleyen kistik fibroz transmembran regülatör (CFTR; Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu gen, epitel hücrelerinin apikal membran kısmında yer alan iyon kanalını kodlamakta olup, aynı zamanda vücuttaki bir çok hücre tarafından eksprese edilmektedir. Solunum sistemi hücrelerinde bu iyon kanalları, hava yolu üzerindeki sıvı miktarının kontrolüne yardım ederek mikrosiliyer temizlenmeye katkıda bulunmaktadır. CFTR genindeki mutasyonlar sonucunda iyon kanalı fonksiyonu bozulduğundan, solunum yollarını kaplayan mukus sekresyonu koyulaşır ve kolayca temizlenemeyen bir yapıya bürünür. Bu koyu mukus tabakası bakterilerin kolaylıkla kolonize olmalarına ve akciğerlerde enfeksiyonun gelişimine ve devamlılığına neden olur (Matsui ve ark., 1998; Pezzulo ve ark., 2012)

KF hastalarının solunum yolu enfeksiyonlarında saptanan başlıca patojenler; *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kompleks olarak sıralanabilir. Bunlarla birlikte, önemli fırsatçı patojenler arasında olan *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve tüberküloz dışı mikobakteriler de bu hastalarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bakteriler dışında çeşitli virus ve mantarlar da KF hastalarında kolonize olabilmektedir. KF’da sayılan mikroorganizmaların, tek başına veya sıklıkla birlikte kolonizasyona yol açtıkları ve polimikrobiyal enfeksiyon yapabildikleri gösterilmiştir. Bu polimikrobiyal etkenler, birden fazla faktörün de devreye girmesi ile akciğer mikrobiyotası ile bir etkileşim içerisinde bulunur. KF prognozu sürecinde sık uygulanan antibiyotik tedavisi, konak bağışıklık faktörleri ve değişmiş bir akciğer ortamı (hipoksi, anoksi) söz konusudur. Bu durum, genellikle akciğer florasının azalması ve tedaviye adapte olmuş ya da direnç kazanmış patojenlerin kolonizasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca bu polimikrobiyal enfeksiyonlarda rol alan patojenler de birbirlerine karşı sinerjistik veya antagonistik özellikler sergilerler (Harrison, 2007; Fodor ve ark., 2012; Filkins ve O’Toole, 2015).

KF hastalarında solunum yollarında polimikrobiyal enfeksiyon etkeni olarak en sık saptanan patojenler *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’dır. *S. aureus*, özellikle pediatrik grup KF hastalarında en erken saptanan patojenlerin başında gelir.

*P. aeruginosa* ise hastalığın erken döneminde zaman zaman kolonizasyon yaparken, hastalığın geç evresinde baskın hale gelmektedir (Windmüller ve ark., 2015). Bu yapısal olarak çok farklı olan iki bakteri türü, birbirleri ile etkileşerek, üreme özellikleri, biyofilm yapımı, hücre duvar sentezi ve antibiyotik duyarlılığı gibi faktörler açısından değişimler sergileyebilmektedir. Patojenin ürettiği çeşitli virülans faktörleri ve ikincil metabolitlerin bu değişimlere neden olabildikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle *P.aeruginosa*, 2-n-heptil-4-hidroksikinolon N-oksit (HQNO) türevi maddeler sentezleyerek, *S.aures*'ün üremesinde negatif bir etki oluştururken, biyofilm oluşumu ve hücre duvar sentezinde ise destekleyici bir rol üstlenmektedir. Biyofilm üretimi ve hücre duvar kalınlığındaki artışa paralel olarak bakterinin antibiyotik duyarlılığında azalma görülebilmektedir (Mitchell ve ark., 2010; Hotterbeekx ve ark., 2017).

KF'de akciğer hastalığının doğrudan tedavisinde yer alan beş temel yöntem; antibiyotikler, bronkodilatörler, mukolitik ajanlar, antiinflamatuvar ilaçlar ve havayolunun temizlenmesine katkı sağlayan otojenik drenaj, egzersiz ve oksijen terapisi. KF hastalarının tedavisinde antibiyotik kullanımı, yeni bir etkene ve enfeksiyöz alevlenmelere cevaben yapılmaktadır. Antibiyotik kullanımı prognoza göre bazen kombine olarak uygulanmakta, böylelikle patojenin tamamen eradike edilerek direnç kazanmasının önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Diğer yandan ise antibiyotiklerin kullanımı immün modülatör etkinin yanında, konağa zararlı olabilen yan etkiler de yaratmaktadır. Ayrıca bakteri direnç gelişimine ya da bazı virülans faktörlerin ekspresyonunun artmasına da yol açmaktadır. Bu antibiyotiklere en iyi örnekler, aminoglikozid grubu içerisinde yer alan özellikle tobramisin, gentamisin ve amikasin. Bazı çalışmalarda bu antibiyotiklerin *P. aeruginosa* ve *Escherichia coli*'de biyofilm artışına dolayısıyla da direnç gelişimine katkı yaptıkları gösterilmiştir (McIlwaine ve Davidson, 1996; Ramsey, 1996; Hoffman ve ark., 2005).

Limoli ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları çalışmada, KF hastalarından tek başına ve *S. aureus* ile birlikte izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarını *in vitro* ortamda karşılaştırıldıklarında, tek başına izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının *S. aureus* suşlarına karşı, birlikte izole edilenlere göre daha yarışmacı olduğu belirlemişlerdir. Yaptıkları deneylerde bu durumun tek başına izole edilen *P. aeruginosa* suşunun daha az aljinat üretimine bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Daha önceki verilere dayanarak, elde ettikleri sonuçların aljinatın, *S.aureus*'un inhibisyonunda önemli rolü olan HQNO, siderofor ve ramnolipid üretimini baskılamasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Limoli ve ark., 2017).

Bu çalışmada; 2015-2017 yılları arasında, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kistik Fibroz Polikliniğinde takip edilen KF hastalarının balgam örneklerinden eş zamanlı izole edilmiş *P. aeruginosa* ve MRSA suşlarının karşılıklı etkileşimlerinin, her bir patojenin *in vitro* koşullarda üreme, biyofilm yapımı ve hücre morfolojisi özellikleri üzerindeki etkilerinin saptanması ve böylece hastalığın patogenezinine ilişkin verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kistik Fibroz

Kistik fibroz, batı toplumundaki beyaz popülasyon arasında yaygın ve ölümcül olan otozomal resesif bir genetik hastalıktır. İnsan vücudunun birden fazla ve farklı organ yapısında yer alan epitel hücrelerinde bulunan kistik fibroz transmembran regülatör (CFTR) genindeki mutasyonlar bu hastalığa neden olmaktadır. CFTR geni 7. kromozom üzerinde bulunur ve bir transmembran protein olan CFTR proteinini kodlamaktadır. Bu gende günümüze kadar 2061 farklı mutasyon tespit edilmiştir. Bunların 1500'den fazlasının KF hastalığına neden olduğu düşünülmektedir (De Boeck ve ark., 2014)

(<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>, Erişim tarihi, 15 Mayıs 2019).

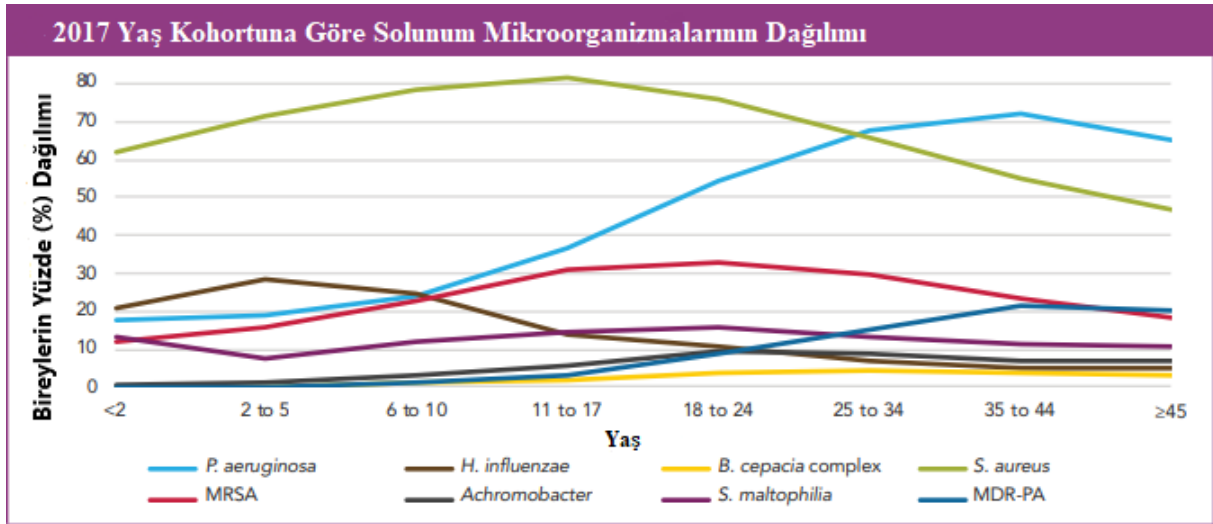
Kistik fibroz hastalarındaki bu genetik hata hemen hemen tüm organları etkilemesine karşın, mortalite ve morbidite açısından en fazla akciğer hastalıklarına neden olmaktadır. CFTR'nin temel görevi, siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılı klor kanallarındaki iyon ve su dengesini sağlamaktır. Bu gendeki mutasyonlar, bu dengenin bozulmasına ve sıvı sekresyonunun azalmasına buna bağlı olarak da mikrosiliyalar tarafından temizlenemeyen kıvamlı bir mukus tabakasının birikmesine neden olmaktadır. Bu biriken kalın ve koyu mukus tabakası, solunum fonksiyon bozukluklarına ve fırsatçı patojenlerin kolonizasyonuna sonuçta enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Davis ve ark., 1996; Kumar ve ark, 2014).

Kistik fibroz, Avrupa'da yaklaşık 42000, dünyada ise 70000'in üzerinde insanı etkilemektedir (<https://www.ecfs.eu/ecfspr>, Erişim tarihi: 15 Mayıs 2019; <https://www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/>, Erişim tarihi, 15 Mayıs 2019). KF' de yapılan araştırmalara bağlı geliştirilen yeni tedavi ve yaklaşımlar, bu hastalığın yaşam ömrünü artırmış ve hastaların daha kaliteli bir yaşam sürdürmesine olanak sağlayarak, hayatın her alanında yer almalarını sağlamıştır. İngiltere'de 2017'de yayımlanan KF raporuna göre, tahmini genel ortalama yaşam ömrünün 47 yaş olduğu, kadınlarda 43 yaş, erkeklerde ise 49 yaş olduğu bildirilmiştir (<https://www.cysticfibrosis.org.uk/the-work-we-do/uk-cf-registry/reporting-and-resources/at-a-glance-report-2017>, Erişim tarihi, 15 Mayıs 2019).

### 2.1.1. Kistik fibroz mikrobiyolojisi

Patojen mikroorganizmalar, KF hastalarının yaşamlarının ilk evrelerinden itibaren solunum yolunda kolonize olmaya başlar ve ileriki dönemlerde çoğunlukla kronik enfeksiyonlara sebep olurlar. Aynı zamanda bu patojenler çoğu hastada tekrarlayan akut enfeksiyonlara (alevlenmeler) ve bunlarla ilişkili solunum yetmezliklerine sebep olmakta ve buna bağlı ölümler görülebilmektedir (Lyczak ve ark, 2002).

KF hastalarında en sık kolonize olan patojen bakteriler arasında *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* yer almaktadır. Bunlara ek olarak, *Burkholderia cepacia* kompleks, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* ve tuberküloz dışı mikobakteriler gibi fırsatçı patojenler KF hastalarında sıklıkla kolonize olmaktadır. *Prevotella*, *Actinomyces* ve *Veillonella* gibi anaerobik patojenler de bu hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilebilmektedir (Lipuma, 2010; Fodor ve ark., 2012). Ayrıca, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.* ve *Citrobacter spp.* türleri kalıcı kolonize bakteriler arasında yer almayan ve KF hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilmiş geçici bakteri türleridir (Renders ve ark., 2001). KF hastalarında kolonize olan tüm bakteriler için zamana ve yaşa bağlı olarak kolonizasyon oranları değişkenlik gösterebilmekte ve buna bağlı olarak hastalığın akut veya kronik seyri de değişebilmektedir (Şekil 1). *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* gibi bakteriler KF hastalarında erken dönemde baskın kolonizasyon gösterirken; daha geç dönemde, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* kompleks ön plana geçerek kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır (Sibley ve ark., 2006).



Annual Data Report 2017 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry

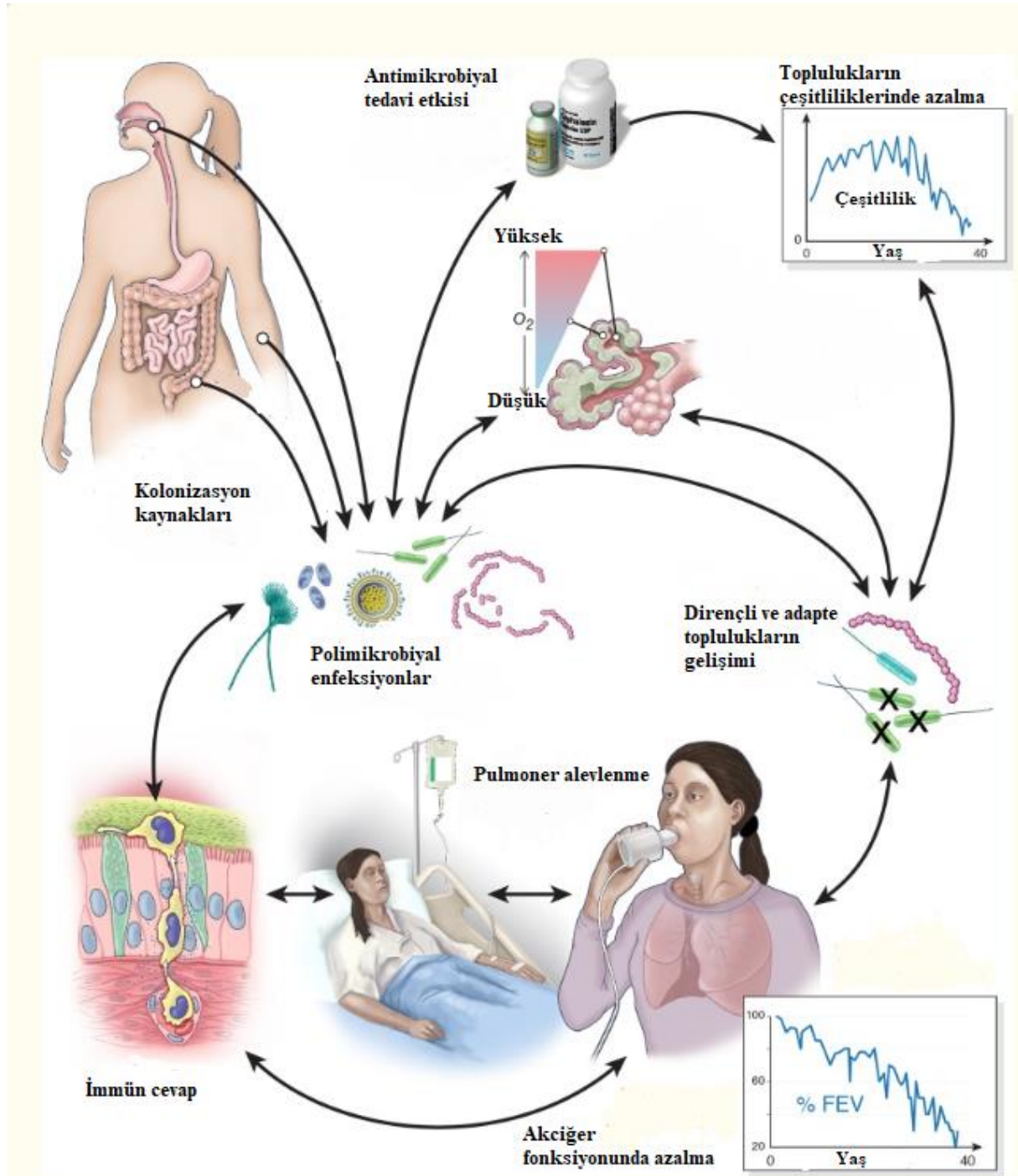
**Şekil 1** 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen, KF hastalarından izole edilmiş bakterilerin yaşlara göre dağılımı

Mantar sporları doğada yaygın olarak bulunmakta olup, kandida gibi kimi cinsler ise normal flora üyeleri arasında yer almaktadırlar. Bunlar ile ilişkili olarak KF hastalarında solunum yolu, bazı mantar türleri ile kolonize olabilmektedir. Bunlar içinde en sık izole edilen türler, *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans*'dır (Haas ve ark., 1991). Bunların dışında, *Exophiala dermatitidis*, *Penicillium* ve *Scedosporium* türleri de rapor edilen diğer mantarlar arasında yer almaktadır (Pihet ve ark., 2009).

Viral solunum yolu patojenleri, sağlıklı bireylerde ve KF hastalarında eşit sıklıkta enfeksiyona yol açmaktadır. Fakat üst solunum yolu enfeksiyonlarının, alt solunum yolu semptomları ile ilişkisinden dolayı enfeksiyonlar KF hastalarını klinik olarak daha fazla etkilemektedir. Viral enfeksiyonlar, KF hastalarında hastanede yatmayı gerektiren pulmoner alevlenmelere sebep olabilmekte ve bu enfeksiyonu takiben hastaların örneklerinden yaygın olarak yeni bakteri türleri (*P. aeruginosa* gibi) izole edilmektedir. Bu yeni kolonizasyonun sinerjistik bir etki ile oluştuğu düşünülmektedir. KF hastalarında en sık saptanan viral patojenler respiratuar sinsityal virüs (RSV), ikinci sırada influenza A ve B virüsleri gelmektedir. Bununla birlikte düşük sıklıkta olsa da parainflunza virus ve adenovirus'de KF hasta örneklerinden saptanan patojenlerdir (Van Ewijk ve ark., 2005; Sibley ve ark., 2006).

### **2.1.2. Kistik fibrozda polimikrobiyal enfeksiyonlar**

Polimikrobiyal enfeksiyonlar, birden fazla mikroorganizmanın oluşturduğu, her bir mikroorganizmanın sinerjistik ve antagonistik etkileşimlerinin rol aldığı enfeksiyonlardır. Yapılan çalışmalar, KF hastalarının solunum yollarından birlikte izole edilen birden fazla mikroorganizmanın karşılıklı iletişim içerisinde olduğu ve bunun da hastalık patogenezi etkilediğini bildirmektedir (Hibbing ve ark., 2010; Rogers ve ark., 2010). Rogers ve arkadaşları 2003’de yaptıkları çalışmada, KF hastalarının balgam ve bronskopi örneklerinden karışık bakteri toplulukları tanımlamışlardır. Bu çalışma, KF’de akciğer enfeksiyonlarında daha önce tanımlanmayan yaygın bakteri türlerinin (zorunlu anaerob bakteriler gibi) tanımlanmasını yapan ilk çalışma olmuştur (Rogers ve ark., 2003). Son yıllarda moleküler saptama yöntemlerinin mikrobiyolojide kullanımının artması, geleneksel kültür yöntemi ile tanımlanamayan veya zor tanımlanan virus, mantar ve bakterilerin birarada ve yoğun miktarda bulunduğu balgam gibi örnekler içerisinde tanımlanmasına olanak sağlamakta ve KF hastalarında polimikrobiyal enfeksiyonlara yeni yaklaşımlarla yol göstermektedir.



Copyright © 2015 Filkins, O'Toole

**Şekil 2** KF hastalarında polimikrobiyal akciğer enfeksiyonlarının yeri ve rolü

KF hastalarının solunum yolları çeşitli flora ve çevresel kaynaklı mikroorganizmalarla kolonize olmaktadır. Buna bağlı olarak hastalarda, çeşitli bakteri, mantar ve virus kaynaklı kronik veya polimikrobiyal enfeksiyonlar gelişmektedir. Bu polimikrobiyal topluluklar, karmaşık çok faktörlü etkileşimler yoluyla hem konağı etkilemekte hem de etkilenmektedir.

KF akciğerinde kolonize mikroorganizma toplulukları sık uygulanan antibiyotik tedavileri, konak bağışıklık faktörleri ve hastalık seyri boyunca değişen akciğer ortamına (hipoksik ve anoksik ortam) maruz kalmaktadır (Şekil 2). Bu değişkenlerin tümü çoğu zaman mikroorganizma çeşitliliğini azaltarak, tedaviye son derece adapte olmuş dirençli mikroorganizmaların kolonizasyonuna zemin hazırlamaktadır. Dolayısıyla hastalığın prognozu da değişkenlik göstermektedir. Sonuç olarak pulmoner alevlenmeler ve ileri evre hastalığa bağlı olarak akciğer fonksiyonlarında hızla gerilemeye sebep olmaktadır. Bu durum KF hastalarında primer morbidite ve mortaliteye neden olan solunum yetmezliğine yol açmaktadır (Filkins ve O'Toole, 2015).

Polimikrobiyal enfeksiyonlar ile ilgili yapılan çalışmalarda, hastaların çoğunda aynı anda ikiden fazla mikroorganizmanın etken olarak saptandığı rapor edilmiştir (Hoiby, 1974; Wahab ve ark., 2004; Anzaudo ve ark., 2005). Polimikrobiyal etkenler arasındaki etkileşimler birkaç farklı şekilde gelişebilmektedir. Bunlar, patojen bir bakterinin ikinci bir bakterinin virülansını artırarak veya azaltarak gösterdiği etki; tek başına hastalığa neden olamayacak mikroorganizmaların, ikincil bir patojenin kolonize olup çoğalmasına izin vermesi ya da daha etkin bir enfeksiyon oluşturabilmek için patojenlerin değişken bir kolonizasyon sıralaması ile diğerine uygun kolonizasyon ortam şartlarını sağlamasıdır. Ayrıca polimikrobiyal enfeksiyonlarda, bir mikroorganizma antagonistik etki ile konağı uyararak diğer mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyebilmektedir. Bu durum normal flora üyesi ve patojen mikroorganizma arasında olabileceği gibi, iki patojen mikroorganizma arasında da görülebilmektedir. Buna karşın polimikrobiyal enfeksiyonlarda görülen sinerjistik etki mekanizmasında ise daha önce kolonize olmuş bir patojen, farklı bir tür patojenin kolonizasyonu ve enfeksiyonu için uygun ortam oluşturmaktadır. Bu etkileşim daha çok benzer metabolik ihtiyaçlara sahip mikroorganizmalar arasında oluşmaktadır. Ayrıca patojen bir mikroorganizma, normal flora üyesininin daha yoğun miktarda üremesini indükleyerek de birlikte enfeksiyon oluşturmaya teşvik edebilmektedir (Smith, 1982; Brogden, Guthmiller ve Taylor, 2005). Bu etkileşimler, mikroorganizmaların kolonizasyonunun artmasına ya da inhibisyonuna, virülans faktörlerinin ekspresyonundaki değişikliklere, biyofilm üretimi ya da antimikrobiyal direnç gelişimi gibi sonuçlara sebep olabilmektedir.

### 2.1.2.1. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda mikroorganizmalar arası sinerjistik etkileşim

KF hastalarında görülen polimikrobiyal enfeksiyonlarda rol alan mikroorganizmalar arasında, eş zamanlı gelişen ve giderek yoğunlaşan bir kolonizasyondan daha çok; zaman içerisinde topluluk yapısındaki değişimlere (dirençli ve ortama adapte olmuş türler) veya tedavi ya da mikroorganizmanın etkisine bağlı değişen ortam yapısından kaynaklı sıralı bir kolonizasyon görülmektedir (Hoiby, 1974; Wahab ve ark., 2004). Örneğin *P. aeruginosa*'nın aljinat üretimi KF hastalarının akciğerlerinde bölgesel bir hipoksiye neden olabilmektedir. Bunun sonucunda anaerobik patojenler gibi diğer mikroorganizmaların kolonizasyonuna imkan sağlarken, başka tür ve cins patojenlerin kolonizasyonu baskılanmaktadır (Worlitzsch ve ark., 2002). Bir başka çalışmada, RSV ile kolonize KF hastalarının ileri dönemde kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonuna daha yatkın olduğu gösterilmiştir (Petersen ve ark., 1981). Diğer yandan KF'deki polimikrobiyal enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen *S.aureus* ve *P.aeruginosa* arasındaki sinerjistik etki, bu hastalığın patogenezinde oldukça önem taşımaktadır. KF hastalarının solunum yolunda *S. aureus*'un kolonizasyonu ile akciğerler çevresel kaynaklı *P.aeruginosa* enfeksiyonuna duyarlı hale gelmektedir. Sonraki aşamada, patogenezinde daha fazla role sahip olan *P. aeruginosa* salgıladığı “quorum sensing” molekülleri (3-oxo-C 12-homoserine lactone ve 2-heptyl-3-hydroxy-4(1 H)-quinolone (HQN)) ile hem immünomodülatör etki oluşturmakta hem de diğer mikroorganizmanın virülansını etkilemektedir. Ayrıca başlangıçta nonmukoid fenotipdeki *P. aeruginosa*, bu etkileşimler sonucu mukoid fenotipe dönüşerek, yüksek aljinat ekspresyonu ile akciğer ortamında değişikliklere neden olarak kronik enfeksiyonlara ve bununla ilişkili KF'de rastlanmayan, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* ve *Mycobacterium abscessus* kolonizasyonlarına olanak sağlamaktadır (May ve ark., 1991; Riedel ve ark., 2001; Hooi ve ark., 2004).

Yukarıda belirtilen bilgiler doğrultusunda, KF'da karışık türlerin birlikte etken olduğu polimikrobiyal enfeksiyonlardaki sinerjistik etkileşimlerin, hastalığın daha şiddetli bir hal almasını ve yeni türlerin kolonizasyonunu desteklediğini göstermektedir.

### **2.1.2.2. Polimikrobiyal enfeksiyonlarda mikroorganizmalar arası antagonistik etkileşim**

Antagonizm, kısıtlı kaynaklar nedeniyle topluluk içindeki organizmaların birbirleri arasındaki zorunlu rekabet olarak tanımlanmaktadır. Bu rekabet ortamında çeşitli faktörlerin salınımına bağlı olarak, diğer organizmanın çoğalmasını baskılayıcı ya da fenotipik değişikliklere neden olmasına antagonistik etki denir.

Antagonistik etkiye örnek olarak, KF’da polimikrobiyal enfeksiyonlarda en sık izole edilen *P. aeruginosa*’nın “quorum sensing” molekülleri ile *S. aureusu*’u lizise uğratarak demir kaynağı olarak kullanması, yine aynı moleküller ile *S. aureusu*’un elektron transport sisteminde değişikliklere neden olarak üremenin yavaşlaması ile küçük koloni varyantlarının (SCV) oluşması gösterilebilir (Mashburn ve ark., 2005; Hoffman ve ark., 2006). Bir başka örnekte ise, bazı bakteriler bakterosin üreterek aynı türdeki ve diğer bakteri türlerini öldürerek antagonistik etki göstermektedir (Michel-Briand & Baysse, 2002).

Tüm bunların yanısıra bazı çalışmalarda konağın bir bölgesinde bulunan mikroorganizmanın da, konak immün sistemini aktifleştirerek farklı bölgedeki kolonizasyonun önüne geçtiği bildirilmiştir. *Lactobacillus casei* veya doğal yoğurdun tüketilmesinin makrofajları uyarak, solunum yolunda kolonize olan *P.aeruginosa*’nın eradike edilmesini sağladığını yapılan deney hayvanı çalışması ile göstermişlerdir (Alvarez ve ark., 2001).

## **2.2. Staphylococcus aureus**

### **2.2.1. Karakteristik özellikleri**

*Staphylococcus aureus*, gram pozitif, hareketsiz, 0.5-1 µm çapında, mikroskopta kok şeklinde görülen, koagülaz pozitif bir bakteridir. Aynı zamanda insan deri ve burun mukozasında kolonize olabilen bir patojendir. Hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da en sık izole edilen patojenler arasındadır.

*S. aureus* üç farklı kategoride enfeksiyona neden olur: (i) yara enfeksiyonları gibi yüzeysel lezyonlar, (ii) gıda zehirlenmesi, haşlanmış cilt sendromu ve toksik şok sendromu gibi toksin aracılı enfeksiyonlar ve (iii) endokardit osteomyelit, pnömoni, beyin abseleri, menenjit ve bakteremi gibi yüksek morbidite ve mortaliteye sahip sistemik enfeksiyonlar (Sousa ve Lencastre, 2004). Enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen bu patojen, yoğun antibiyotik maruziyeti sonucunda metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılan, beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençli suşlar ortaya çıkmıştır.

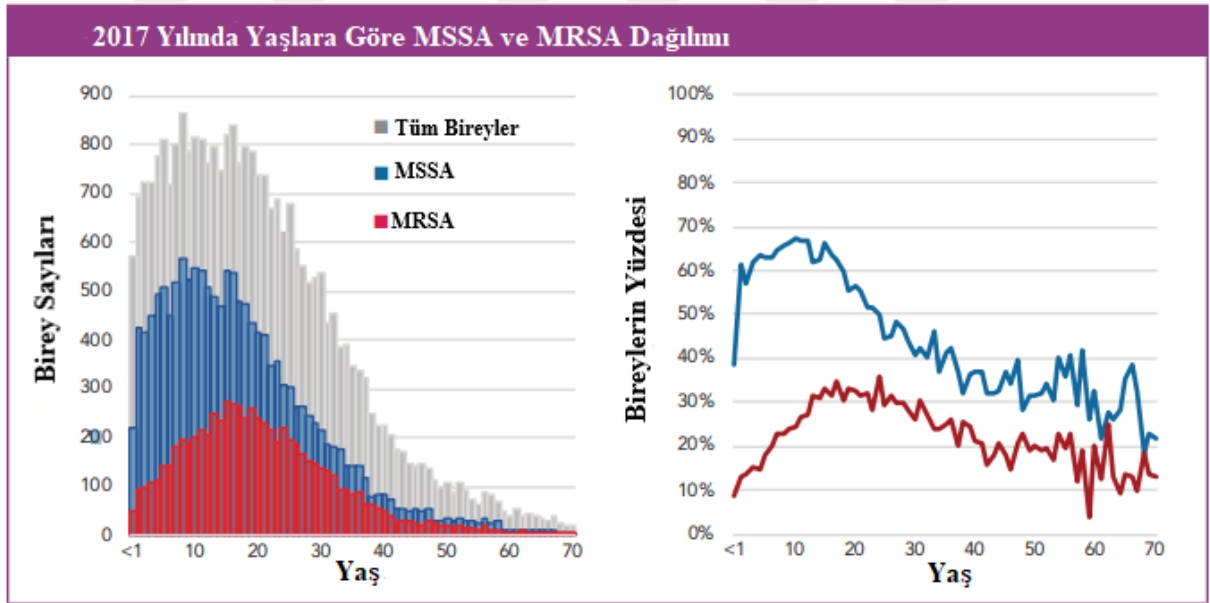
*S. aureus*, 1940'lı yılların başlarında penisilinle ilk karşılaşmasının ardından geçen 2 yıl içerisinde bu antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş ve 1960'lardan bu yana dirençli suşların oranı %80'lere yaklaşmıştır. *S. aureus*'da beta-laktam direnci esas olarak *mecA* geninin kazanımı ile gelişmektedir. İlk dönemlerde metisilin direnci sadece hastane kaynaklı enfeksiyonlardan soyutlanan MRSA suşlarıyla (HK-MRSA) ilişkilendirilmiş, 1990'lardan itibaren toplum kaynaklı MRSA suşları da (TK-MRSA) literatürde yerini almıştır. Yapılan çalışmalar, TK-MRSA'nın genetik olarak HK-MRSA ile benzerlik göstermediğini ve TK-MRSA'nın farklı virülans faktörlerine sahip olduğu, ayrıca daha invaziv potansiyel taşıdığı gösterilmiştir. Bu virülans faktörleri, konağa bağlanma, konak immün cevabına karşı korunma ve konakta hasar oluşturma gibi birden fazla koldan etki gösterebilmektedir (Lowy, 2003; Akil ve Muhlebach, 2018).

### 2.2.2. *S.aureus*'un KF'deki yeri

Günümüzde *S. aureus* hem yetişkin hem de pediatrik KF hastalarında pnömoninin önemli bir etkeni olarak kabul edilmektedir (Bien ve ark., 2011). Bununla birlikte KF enfeksiyonlarındaki yeri ve önemi 20. yy. başlarında yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmıştır. 1905'te yapılan bir çalışmada, KF hastalarından alınan 15 örneğin dokuzunda kültürde *S. aureus* pozitif bulunmuş ve bu hastalarda ilgiyi çeken ilk bakteri olmuştur; günümüzde de bu konumunu korumaktadır (Lyczak ve ark., 2002). *S. aureus* KF hastalarının solunum yollarına yaşamlarının ilk dönemlerinde kolonize olan patojenlerden biridir. Değişken bir ortama sahip KF akciğerinde (hipoksik ve hiperoksik) bu patojenin uzun dönem kolonize kalabilmesi, konak faktörleri, antibiyotikler ve diğer patojenlerle etkileşim açısından uyum sağlaması ile ilişkilidir. Windmüller ve ark., yaptıkları karşılaştırmalı transkriptomik analiz ile *S. aureus*'ta bu etkileşimlere dayalı olduğunu düşündükleri mutasyonların sonucu olan genomik değişimleri göstermişlerdir (Windmüller ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalarda, KF hastalarında *S. aureus* suşları erken dönemde ve yaygın izole edilen etkenler arasında iken, MRSA suşları akciğer fonksiyonlarındaki hızlı bozulma, uzun süre hastanede yatış ve artmış mortalite ile ilişkili olarak kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır (Ren ve ark., 2007; Dasenbrook ve ark., 2010).

Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'nun yayınladığı 2017 raporunda, genel olarak bireylerin yarısından fazlasının en az bir kültüründe MSSA pozitif olarak bulunmuş ve en yüksek prevalans 10 yaş altı çocuklar arasında gösterilmiştir. Buna karşın en yüksek MRSA prevalansı 10 ile 30 yaş arası bireylerde saptanmıştır (Şekil 3) (<https://www.cysticfibrosis.org.uk/the-work-we-do/uk-cf-registry/reporting-and-resources/at-a-glance-report-2017>, Erişim tarihi, 15 Mayıs 2019).



Annual Data Report 2017 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry

**Şekil 3** 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen KF hastalarından izole edilmiş MSSA ve MRSA suşlarının hasta yaşlarına göre dağılımı

### 2.2.3. *S. aureus* KF'da virülansı

*Staphylococcus aureus* konak savunmasından kaçmak ve konakta hasar oluşturmak için birçok virülans faktörü üretmektedir (Şekil 4) (Foster, 2005). Buna karşın KF enfeksiyonlarında *S. aureus*'un ürettiği çeşitli virülans faktörlerinin etkileri ve bu faktörlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler tam olarak bilinmemektedir (Stone ve Saiman, 2007).

| Virölans Faktörleri      | Fonksiyonları                                                               | Örnekler                                                                           |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Membran Etkili Toksinler | Konak Hücre Membranının Lizisi                                              | Lökotoksinler, Lökosidinler, Hemolizinler                                          |
| Hücre Dışı Proteinler    | Nötrofillerin İnhibasyonu                                                   | CHIPS, Eap                                                                         |
| Yüzey Faktörleri         | Fagositik Yutulmadan Kaçınma                                                | Kapsül, Protein A                                                                  |
| Biyokimyasal Özellikler  | Serbest Oksijen Radikallerin Uzaklaştırılması<br>Lizozim Direnci            | Karotenoidler<br>O-Asetil Transferaz                                               |
| Ekzotoksinler            | Fagositozdan kaçınma<br>Konak Doku Hasarı                                   | Süperoksit Dismutaz Enzimleri<br>Super Antijenler, Toksik Şok Enzimi, Enterotoksin |
| Antimikrobiyal Direnç    | T-Hücre ve Antikor üretimin İnhibasyonu<br>Doğal ve Kazanılmış Mekanizmalar | $\beta$ -Laktamazlar<br>mecA Geninin Kazanımı, Effluks Pompası                     |
| İnvazivler               | Konakta Yayılma                                                             | Lökosidinler, Kinazlar, Hyaluronidazlar                                            |

CHIPS, Stafilokok Kemotaksis İnhibitör Protein; Eap, Ekstrasellüler Adhezyon Protein; PVL, Panton-Valentine Lökosidin.

**Şekil 4** *S. aureus* virölans faktörleri ve etki mekanizmaları

### 2.2.3.1. Toksin Üretimi

*S. aureus*'un virölansının önemli bir bölümü, aksesuar gen regülatörü (*agr* lokusu) tarafından kontrol edilen toksinlerin salgılanması ile ilişkilidir. Bu virölans faktörleri arasında,  $\alpha$ -hemolizin, toksik şok sendromu toksini (TSST-1), SEA (Staphylococcal enterotoxin A) ve Panton-Valentine lökosidin (PVL) bakteriyemi, osteomiyelit ve nekrotik pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlarla ilişkilidir (Akil ve Muhlebach, 2018).

TK-MRSA suşları sıklıkla PVL eksprese etmektedir. PVL, nötrofil, monosit ve makrofajların membran yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak bu hücrelerin nekrozunu indükleyen sitolitik bir toksindir (Colin ve ark., 1994). Ayrıca *in vitro* çalışmalar, PVL'nin güçlü bir kemotaktik ajan olan lökotrien B<sub>4</sub>'ün regülasyonunu içeren farklı mekanizmalar tarafından enflamasyonu desteklediğini de öne sürmektedir (Hensler ve ark., 1993).

### 2.2.3.2. Adaptasyon ve sürekliliği

Virölans faktörlerine ek olarak, antibiyotik baskısı ve konak immün yanıtı, *S. aureus*'un patojenitesini artırmakta, böylelikle bu patojenin ortama adaptasyonunu ve uzun süre kolonize kalmasını sağlamaktadır (Lowy, 2011).

*S. aureus* kalıcılığı, oksotroflar içindeki fenotipik farklılaşmalardan kaynaklanmaktadır. Bu değişen bakteriler besiyerindeki görünümünden dolayı küçük koloni varyantları (SCV) olarak isimlendirilmektedir.

Birçok kronik enfeksiyonda *S. aureus* ve diğer patojenlerin küçük koloni varyantlarının (SCVs) sıklıkla gözlemlendiği ve bunların mikroorganizmaların konak ortamına uzun süreli adaptasyonunu yansıttığı düşünülmektedir. SCV gelişimi, *S. aureus*'da pigmentasyon kaybı, hemolizin ekspresyonunun azalması ve yavaş çoğalma gibi negatif görünen etkiler yaratmasına karşın, aminoglikozidlere karşı duyarlılık azalması ve fagositoza direnç ile bu patojenin kalıcılığının artmasına neden olmaktadır. SCV'da metabolizma genlerindeki birçok mutasyon nedeniyle, elektron transportunda yetersizlik, ayrıca hemin için oksotrofik forma geçiş görülmektedir (Proctor ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda, *S.aureus* ile *P.aeruginosa*'nın birlikte aynı kültür ortamında üretilmesi ve tobramisine maruziyeti sonrasında benzer SCV'ların geliştiği gösterilmiştir (Hoffman ve ark., 2006; Biswas ve ark., 2009).

#### **2.2.3.3. Biyofilm üretimi**

Biyofilm oluşturan bakterilerin immün yanıtı kaçırdıkları ve antibiyotik etkisinden korundukları, bu sayede, kronik enfeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. Biyofilm oluşumu cihazla ilişkili hastane enfeksiyonlarının yanı sıra KF hastalarındaki akciğer enfeksiyonlarında da saptanmaktadır. Stafilokoklar, biyofilm üreterek cihazla ilişkili enfeksiyonlara neden olan prototip bakteriler arasında yer alır. Aynı durum, KF'da akciğer enfeksiyonları için de geçerlidir. (Goerke ve Wolz, 2010). Bakteriler biyofilm üretimini, çevresel stres ve antimikrobiyal varlığı gibi zorlu ortam şartlarında gerçekleştirirler. Ayrıca "quorum sensing" (QS) olarak adlandırılan iletişim sistemi ile biyofilm üretimi de desteklenmektedir. KF'da sıkça görülen polimikrobiyal enfeksiyonlarda, QS aracılı biyofilm üretimi, özellikle *S. aureus* ve *P. aeruginosa* ile yapılan *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir. *S.aureus*, *sarA*, *agrB* ve *icaR* gibi genleri aracılığıyla biyofilm üretimini düzenleyerek, diğer bakterilerin varlığında ve stres ortamında hayatta kalmayı sağlamaktadır. Bu kabiliyeti ile konak içerisinde sürekliliğini koruyarak, kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Orazi ve O'Toole, 2017; Woods ve ark., 2018).

## 2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.3.1. Karakteristik özellikleri

*Pseudomonas aeruginosa*, hareketli, nonfermentatif, çomak şeklinde gram negatif bir bakteridir. Glikozu oksidasyon yolu ile parçalar ve katalaz pozitifdir. Kültür ortamında 25°C ile 37°C aralığında iyi üreyebilmesinin yanında, 42°C'de de üreyebilme özelliği ile diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt edilmektedir. *Pseudomonas* cinsindeki birçok tür, bir veya birden fazla pigment molekülü üretmektedir. Bu pigmentlerden en sık rastlananları, piyosyanin (mavi-yeşil), piyoverdin (sarı-yeşil) ve piyorubindir (kırmızı-kahverengi) (Wu ve ark., 2015). Bakteri aerobik koşulların yanı sıra, terminal elektron alıcı olarak nitratı (NO<sub>3</sub>) kullanabilme özelliği ile anaerobik ortamda da üreyebilmektedir (Toyofuku ve Yoon, 2018).

*P.aeruginosa* çevresel koşullara dayanıklı olması dolayısıyla, doğada toprak ve suda yaygın bulunur. İnsanlar için fırsatçı bir patojendir. Özellikle son yıllarda, çoklu ilaç direnci gösteren suşların artışı ile dikkatleri üzerine çeken en önemli hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni patojenlerden birisidir. Başta bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ve kanser hastaları olmak üzere, yanıklarda ve KF hastalarında fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.

### 2.3.2. *P. aeruginosa*'nın KF'deki yeri

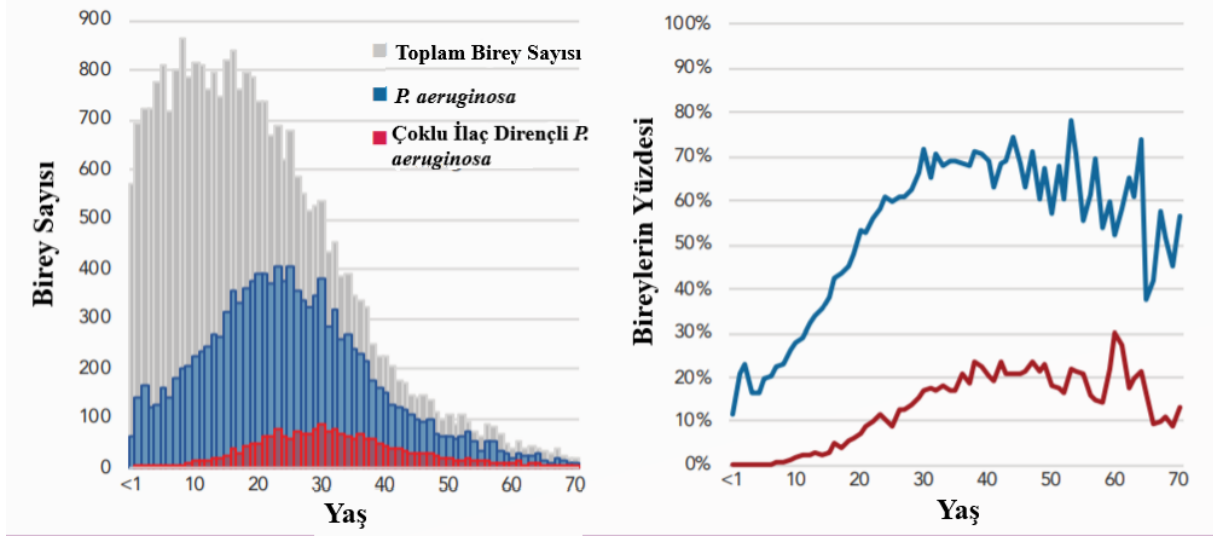
KF hastalarında solunum sisteminin *P. aeruginosa* ile kolonizasyonu, bu hastaların mortalite ve morbiditesinde oldukça önem taşımaktadır. Bu hastaların yaşadıkları birçok solunum probleminin yanı sıra, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik akciğer enfeksiyonu en önemli klinik sorunlardan birisidir (Bhagirath ve ark., 1996). Genellikle KF hastalarında *P. aeruginosa*'nın etken olduğu kronik akciğer enfeksiyonları, bu türün çevresel suşları ile aralıklı kolonizasyon sonrasında başlamaktadır. KF'da *P. aeruginosa* enfeksiyonu gelişimi *P. aeruginosa*'nın önemli virülans faktörlerinden elastaz, lipopolisakkarid (LPS), rhamnolipidler ve aljinatın üretimi ve biyofilm oluşturma kapasitesi ile ilişkilidir. Buna bağlı olarak, biyofilm oluşturduktan sonra KF hastalarında kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonunun ortadan kaldırılması oldukça zorlaşır (Høiby ve ark., 2005; Bjarnsholt ve ark., 2010).

*P. aeruginosa*, KF’da mukoid ve mukoid olmayan olarak iki farklı fenotipte izole edilmektedir. Başlangıç kolonizasyonunda daha çok mukoid olmayan suşlar görülürken, kalıcı kolonizasyonda mukoid suşlar rol almaktadır. Mukoid fenotip, yüksek miktarda aljinat üretiminin arttısına bağlı olarak biyofilm oluşturduğu ve antibiyotik ile eradikasyonun zorlaştığı kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır (O’sullivan ve Freedman, 2009). *P. aeruginosa*’nın ürettiği çok sayıdaki virülans faktörü, “quorum sensing” (QS) olarak adlandırılan, bakteriler arası iletişimi ve bakteri hücre yoğunluğunun izlenmesini sağlayan bir mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. *P. aeruginosa*’da tanımlanmış, las ve rhl olmak üzere iki QS sistemi bulunmaktadır (Karatuna ve Yağcı, 2008). KF’da değişken prognoz, farklı türlerin sık sık ve birlikte kolonizasyonu, antimikrobiyal terapi gibi faktörlerin sonucunda devamlı değişmekte olan akciğer ve solunum yolu ortamı özellikle bu bakteride bu mekanizmanın önemini ön plana çıkartmaktadır.

KF’da solunum sisteminin özellikleri tek veya çoklu patojenlerin kolonizasyonuna zemin hazırlamaktadır. Bu durum, hastaların zaman içerisinde birçok farklı sınıftan antibiyotik kullanmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak da, özellikle kronik enfeksiyonlardan sorumlu bakterilerde kazanılmış antibiyotik direnci sık görülmektedir. Özellikle gram negatif bakterilerde bu durum sıkça saptanmakla birlikte çoklu ilaç dirençli suşlar da görülmektedir.

KF hastalarında yıllar içerisinde *P. aeruginosa*’ya bağlı gelişen enfeksiyonlarda belirgin bir azalma görülmüştür. 1997 yılında % 47 olan *P. aeruginosa* oranı, 2017’de % 27,5’e kadar gerilemiştir. Buna karşın çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* (MDR-PA) enfeksiyonlarının 18 yaş üstü bireylerde artışı dikkat çekmektedir. Bu durumun antibiyotiklere kümülatif maruziyetten kaynaklandığı düşünülmektedir. Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu’nun yayınladığı 2017 raporunda, KF hastalarının en az bir kültüründe *P. aeruginosa* pozitif olarak bulunmuş kişilerin % 8.2’sinde MDR-PA pozitifliği, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların ise % 17.9’unda MDR-PA pozitifliği bildirilmiştir (Şekil 5) (<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>, Erişim tarihi, 15 Mayıs 2019).

### 2017 Yılındaki *P.aeruginosa* ve Çoklu İlaç Dirençli *P. aeruginosa* Dağılımı



Annual Data Report 2017 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry

**Şekil 5** 2017 yılında Kistik Fibroz Kayıtlı Hasta Topluluğu'na bildirilen KF hastalarından izole edilmiş *P. aeruginosa* ve MDR-PA suşlarının hasta yaşlarına göre dağılımı

#### 2.3.3. *P. aeruginosa*'nın KF'deki Virülansı

##### 2.3.3.1. Bağlanma ve hareket

*P. aeruginosa* sahip olduğu flajel ve pili (tip IV) yapıları ile hem hareket hem de konak hücre yüzeyine tutunmayı gerçekleştirmektedir. Bakteri bu yapılar ile solunum yolundaki epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan musin ve glikolipid asiola-gangliozid ( $a_{GM1}$ ) reseptörlerine bağlanır ve sonrasında konak hücrede interlökin aktivasyonu başlar. KF hastalarında saptanan bazı mukoid *P. aeruginosa* suşlarında flajel bulunmamaktadır. Böylelikle interlökin aktivasyonunun oluşmadığı ve nötrofil göçünün görülmemesine bağlı olarak *P. aeruginosa* 'nın kolayca kolonize olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte genetik defekti olan solunum yolu epitel hücrelerinde  $a_{GM1}$  reseptörü yüksek oranda üretilmektedir. *P. aeruginosa* da pilileri ile bu yapılara bağlanarak kolonizasyon oluşmakta ve sonrasında diğer patojenik mekanizmaların devreye girmesi sağlanmaktadır (Lau ve ark., 2005; Alhazmi, 2015).

### 2.3.3.2. Aljinat salgılanması, “quorum sensing” ve biyofilm üretimi

Bazı *P. aeruginosa* izolatları kültürde mukoid yapıda görülmektedir. Bu fenotipik özellik, bakterinin yüksek miktarda polisakkarid yapılı aljinat üretiminden kaynaklanmaktadır. Aljinat, *mucA* genindeki mutasyonların yanı sıra, *algT* etkisiyle *P. aeruginosa* tarafından salgılanmaktadır. Aljinat, makrofajlardan serbest radikallerin salınımının engellemesi, fiziksel bir bariyer oluşturarak fagositozun önlemesi, nötrofil kemotaksisi ve komplement aktivasyonun baskılaması ile bakterinin ortamdan eradike edilmesini önlemede birçok rol üstlenmektedir. Bunun dışında, solunum yolunda *P. aeruginosa*’nın biyofilm oluşturmaya da katkı sağlamaktadır (Driscoll ve ark., 2007).

KF solunum yolunda kolonize olan *P. aeruginosa*, biyofilm oluşturarak çoğalmaktadır. Biyofilm, hücre bölünmesi, farklılaşma ve ayrışmayı barındıran oldukça sistemli bir yapıya dayalı, yüzeye bağlanarak çoğalma şekli içermektedir. Bu yapının oluşabilmesi için, flajel, tip IV pili ve diğer gen ürünlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *P. aeruginosa*’da iki farklı biyofilm oluşumu gözlenmektedir. İlki KF’de başlangıç kolonizasyonunda veya KF dışı kolonizasyonlarda, diğeri ise KF kronik akciğer enfeksiyonlarında rol alır. Birinci biyofilm oluşumunda *P. aeruginosa*, pili veya flajeli ile epitel yüzeye tutunarak, bir dizi hücre bölünmesi ve biyosentez sonrası mikrokolonizasyon oluşturmaktadır. Daha sonra bu koloninin olgunlaşması ve çoğalması ile makrokoloni yani biyofilm tabakası oluşmaktadır. Diğer biyofilm oluşumunda ise, doğrudan epitel yüzeye bir bağlanma oluşmamaktadır. *P. aeruginosa* pili ve flajel yapılarını kaybeder, yoğun miktarda aljinat sentezler; sonuç olarak makrokoloniler yani biyofilm oluşturur. Bu biyofilm, KF solunum yolundaki kalın mukus tabaka içerisinde bulunması ile *P. aeruginosa*’yı daha dirençli bir patojene dönüştürerek kalıcı kolonizasyon ve kronik enfeksiyona sebep olur (Lauve ark., 2005).

“quorum sensing” (QS), difüze küçük kimyasal moleküllerin koordine ettiği ve hücre yoğunluğuna bağlı bakteriler arası iletişimin sağlandığı bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Bu kimyasal moleküller aynı zamanda açıl homoserin laktonlar olarak isimlendirilen otoindükleyiciler olarak da adlanmaktadır. *P. aeruginosa*’da QS *las* ve *rhl* genleri tarafından düzenlenmektedir.

Artmış bakteri yoğunluğunda bu kimyasal moleküller sentezlenerek hücre dışına difüze olur ve ortamda bulunan diğer bakterilerdeki transkripsiyonel aktivatörlere bağlanarak genlerin aktivasyon veya inhibisyonunu sağlamaktadırlar.

*P. aeruginosa* QS sisteminin 300'den fazla genin düzenlenmesinde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla bakteriyel enfeksiyonlarda özellikle polimikrobiyal enfeksiyonlarda QS önemli bir rol oynamaktadır. Biyofilm oluşumu, ekzoproteazlar, ekzotoksin A, rhamnolipidler, fanezinler ve hidrojen siyanür gibi bakteri virülans faktörlerinin düzenlenmesi bu mekanizma ile gerçekleşmektedir. Konak immün sisteminden kaçış, antimikrobiyal direnç ve konaktaki yayılım büyük ölçüde bu sistemin koordinatörlüğünde gerçekleşmektedir. Özellikle KF'da *P. aeruginosa*'nın QS sistemi, farklı evrelerdeki kolonizasyonda fenotipik değişimler ve buna bağlı virülans, diğer kolonize bakteriler ile ilişki, değişken biyofilm ve aljinat sentezi gibi faktörlerin düzenlenmesinde öne çıkan önemli bir etmen konumundadır (Lau ve ark., 2005; Kipnis ve ark., 2006; Bjarnsholt ve ark., 2010; Alhazmi, 2015).

#### **2.3.3.3. Tip III salgılama sistemi**

*P. aeruginosa*, konak hücre içerisine sitotoksik ajanları enjekte etmek için önemli virülans faktörlerinden birisi olan tip III salgılama sistemini kullanmaktadır. Bu sistem, pili aracılı epitel hücreye tutunma ile aktive olmaktadır. *P. aeruginosa* bağlanma ile aktive olan tip III salgılama sistemi aracılığıyla, sinyal transdüksiyon moleküllerini konak hücreye enjekte ederek, hücre membran yapısında bozulma, hücre ölümü veya konak immün cevabında değişiklik gibi hasarlara yol açmaktadır. KF'da *P. aeruginosa*'ya bağlı akut enfeksiyonlarda tip III salgılama sistemi, kronik enfeksiyonlara göre daha yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bunun kronik enfeksiyonlarda *P. aeruginosa*'nın virülans genlerinin bir dizi mutasyona bağlı ekspresyon değişiklikleri veya pili kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir. *P. aeruginosa*'nın tip III salgılama sistemi ile konak hücreye enjekte ettiği dört eksoenzim bulunmaktadır. Bunlar, ExoY, ExoS, ExoT ve ExoU olarak tanımlanmıştır (Sadikot ve ark., 2005).

#### 2.3.3.4. Piyosiyanin

Piyosiyanin, *P. aeruginosa* tarafından salgılanan ikincil metabolitlerden birisidir. Bu molekülün hem pozitif hem de negatif yüke sahip olması onu biyolojik membranlara tutunmasını kolaylaştırmaktadır.

KF'da *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlarda bu metabolitin sentezi QS tarafından düzenlenmekte ve yoğun olarak üretilmektedir. Piyosiyanin KF akciğerinde, *P. aeruginosa*'nın yayılımını artırdığı, konak hücrenin solunum ve siliyer fonksiyonunu inhibe ettiği, prostasiklin salınımı ve kalsiyum hemozozunu bozan etkileri olduğu bilinmektedir. Bunun dışında konak immün yanıtında da değişiklikler yapmaktadır. *P. aeruginosa*'nın KF solunum yolundaki kalın mukus tabakasında anaerobik olarak üreyebilmesi ve bu ortamda üreme özelliği gösteren *Staphylococcus* ve *Bacillus spp.* gibi diğer bakterilerin varlığı, *P. aeruginosa* için rekabet ortamı yaratmakta, bu rekabet ortamında piyosiyanin üretimi ile diğer bakterilerin çoğalmasını engellemektedir (Lau ve ark., 2004).

#### 2.3.3.5. Diğer salgılanan virülans faktörleri

*P. aeruginosa*'da demir ihtiyacı, üreme başta olmak üzere virülans faktörlerinin yapımı ve diğer metabolik mekanizmalar için büyük önem taşımaktadır. Bu yüzden demir ihtiyacını karşılamak için ana siderofor molekülü olarak piyoverdin üretilmektedir. Piyoverdin, *P. aeruginosa*'nın demir ihtiyacını karşılamadan yanısıra, ekzotoksin A, endoproteaz ve kendisi de olmak üzere çeşitli virülans faktörlerin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Meyer ve ark., 1996).

Ekzotoksin A, KF solunum yolunda *P. aeruginosa* tarafından yüksek oranda salgılandığı saptanmasına karşılık, KF'daki rolü şuana kadar tam aydınlatılamamıştır. Buna rağmen *P. aeruginosa*'nın önemli virülans faktörlerinden birisi olup, ADP-ribozil transferaz ailesinin bir üyesidir. Konak hücrede elongasyon faktör 2'yi (EF2) inhibe ederek, hücrenin protein sentezini engeller ve hücre ölümüne yol açar (Gallant ve ark., 2000).

*P. aeruginosa*'nın diğer virölans faktörlerinden alkali proteaz, elastaz ve proteaz IV'ün de KF solunum yolunda salgılandığı saptanmış, fakat fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Genel olarak bu sitotoksinler, konak immün yanıtı düzenleyen komplement, antikor, surfaktan proteinler ve antibakteriyel peptidleri degrade etmektedirler (Driscoll ve ark., 2007).

#### **2.4. KF'da *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın Birlikte Kolonizasyonu**

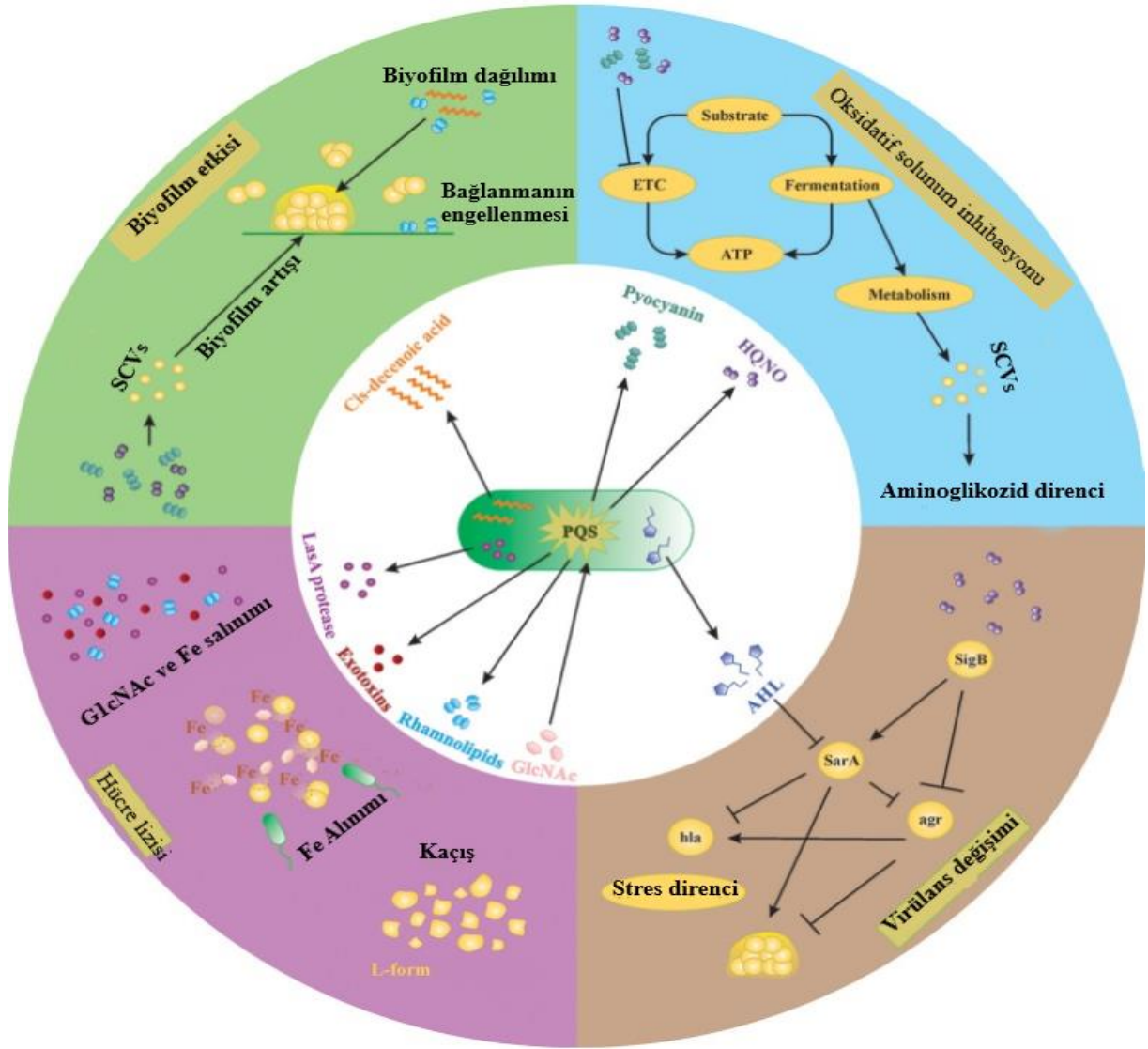
Polimikrobiyal enfeksiyonlar, KF'da gelişen enfeksiyonlar başta olmak üzere birçok enfeksiyonda yaygın olarak görülmektedir. KF'de en sık görülen polimikrobiyal enfeksiyon etkeni bakteriler, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'dır. Bu iki bakteri arasındaki sinerjistik ve antagonistik etkileşimler neden oldukları KF solunum yolu enfeksiyonunun prognozunu belirlemektedir.

*S. aureus*, KF hastalarının solunum yollarında ilk kolonize olan bakterilerden birisidir. *P. aeruginosa* ise adölesan çağ ve yetişkin bireylerde baskın olarak görülen patojendir. *S. aureus* KF'de solunum yolu enfeksiyonunun başlangıcında daha çok izole edilirken, *P. aeruginosa* daha çok kronik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Bu iki bakterinin KF solunum yolu örneklerinden birlikte sıkça izole edilmesi nedeniyle *S. aureus* ile ilk kolonizasyonun, *P. aeruginosa*'nın yerleşmesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Baldan ve ark., 2014).

*P. aeruginosa* kolonize olduğu KF solunum sistemindeki oksijen düzeyi, besin ve antibiyotik varlığı gibi değişen çevresel etkenlere göre ürettiği QS sinyal molekülleri ile aynı ortamda birlikte olduğu *S. aureus* üzerinde pozitif/negatif etkiler oluşturmaktadır. Örneğin, *P. aeruginosa* kaynaklı HQNO, *S. aureus*'un elektron taşıma sisteminde değişikliklere neden olarak bu patojeni anaerobik çoğalmaya zorlamaktadır. Bu durum, *S. aureus*'un üremesini baskılamakta, *in vitro* kültürde SCV fenotipi kazanmasına sebep olmaktadır. Sonuçta *S. aureus*'un KF solunum örneklerinden izolasyonu zorlaşmakta, aynı zamanda bakteri aminoglikozid gibi antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadır (Hoffman ve ark., 2006; Szamosvári ve Böttcher, 2017).

Demir iyonu bakteriler için elzem bir elementtir. Bakteriler demir ihtiyacını sideroforları aracılığı ile konaktan karşılar. KF’da solunum sisteminin yetersiz besin ortamı nedeniyle, *P. aeruginosa* birlikte kolonize olduğu *S. aureus* ile rekabet etmek zorunda kalmaktadır. *P. aeruginosa* sitotoksik enzimleri ile *S. aureus*’un hücre duvarını yıkarak, hem parçalanmış bakteriden salınan demiri kullanmakta hem de rekabeti azaltmaktadır (Nguyen ve Oglesby-Sherrouse, 2016).

*S. aureus*’un QS molekülü olan otoindükleyici-2 (AI-2) ve hücre duvar yapısında bulunan N-asetil glukozaminin (G1cNAc), *P. aeruginosa*’nın virülans faktörleri ve biyofilm üretiminin artmasını indüklediği gösterilmiştir. *S. aureus* ve *P. aeruginosa*’nın birlikte kolonize olduğu KF solunum yolunda yüksek oranda AI-2 ve G1cNAc bulunduğu saptanmıştır. Bu iki molekülün ortamdaki yoğunluğu *P. aeruginosa*’nın kinolon sinyal sistemini aktive ederek, piyosiyenin, ekstrasellüler proteaz ve rhamnolipid molekülleri gibi birçok toksinin üretimine yol açar. Buna bağlı olarak doku hasarı, epitelde siliaların kaybı, konak immün sisteminin baskılanması ve biyofilm üretimine bağlı başarısız antibiyotik yanıtı gibi sonuçlar ortaya çıkar. Tüm bu faktörler kötü prognoza sahip kronik enfeksiyon gelişimini desteklemektedir (Şekil 6) (Hotterbeekx ve ark., 2017).



Copyright © 2017 Hotterbeekx, Kumar-Singh, Goossens and Malhotra-Kumar.

**Şekil 6** *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın salgıladığı moleküller ve etkileşimleri. *P. aeruginosa*'nın salgıladığı ekzotoksinler, *S. aureus*'un biyofilm üretimi, oksidatif solunum, ve virülansını değiştirir ve bakterinin parçalanmasına yol açar. *S. aureus*'un lizisi ile ortaya çıkan GlcNAc, *P. aeruginosa* kinolon sinyalini aktifleştirerek virülans faktörlerinin ifadesini etkilemektedir (Hotterbeekx ve ark., 2017).

## 2.5. *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın Birlikte Neden Oldukları KF Enfeksiyonlarına Klinik Yaklaşım

KF'da genel tedavi yaklaşımı, semptomların hafifletilmesi ve organ fonksiyon bozukluklarının giderilmesine yöneliktir. Bu yaklaşım doğrultusunda, pankreatik enzim replasmanı, alt solunum yolu salgılarının temizlenmesi ve pulmoner enfeksiyon tedavisi semptomatik tedavi ve bozuklukların giderilmesinde temeldir (Ramsey, 1996).

KF'da gelişen MRSA ve *P. aeruginosa*'ya bağlı kronik polimikrobiyal solunum enfeksiyonları, akciğer fonksiyonlarının bozulmasına, alevlenme sonrası akciğer fonksiyonlarının düzelememesine ve mortalite artışlarına neden olmaktadır. İngiltere gibi bazı ülkelerde *S. aureus* saptanan erken yaştaki KF hastalarında profilaktik antibiyotik tedavisi ile *P. aeruginosa* kolonizasyonunun önlenmesini amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda MRSA eradikasyonu için linezolid ve vankomisin ilk tercih edilen antibiyotikler arasında yerini almaktadır. Ancak bu antibiyotiklerin uzun dönem kullanımına bağlı ya da altta yatan *P. aeruginosa* gibi ikinci bir patojenden kaynaklı bu ajanlara da sıklıkla direnç gelişmektedir. (Chmiel ve ark., 2014; Sherrard ve ark., 2014). *P. aeruginosa*'nın ilk kolonizasyonunda ise inhalasyon ile verilen tobramisin ön sırada tercih edilen antibiyotikler içindedir. Fırsatçı bir patojen olmasının yanında, hastane kaynaklı çoklu ilaç direnci gösteren *P. aeruginosa*'nın erken eradikasyonu, kronik enfeksiyon gelişiminin önüne geçilmesi için oldukça önemlidir. Ancak her iki patojenin birlikte kolonizasyonu, karşılıklı sinerjistik etkilerle biyofilm üretimini artırarak, tobramisine karşı direnç gelişmesini tetiklemektedir (Beaudoin ve ark., 2017).

Özellikle yetişkin KF hastalarındaki enfeksiyonlarda, birden fazla patojenin etken olması ve genelde bu patojenlerin uzun süreli antibiyotik kullanımı, aşırı biyofilm ve virülans faktörü üretimi, aerobik veya anaerobik çevresel değişimlere bağlı çoklu ilaç direnci göstermeleri tedavi başarısızlığına neden olmaktadır. Bu nedenle bu enfeksiyonlara yaklaşımda standart bir tedavi protolü izlenmemektedir (Magalhães ve ark., 2017).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Besiyerleri**

Mueller Hinton Sıvı Besiyeri (BioMerieux, Fransa)

Luria-Bertani Sıvı Besiyeri (BioMerieux, Fransa)

%5 Koyun Kanlı Agar (BioMerieux, Fransa)

MacConkey Agar (BioMerieux, Fransa)

##### **3.1.2. Kimyasal maddeler**

Vankomisin (Koçak, Türkiye)

Tobramisin (Nobel, Türkiye)

Linezolid (Haver, Türkiye)

Kristal Viyole (Sigma-Aldrich, Almanya)

Asetik asit %30 (Merck, ABD)

Ethanol %100 (Merck, ABD)

Gluteraldehit %2.5 (Sigma-Aldrich, Almanya)

Fosfat buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

### 3.1.3. Kullanılan cihazlar

MALDI TOF-MS İdentifikasyon Sistemi (BioMerieux, Fransa)

Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe, Türkiye)

Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)

Etüv (Memmert, Almanya)

Çalkalayıcı Etüv (Innova 40, New Brunswick, Kanada)

%5 CO<sub>2</sub>'li Etüv (Memmert, Almanya)

Otoklav (Nüve- OT 020, Türkiye)

Hassas Terazı (Sartorius, Almanya)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Distile Su Cihazı (NS 108, Nüve, Türkiye)

Mikroplate Okuyucu (Synergy H1, Biotek, Amerika)

Magna Lyser Cihazı (Roche, Almanya)

Su Banyosu Cihazı (Nüve, Türkiye)

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks Cihazı (IKA, Amerika)

Taramalı Elektron Mikroskopu (EVO MA10, Zeiss , Almanya)

Hücre Dansitometre Cihazı (BioMerieux, Fransa)

0.22 µm disposable filtre (Hawach, Çin)

### 3.2. Bakteri İzolatlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2015-2017 yıllarında, KF hastalarının rutin mikrobiyoloji tetkikleri için laboratuvara gönderilen, balgam örneklerinde polimikrobiyal olarak üretilmiş 9 *P. aeruginosa* ve 9 metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatı kullanıldı. Belirlenen kökenler hastanemiz stok kolleksiyonundan çıkarılarak, tür düzeyinde doğrulama yapıldı ve proje çalışmasında kullanılıncaya kadar skim-milk besiyerinde -80 °C'de saklandı.

Bu klinik patojenlerin dışında, standart bakteri kökenlerinin de birbirleri üzerindeki ve çalışmaya alınan klinik patojenler üzerindeki etkilerini görebilmek için, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve MRSA ATCC 43300 kökenleri bu çalışmaya dahil edildi.

### 3.3. Bakterilerin İdentifikasyonu

Dondurucuda -80°C'de saklanan örnekler çıkarıldı ve *P.aeruginosa* suşları MacConkey agara, MRSA suşları da %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak, 37°C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İşlem iki kez tekrarlandı.

İnkübasyon sonrası elde edilen koloniler, MALDI-TOF MS İdentifikasyon Sistemi (BioMerieux, Fransa) cihazında işleme alınarak, tür bazında tanımlamaları tekrarlandı ve doğrulandı. Bu işlem için kısaca, koloniden alınan örnek cihaza ait metal plak üzerine yayılıp, üzerine matriks solüsyonu eklenerek havada kurutuldu. Cihaza yüklenen örnekler, lazer vuruşlarıyla proteinlerine parçalanarak oluşan pikler, cihaz veri tabanında yer alan data ile karşılaştırılarak sonuçlar elde edildi. *S.aureus* izolatlarında metisilin direnci, sefoksitin disk difüzyon testi ile belirlenerek, bu izolatların MRSA olduğu da doğrulandı.

### 3.4. Klinik İzolatlardan Çeşitli Hücre Fraksiyonlarının Hazırlanması

Proje dahilindeki tüm bakteri izolatları ve standart suşların her birinin agar besiyerlerinden alınan tek kolonisi, Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri içerisine inoküle edildi ve 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde 14 saat 220 rpm’de üremeye kaldırıldı. Ertesi gün tüpler 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldıktan sonra, pellet üç kez steril PBS ile yıkandı. Daha sonra örneklerden hücre dansitometre cihazı (Biomerieux, Fransa) kullanılarak 0.5 McFarland (yaklaşık  $1 \times 10^8$  cfu/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Her bir süspansiyon 1/100 oranında LB sıvı besiyeri içeren dört tüpe inoküle edilerek %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatöre kaldırıldı.

Birinci tüp, 8 saat inkübasyon sonrası 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı toplandı. Süpernatant 0.22 µm tek kullanımlık filtreden geçirilerek, steril falkon tüpe aktarıldı. Elde edilen ürün 8s süpernatant (8s SN) olarak etiketlendi.

İkinci tüp, 24 saat inkübasyon sonrası 10.000 rpm de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı ayrıştırıldı. Süpernatant 0.22 µm tek kullanımlık filtreden geçirilerek, steril falkon tüpe aktarıldı. Elde edilen ürün 24s süpernatant (24s SN) olarak etiketlendi.

Üçüncü tüp, 18 saat inkübasyon sonrası 10.000 rpm de 15 dakika santrifüjlenerek bakteriler ayrıştırıldı. Bakteriler boncuklu tüplere alınarak Magna Lyser (Roche, Almanya) cihazında 99 saniye 7000 rpm’de mekanik lizise uğratıldı. Ürün steril falkon tüp içerisine aktarıldı ve bakteri lizatı olarak etiketlendi. Lizis kontrol işlemi için üründen alınan örnek, kanlı agar besiyerine ekim yapılarak sterilite ve lizis doğrulandı.

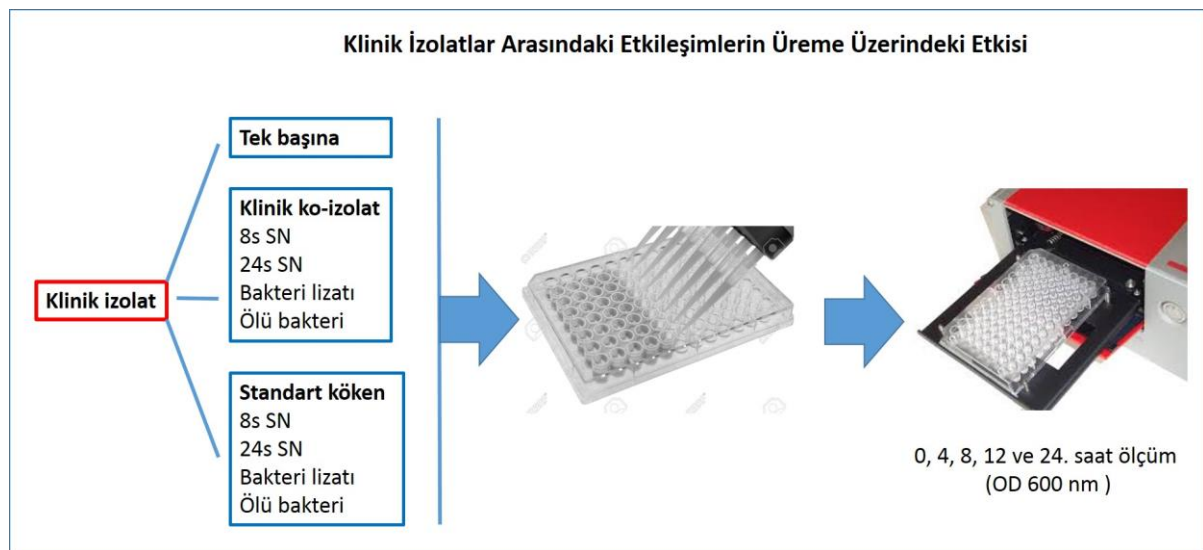
Dördüncü tüp, 18 saat inkübasyon sonrası 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek bakteriler ayrıştırıldı. Elde edilen bakteri hücreleri 60 °C su banyosunda 30 dakika bekletilerek hücreler öldürüldü. Ürün steril falkon tüp içerisine aktarıldı ve ölü bakteri olarak etiketlendi. Kontrol için üründen alınan örnek, kanlı agar besiyerine ekim yapılarak sterilite doğrulandı.

Etiketlenen tüm ürünler çalışmaya kadar -20 °C’de saklandı.

### 3.5. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Üreme Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatları, tek başına, birlikte izole edilmiş klinik MRSA suşları ve MRSA ATCC 43300'den hazırlanmış 8s ve 24s kültür süpernatantları, bakteri lizatı ve ölü bakteri suspansiyonlarının herbiriyle ayrı ayrı olacak şekilde, LB sıvı besiyerinde 96 kuyucuklu mikropalaklar içerisinde inoküle edilerek (1:1, v/v) 37 °C 220 rpm çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. Bakteri üreme durumu, besiyerinin 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 600 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda absorbans ölçümü ile belirlendi. Yukarıda belirtilen işlemler, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kökeni için MRSA ATCC 43300'den hazırlanan ürünler kullanılarak da yapıldı.

Klinik MRSA izolatları, tek başına, birlikte izole edilmiş klinik *P.aeruginosa* suşları ve *P.aeruginosa* ATCC 27853'den hazırlanmış 8s ve 24s kültür süpernatantları, bakteri lizatı ve ölü bakteri suspansiyonlarının herbiriyle ayrı ayrı olacak şekilde, LB sıvı besiyerinde 96 kuyucuklu mikropalaklar içerisinde inoküle edilerek (1:1, v/v) 37 °C 220 rpm çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. Bakteri üreme durumu, besiyerinin 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde mikropalak okuyucuda 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile belirlendi. Yukarıda belirtilen işlemler, MRSA ATCC 43300 kökeni için *P.aeruginosa* ATCC 27853'den hazırlanan ürünler kullanılarak da yapıldı.

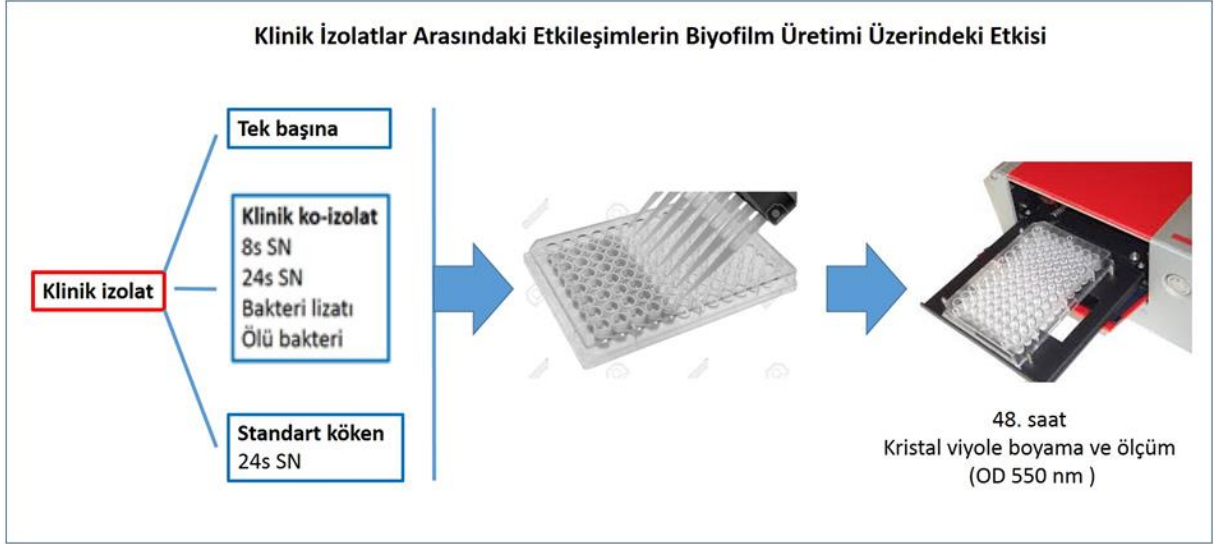


**Şekil 7** Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin üreme üzerindeki etkisi

### 3.6. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Klinik *P.aeruginosa* izolatları, tek başına, birlikte izole edilmiş klinik MRSA suşları ve MRSA ATCC 43300'den hazırlanmış 8s ve 24s kültür süpernatantları, bakteri lizatı ve ölü bakteri suspansiyonların herbiriyle ayrı ayrı olacak şekilde, LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edilerek (1:1, v/v) 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolaklarda 37 °C 220 rpm çalkalayıcı etüvde 48 saat inkubasyona bırakılarak biyofilm üretimine teşvik edildi. Üretilen biyofilm miktarını belirlemek için kristal viyole (Sigma-Aldrich, Almanya) boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama sonrasında mikrolak okuyucuda 550 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile biyofilm miktarı saptandı. Yukarıda belirtilen işlemler, *P. aeruginosa* ATCC 27853 kökeni için MRSA ATCC 43300'den hazırlanan ürünler kullanılarak da yapıldı.

Klinik MRSA izolatları, tek başına, birlikte izole edilmiş klinik *P.aeruginosa* suşları ve *P. aeruginosa* ATCC 27853'den hazırlanmış 8s ve 24s kültür süpernatantları, bakteri lizatı ve ölü bakteri suspansiyonların herbiriyle ayrı ayrı olacak şekilde, LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edilerek (1:1, v/v) 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolaklarda 37 °C'de 220 rpm çalkalayıcı etüvde 48 saat inkübasyona bırakılarak biyofilm üretimine teşvik edildi. Üretilen biyofilm miktarını belirlemek için kristal viyole (Sigma-Aldrich, Almanya) boyama işlemi (bkz. 3.6.1) gerçekleştirildi (O'Toole, 2011). Boyama sonrasında mikrolak okuyucuda 550 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile biyofilm miktarı saptandı. Yukarıda belirtilen işlemler, MRSA ATCC 43300 kökeni için *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'den hazırlanan ürünler kullanılarak da yapıldı.



**Şekil 8** Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin biyofilm üretimi üzerindeki etkisi

### 3.6.1. Biyofilm tespiti için kristal viyole boyama yöntemi

Kırksekiz saat inkübasyon sonrası mikropalaklar nazikçe sallanarak içindeki sıvı tamamen boşaltıldı. Mikropalaklar distile suya bir iki kez daldırılarak yıkama yapıldı. Böylelikle içindeki partükül ve tutunamayan hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra mikropalaka kuyucukları içerisine, 125  $\mu$ L %0.1 kristal viyole eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası mikropalaklar tekrar distile suya daldırılarak yıkandıktan sonra kağıt havlu üzerinde kuruması sağlandı. Kuruyan mikropalaklardaki her bir kuyucuğa 125  $\mu$ L %30'luk asetik asit (Merck, Almanya) eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuktan 125  $\mu$ L alınarak yeni bir 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı. Mikropalak okuyucuda (Synergy H1, Biotek, Amerika) 550 nm dalga boyunda okutuldu. Çalışmada kör olarak %30'luk asetik asit kullanıldı.

### 3.7. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Biyofilm Üretimi Üzerindeki Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Araştırılması

Klinik *P.aeruginosa* ve MRSA izolatlarının biyofilm çalışmalarında elde edilen sonuçları dikkate alınarak, 8s ve 24s süpernatantlarının varlığında en yüksek oranda biyofilm üreten ikişer köken belirlenerek çalışmaya dahil edildi. Kökenler bir gün önce uygun agar besiyerlerine ekildi.

Kolonilerden alınarak LB sıvı besiyeri içerisinde hücre dansitometre cihazında  $0.5 \times 10^8$  cfu/mL MacFarland bakteri süspansiyonları ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) hazırlandı. Süspansiyonlar LB sıvı besiyeri içerisinde 1/100 oranında sulandırıldı. Çalışmaya alınan kökenlerle birlikte izole edilen bakterilere ait 8s ve 24s süpernatantları  $-20^\circ\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözüldü. Seçilen örnekler tek başına ve birlikte izole edilen izolatın 8s ve 24s süpernatantı ile birlikte 6 kuyucuklu mikropak içerisine 1:1, v/v oranında karıştırıldı. Elektron mikroskopunda inceleme için her bir kuyucuğa steril lamel yerleştirildi. Mikropak %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası lameller penset ile kuyucuklardan alınarak, yeni bir steril 6 kuyucuklu mikropak içerisine aktarıldı. İlk basamakta PBS ile yıkanarak ölü ve tutunamayan hücreler uzaklaştırıldı. Tespit işlemi için her bir kuyucuğa 1.5 mL %2.5 gluteraldehit eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sırasıyla %30-%50-%70-%90 etanol serilerinde oda ısısında 3'er dakika bekletildi. Son aşamada lameller oda ısısında 24 saat kurumaya bırakıldı. Tüm bu işlemlerin ardından, bakterilerin morfolojik yapısının görüntülenmesi için Marmara Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği bünyesinde bulunan taramalı elektron mikroskopunda incelenerek, fotoğraflandı ve analiz edildi.

### **3.8. Klinik İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının (MİK Saptama) Belirlenmesi**

*P. aeruginosa* suşlarının tobramisin duyarlılığı, MRSA suşlarında ise linezolid ve vankomisin duyarlılığı, EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerileri doğrultusunda, standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerleri belirlenerek saptandı. Kontrol suşları olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Tüm MİK çalışmaları iki tekrarlı yapıldı.

#### **3.8.1. *P.aeruginosa* izolatlarının tobramisin MİK düzeyinin belirlenmesi**

*P.aeruginosa* izolatları çalışmadan bir gün önce MacConkey agar besiyerine ekildi ve 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Çalışma öncesi katyonu ayarlanmış Müller Hinton sıvı besiyeri (MHB) hazırlandı ve otoklavlandı. Kullanılacak olan antimikrobiyal ajan, tobramisin (potensi 964  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 10 mg olarak tartıldı.

Tobramisin stok derişimi 5120 µg/mL olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Çalışmada tobramisin konsantrasyonu 256 – 0,125 µg/mL aralığında olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolaklara 100 µL dağıtıldı.

*P.aeruginosa* izolatlarının agar üzerinde tek düşen kolonilerinden alınan örneklerden hücre dansitometre cihazında (BioMerieux, Fransa) 0.5 McFarland bulanıklığında ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar 1/100 oranında steril besiyeri ile sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µL dağıtıldı. Böylelikle mikrolaklardaki son tobramisin konsantrasyonu 128-0,064 µg/mL aralığında, bakteri konsantrasyonu ise  $5 \times 10^5$  cfu/mL oldu. Tüm mikrolaklar 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Değerlendirmeler EUCAST önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Çalışmada besiyeri sterilite ve bakteri üreme kontrolleri de yapıldı.

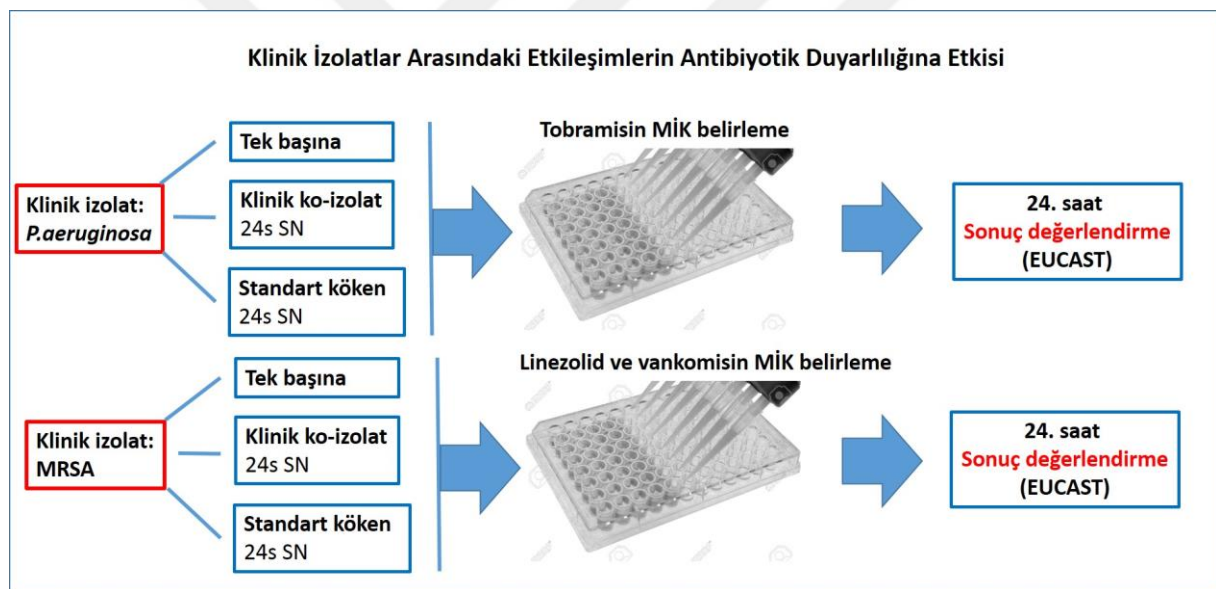
### **3.8.2. MRSA izolatlarının linezolid ve vankomisin MİK düzeyinin belirlenmesi**

MRSA izolatları çalışmadan bir gün önce %5 koyun kanlı agar besiyerine ekildi ve 24 saat 37 °C de inkübe edildi. Çalışma öncesi taze MHB hazırlandı ve otoklavlandı. Kullanılacak olan antimikrobiyal ajanlar, linezolid (potensi 978 µg/mg) ve vankomisin (potensi 960 µg/mg) 16 mg tartılarak, başlangıç konsantrasyonundan 10 kat fazla olacak şekilde stok derişimleri hazırlandı. Çalışmada her iki ajanın konsantrasyonu 256 – 0,125 µg/mL aralığında olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolaklara 100 µL dağıtıldı. MRSA izolatlarından hücre dansitometre cihazında (BioMerieux, Fransa) 0.5 McFarland bulanıklığında ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar 1/100 oranında steril besiyeri ile sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µL dağıtıldı. Böylelikle mikrolaklarda linezolid ve vankomisin son konsantrasyonu 128-0,064 µg/mL aralığında, bakteri konsantrasyonu ise  $5 \times 10^5$  cfu/mL oldu. Tüm mikrolaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Değerlendirmeler EUCAST önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Çalışmada besiyeri sterilit ve bakteri üreme kontrolleri de yapıldı.

### 3.9. Klinik İzolatlar Arasındaki Etkileşimlerin Antibiyotik Duyarlılığına Etkisinin Araştırılması

Projede balgam örneklerinden birlikte izole edilen izolatların arasındaki etkileşimlerin MİK değerleri üzerindeki etkilerini belirlemede, birlikte izole edilen suşun 24s süpernatantı kullanıldı. Ayrıca klinik kökenler üzerinde standart kökenin etkisini belirlemek için *P.aeruginosa* ATCC 27853 24s süpernatantı ile MRSA ATCC 43300 24s süpernatantı da çalışmaya dahil edildi.

Çalışmalarda kontrol kökeni olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Tüm çalışma iki tekrarlı olarak yapıldı. Çalışmada sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Değerlendirme EUCAST kriterlerine göre yapıldı.



Şekil 9 Klinik izolatlar arasındaki etkileşimlerin antibiyotik duyarlılığına etkisi

#### 3.9.1. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında MİK değişiminin araştırılması

İzolatlar MacConkey besiyerinde üretildi. Hazırlanan tobramisin stok çözeltisi (5120 µg/mL) ile birlikte izole edilen klinik MRSA ve MRSA ATCC 43300 24s süpernatantları - 20°C'den çıkarılarak oda ısısında çözüldü. Her bir klinik izolat için birlikte izole edilen suşun ve MRSA ATCC 43300 kökeninin süpernatantlarından 50 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropakların ilgili kuyucuklarına pipetlendi.

Tobramisin stok çözeltisi seri dilüsyon yöntemi ile steril MHB besiyeri içerisinde sulandırılarak 512-0.256 µg/mL konsantrasyonları elde edildi. Her bir konsantrasyondan 50 µL alınarak tüm kuyucuklara eklendi. Son konsantrasyon 256-0.125 µg/mL indirildi. MacConkey besiyerinde üremiş olan *P.aeruginosa* izolatlarından hücre dansitometre cihazında (BioMerieux, Fransa) 0.5 McFarland bulanıklığında ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar 1/100 oranında steril besiyeri ile sulandırılarak  $1 \times 10^6$  cfu/mL süspansiyon elde edildi ve tüm kuyucuklara 100 µL dağıtıldı. Böylece tobramisin son konsantrasyonu 128-0,064 µg/mL aralığında ve bakteri konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  cfu/mL olarak elde edildi. Çalışmada besiyeri sterilite ve bakteri üreme kontrolleri de yapıldı.

### 3.9.2. Klinik MRSA izolatlarında MİK değişiminin araştırılması

İzolatların %5 koyun kanlı agar besiyerinde üretildi. Hazırlanan vankomisin ve linezolid stok çözeltileri (5120 µg/mL) ile birlikte izole edilen klinik *P.aeruginosa* ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 24s süpernatantları -20 °C'den çıkarılarak oda ısısında çözüldü. Her bir klinik izolat için birlikte izole edilen süşun ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 kökeninin süpernatantlarından 50 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropiplerle ilgili kuyucuklarına pipetlendi. Linezolid ve vankomisin stok çözeltisi seri dilüsyon yöntemi ile steril MHB besiyeri içerisinde sulandırılarak 512-0.256 µg/mL konsantrasyonları elde edildi. Her bir konsantrasyondan 50 µL alınarak tüm kuyucuklara eklendi. Böylece antibiyotiklerin son konsantrasyonu 256-0.125 aralığına indirildi. %5 koyun kanlı agar besiyerinde üremiş olan MRSA izolatlarından hücre dansitometre cihazında (BioMerieux, Fransa) 0.5 McFarland bulanıklığında ( $1 \times 10^8$  cfu/mL) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar 1/100 oranında steril besiyeri ile sulandırılarak  $1 \times 10^6$  cfu/mL süspansiyon elde edildi ve tüm kuyucuklara 100 µL dağıtıldı. Böylece linezolid ve vankomisin son konsantrasyonu 128-0,064 µg/mL aralığında ve bakteri konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  cfu/mL olarak elde edildi. Çalışmada besiyeri sterilite ve bakteri üreme kontrolleri yapıldı.

### 3.10. İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenlerin ilişkilendirilmesinde ki-kare analizi kullanılmıştır. Veriler Microsoft Excel 2013 programı (Microsoft, Redmond, WA) ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik İzolatların Üreme Değerleri

Çalışmaya alınan dokuz çift klinik *P.aeruginosa* ve *S.aureus* kökeninin, 37°C’de inkübasyon sürecinde, 0, 4, 8, 12, ve 24. saatlerindeki üremelerine ait spektrofotometrik ölçüm (OD 600 nm) ile elde edilen değerler Tablo 1’de gösterilmiştir. Tüm izolatların logaritmik olarak üreme gösterdiği belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Klinik izolatların monokültürde üreme değerleri (OD 600 nm)

|                                                    | 0.SAAT | 4. SAAT | 8. SAAT | 12. SAAT | 24. SAAT |
|----------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |         |         |          |          |
| PSE 1094                                           | 0,004  | 0,003   | 0,0065  | 0,0795   | 0,954    |
| PSE 614                                            | 0,0025 | 0,0015  | 0,0025  | 0,063    | 0,724    |
| PSE 1368                                           | 0,0015 | 0,0005  | 0,0035  | 0,077    | 0,731    |
| PSE 809                                            | 0,002  | 0,001   | 0,008   | 0,31     | 0,62     |
| PSE 1556                                           | 0,004  | 0,0025  | 0,0095  | 0,1715   | 0,702    |
| PSE 1332                                           | 0,0015 | 0,0005  | 0,004   | 0,1385   | 0,977    |
| PSE 246                                            | 0,0025 | 0,0015  | 0,0045  | 0,0615   | 0,464    |
| PSE 571                                            | 0,004  | 0,0035  | 0,0065  | 0,2035   | 0,7885   |
| PSE 1082                                           | 0,002  | 0,0015  | 0,002   | 0,047    | 1,006    |
| *PSE ATCC 27853                                    | 0,0025 | 0,002   | 0,0075  | 0,2075   | 0,8905   |
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b>     |        |         |         |          |          |
| SA 1070                                            | 0,0065 | 0,029   | 0,313   | 0,7      | 1,1295   |
| SA 563                                             | 0,002  | 0,0595  | 0,334   | 0,5195   | 1,0385   |
| SA 1210                                            | 0,001  | 0,068   | 0,3115  | 0,4895   | 0,7525   |
| SA 775                                             | 0,002  | 0,0115  | 0,28    | 0,446    | 0,984    |
| SA 1314                                            | 0,005  | 0,0665  | 0,294   | 0,5605   | 0,733    |
| SA 1157                                            | 0,0025 | 0,002   | 0,012   | 0,1645   | 0,3535   |
| SA 254                                             | 0,002  | 0,0435  | 0,285   | 0,4075   | 0,6645   |
| SA 539                                             | 0,0005 | 0,003   | 0,153   | 0,393    | 0,856    |
| SA 995                                             | 0,001  | 0,0015  | 0,011   | 0,2105   | 0,4385   |
| #MRSA ATCC 43300                                   | 0,001  | 0,002   | 0,043   | 0,3025   | 0,648    |

\* PSE ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

# MRSA ATCC 43300: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Her iki grup klinik izolatin, birlikte izole edilen ve standart kökenden elde edilen 8s süpernatantla beraber inkübasyonu sürecinde, 0, 4, 8, 12, ve 24. saatlerindeki üremelere ait spektrofotometrik ölçüm (600 nm) ile elde edilen değerler Tablo 2’de gösterilmiştir. Çalışmada 8s süpernatantların bakteri üremesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, *P.aeruginosa* üremesini % 8.6 baskıladığı, *S.aureus* üremesini ise % 10.6 baskıladığı belirlenmiştir.

**Tablo 2** Klinik izolatların 8s süpernatantı (8s SN) varlığında üreme değerleri (OD 600 nm)

|                                                    | 0.SAAT | 4. SAAT | 8. SAAT | 12. SAAT | 24. SAAT |
|----------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |         |         |          |          |
| PSE 1094+SA 1070 SN                                | 0,001  | 0,0005  | 0,001   | 0,0595   | 0,867    |
| PSE 1094+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,0015 | 0,0005  | 0,003   | 0,128    | 0,8125   |
| PSE 614+SA 563 SN                                  | 0,0005 | 0,001   | 0,001   | 0,0575   | 0,7495   |
| PSE 614+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,0025 | 0,0015  | 0,0035  | 0,08     | 0,812    |
| PSE 1368+SA 1210 SN                                | 0,0005 | 0,0005  | 0,0015  | 0,083    | 0,5795   |
| PSE 1368+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,001  | 0,0005  | 0,0025  | 0,11     | 0,6345   |
| PSE 809+SA 775 SN                                  | 0,001  | 0,0015  | 0,002   | 0,1265   | 0,694    |
| PSE 809+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,001  | 0,0005  | 0,0045  | 0,199    | 0,703    |
| PSE 1556+SA 1314 SN                                | 0,001  | 0,0005  | 0,002   | 0,1805   | 0,773    |
| PSE 1556+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,001  | 0,001   | 0,004   | 0,17     | 0,621    |
| PSE 1332+SA 1157 SN                                | 0,001  | 0,001   | 0,001   | 0,078    | 0,9565   |
| PSE 1332+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,0015 | 0,0005  | 0,002   | 0,09     | 0,933    |
| PSE 246+SA 254 SN                                  | 0,001  | 0,001   | 0,0005  | 0,015    | 0,3645   |
| PSE 246+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,001  | 0,0005  | 0,001   | 0,0575   | 0,603    |
| PSE 571+SA 539 SN                                  | 0,001  | 0,001   | 0,001   | 0,0635   | 0,785    |
| PSE571+MRSA ATCC43300 SN                           | 0,002  | 0,0015  | 0,003   | 0,14     | 0,613    |
| PSE 1082+SA 995 SN                                 | 0,001  | 0,001   | 0,001   | 0,0115   | 0,902    |
| PSE 1082+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,002  | 0,0015  | 0,0015  | 0,017    | 0,9315   |
| PSE ATCC 27853 + MRSA ATCC 43300 SN                | 0,002  | 0,003   | 0,005   | 0,159    | 0,9075   |
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b>     |        |         |         |          |          |
| SA 1070+PSE 1094 SN                                | 0,001  | 0,007   | 0,215   | 0,6875   | 1,2125   |
| SA 1070+ PSE ATCC27853                             | 0,0005 | 0,0095  | 0,2165  | 0,426    | 1,1465   |
| SA 563+ PSE 614 SN                                 | 0,0005 | 0,027   | 0,312   | 0,4285   | 0,837    |
| SA 563+ PSE ATCC27853                              | 0,001  | 0,0255  | 0,303   | 0,4315   | 0,761    |
| SA 1210+ PSE 1368 SN                               | 0,0015 | 0,0335  | 0,263   | 0,5055   | 0,8535   |
| SA-1210+ PSE ATCC27853                             | 0,0005 | 0,032   | 0,2875  | 0,558    | 0,923    |
| SA-775+ PSE 809 SN                                 | 0,0005 | 0,003   | 0,189   | 0,377    | 1,111    |
| SA-775+ PSE ATCC27853                              | 0,001  | 0,004   | 0,2365  | 0,499    | 1,235    |
| SA 1314 +PSE 1556 SN                               | 0,0015 | 0,008   | 0,176   | 0,4155   | 0,649    |
| SA1314+ PSE ATCC27853                              | 0,002  | 0,02    | 0,237   | 0,481    | 0,6755   |
| SA 1157+ PSE 1332 SN                               | 0,0015 | 0,002   | 0,0045  | 0,1035   | 0,3745   |
| SA 1157+ PSE ATCC27853                             | 0,002  | 0,002   | 0,006   | 0,105    | 0,416    |
| SA 254+ PSE 246                                    | 0,0005 | 0,0145  | 0,248   | 0,4355   | 0,837    |
| SA 254+ PSE ATCC27853                              | 0,001  | 0,014   | 0,2495  | 0,42     | 0,7345   |
| SA 539+ PSE 571                                    | 0,0005 | 0,0005  | 0,011   | 0,295    | 0,9335   |
| SA 539+ PSE ATCC27853                              | 0,0005 | 0,0015  | 0,0995  | 0,522    | 0,989    |
| SA 995+ PSE 1082 SN                                | 0,002  | 0,002   | 0,005   | 0,131    | 0,4915   |
| SA 995+ PSE ATCC27853                              | 0,003  | 0,0025  | 0,006   | 0,187    | 0,6355   |
| MRSA ATCC 43300 + PSE ATCC 27853                   | 0,0015 | 0,002   | 0,0205  | 0,2325   | 0,7595   |

Her iki grup klinik izolatın, birlikte izole edilen ve standart kökenden elde edilen 24s süpernatantla beraber inkübasyonu sürecinde, 0, 4, 8, 12, ve 24. saatlerdeki üremelere ait spektrofotometrik ölçüm (600 nm) ile elde edilen değerler Tablo 3’de gösterilmiştir. 24s süpernatantların bakteri üremesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, kontrole göre *P.aeruginosa* üremesini %9.3, *S.aureus* üremesini %15.3 artırdığı bulunmuştur.

**Tablo 3** Klinik izolatların 24s süpernatantı (24s SN) varlığında üreme değerleri (OD 600 nm)

|                                                    | 0.SAAT | 4. SAAT | 8. SAAT | 12. SAAT | 24. SAAT |
|----------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |         |         |          |          |
| PSE 1094+SA 1070 SN                                | 0,0005 | 0,002   | 0,001   | 0,0525   | 1,093    |
| PSE 1094+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,001  | 0,0005  | 0,002   | 0,1205   | 0,8835   |
| PSE 614+SA 563 SN                                  | 0,0005 | 0,0005  | 0,001   | 0,049    | 0,7405   |
| PSE 614+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,002  | 0,0015  | 0,001   | 0,074    | 0,7495   |
| PSE 1368+SA 1210 SN                                | 0,0015 | 0,001   | 0,0035  | 0,0855   | 0,514    |
| PSE 1368+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,0015 | 0,0005  | 0,0025  | 0,099    | 0,6025   |
| PSE 809+SA 775 SN                                  | 0,001  | 0,0005  | 0,0025  | 0,174    | 0,7615   |
| PSE 809+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,0005 | 0,002   | 0,003   | 0,2155   | 0,6935   |
| PSE 1556+SA 1314 SN                                | 0,0005 | 0,002   | 0,0025  | 0,1355   | 0,7545   |
| PSE 1556+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,0015 | 0,0005  | 0,0025  | 0,1575   | 0,695    |
| PSE 1332+SA 1157 SN                                | 0,0005 | 0,0005  | 0,0005  | 0,081    | 1,022    |
| PSE 1332+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,001  | 0,002   | 0,0015  | 0,0885   | 0,9555   |
| PSE 246+SA 254 SN                                  | 0,0005 | 0,0005  | 0,002   | 0,014    | 0,517    |
| PSE 246+MRSA ATCC43300 SN                          | 0,0005 | 0,0005  | 0,0005  | 0,0295   | 0,741    |
| PSE 571+SA 539 SN                                  | 0,001  | 0,0005  | 0,0015  | 0,134    | 0,97     |
| PSE571+MRSA ATCC43300 SN                           | 0,001  | 0,0005  | 0,0015  | 0,146    | 0,808    |
| PSE 1082+SA 995 SN                                 | 0,0015 | 0,0015  | 0,0015  | 0,0165   | 1,0165   |
| PSE 1082+MRSA ATCC43300 SN                         | 0,001  | 0,001   | 0,001   | 0,0135   | 0,9885   |
| PSE ATCC 27853 + MRSA ATCC 43300 SN                | 0,001  | 0,001   | 0,002   | 0,169    | 0,88     |
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b>     |        |         |         |          |          |
| SA 1070+PSE 1094 SN                                | 0,004  | 0,0055  | 0,034   | 0,259    | 0,96     |
| SA 1070+ PSE ATCC27853                             | 0,002  | 0,0145  | 0,262   | 0,3905   | 1,1565   |
| SA 563+ PSE 614 SN                                 | 0,0145 | 0,024   | 0,1505  | 0,269    | 0,6595   |
| SA 563+ PSE ATCC27853                              | 0,002  | 0,036   | 0,306   | 0,448    | 1,001    |
| SA 1210+ PSE 1368 SN                               | 0,002  | 0,0145  | 0,2395  | 0,3995   | 0,8645   |
| SA-1210+ PSE ATCC27853                             | 0,002  | 0,05    | 0,3175  | 0,515    | 0,905    |
| SA-775+ PSE 809 SN                                 | 0,0135 | 0,018   | 0,022   | 0,0505   | 0,5905   |
| SA-775+ PSE ATCC27853                              | 0,0015 | 0,0075  | 0,26    | 0,473    | 1,2165   |
| SA 1314 +PSE 1556 SN                               | 0,0065 | 0,0095  | 0,0415  | 0,296    | 0,703    |
| SA1314+ PSE ATCC27853                              | 0,0025 | 0,026   | 0,248   | 0,4595   | 0,812    |
| SA 1157+ PSE 1332 SN                               | 0,0065 | 0,007   | 0,0075  | 0,0105   | 0,3      |
| SA 1157+ PSE ATCC27853                             | 0,003  | 0,003   | 0,0115  | 0,1905   | 0,552    |
| SA 254+ PSE 246                                    | 0,002  | 0,021   | 0,292   | 0,399    | 0,9165   |
| SA 254+ PSE ATCC27853                              | 0,0035 | 0,0235  | 0,3     | 0,391    | 0,922    |
| SA 539+ PSE 571                                    | 0,0045 | 0,0065  | 0,0065  | 0,0065   | 0,0065   |
| SA 539+ PSE ATCC27853                              | 0,0025 | 0,005   | 0,1325  | 0,366    | 1,1695   |
| SA 995+ PSE 1082 SN                                | 0,0055 | 0,0075  | 0,009   | 0,015    | 0,3435   |
| SA 995+ PSE ATCC27853                              | 0,0015 | 0,003   | 0,01    | 0,2055   | 0,656    |
| MRSA ATCC 43300 + PSE ATCC 27853                   | 0,002  | 0,003   | 0,0275  | 0,3      | 0,957    |

Her iki grup klinik izolatın, birlikte izole edilen ve standart kökenden elde edilen ölü bakteri fraksiyonu ile beraber inkübasyonu sürecinde, 0, 4, 8, 12, ve 24. saatlerdeki üremelere ait spektrofotometrik ölçüm (600 nm) ile elde edilen değerler Tablo 4’de gösterilmiştir. Kontrole göre, ölü bakterinin *P.aeruginosa* üremesini % 7.2, *S.aureus* üremesini ise % 30.3 baskıladığı gözlenmiştir.

Tablo 4 Klinik izolatların Ölü bakteri (ÖB) fraksiyonu varlığında üreme değerleri (OD 600 nm)

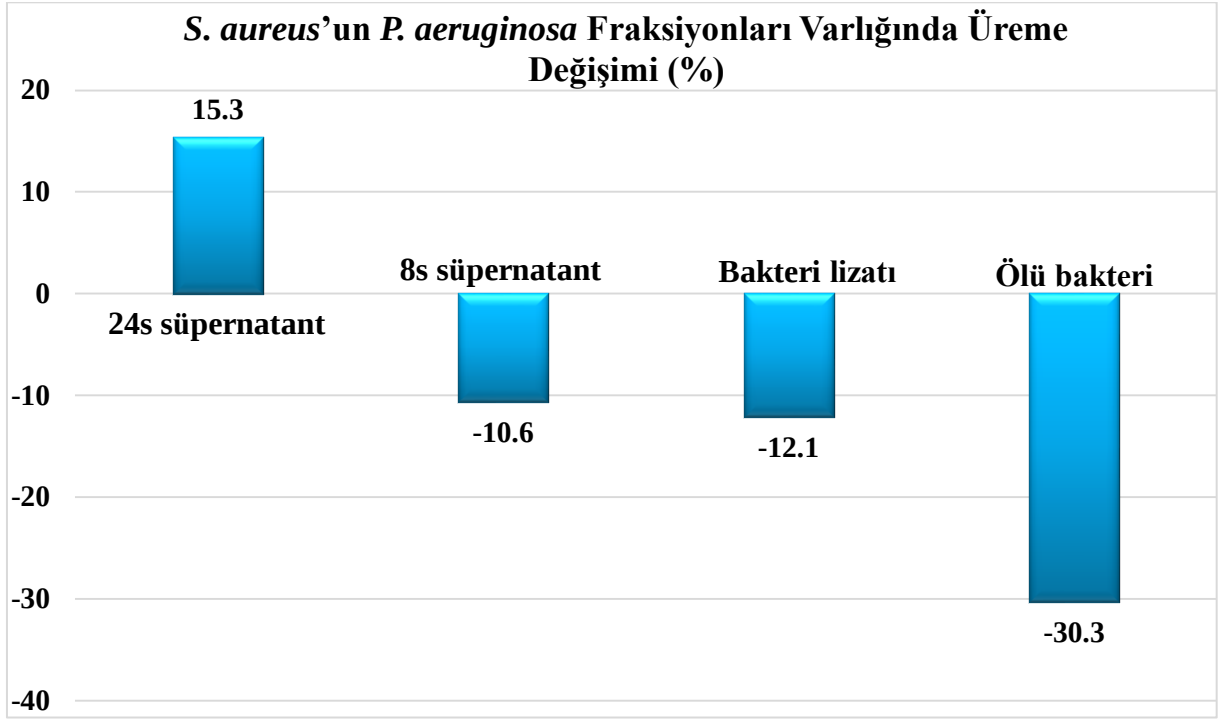
|                                                    | 0.SAAT | 4. SAAT | 8. SAAT | 12. SAAT | 24. SAAT |
|----------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |         |         |          |          |
| PSE 1094+SA 1070 ÖB                                | 0,0035 | 0,003   | 0,0045  | 0,058    | 0,9855   |
| PSE 1094+MRSA ATCC43300 ÖB                         | 0,002  | 0,001   | 0,0025  | 0,0975   | 0,8355   |
| PSE 614+SA 563 ÖB                                  | 0,0005 | 0,001   | 0,0005  | 0,0675   | 0,717    |
| PSE 614+MRSA ATCC43300 ÖB                          | 0,002  | 0,001   | 0,0015  | 0,061    | 0,811    |
| PSE 1368+SA 1210 ÖB                                | 0,001  | 0,001   | 0,002   | 0,075    | 0,543    |
| PSE 1368+MRSA ATCC43300 ÖB                         | 0,002  | 0,0015  | 0,0035  | 0,073    | 0,5105   |
| PSE 809+SA 775 ÖB                                  | 0,001  | 0,0005  | 0,009   | 0,1875   | 0,6495   |
| PSE 809+MRSA ATCC43300 ÖB                          | 0,004  | 0,003   | 0,007   | 0,1635   | 0,629    |
| PSE 1556+SA 1314 ÖB                                | 0,002  | 0,0015  | 0,0055  | 0,179    | 0,892    |
| PSE 1556+MRSA ATCC43300 ÖB                         | 0,001  | 0,0005  | 0,0035  | 0,1585   | 0,7115   |
| PSE 1332+SA 1157 ÖB                                | 0,0015 | 0,0005  | 0,0025  | 0,118    | 0,8875   |
| PSE 1332+MRSA ATCC43300 ÖB                         | 0,0015 | 0,0005  | 0,002   | 0,1105   | 0,9755   |
| PSE 246+SA 254 ÖB                                  | 0,001  | 0,0005  | 0,0015  | 0,052    | 0,4515   |
| PSE 246+MRSA ATCC43300 ÖB                          | 0,001  | 0,001   | 0,001   | 0,0495   | 0,4475   |
| PSE 571+SA 539 ÖB                                  | 0,002  | 0,002   | 0,0025  | 0,1355   | 0,893    |
| PSE571+MRSA ATCC43300 ÖB                           | 0,002  | 0,002   | 0,003   | 0,122    | 0,746    |
| PSE 1082+SA 995 ÖB                                 | 0,002  | 0,0015  | 0,0015  | 0,016    | 0,9085   |
| PSE 1082+MRSA ATCC43300 ÖB                         | 0,002  | 0,0015  | 0,0015  | 0,013    | 0,9495   |
| PSE ATCC 27853 + MRSA ATCC 43300 ÖB                | 0,0025 | 0,005   | 0,007   | 0,1585   | 0,971    |
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b>     |        |         |         |          |          |
| SA 1070+PSE 1094 ÖB                                | 0,002  | 0,013   | 0,2455  | 0,5445   | 1,0705   |
| SA 1070+ PSE ATCC27853                             | 0,002  | 0,011   | 0,2245  | 0,411    | 0,9295   |
| SA 563+ PSE 614 ÖB                                 | 0,0015 | 0,0245  | 0,277   | 0,4195   | 0,8025   |
| SA 563+ PSE ATCC27853                              | 0,0055 | 0,028   | 0,2785  | 0,418    | 0,849    |
| SA 1210+ PSE 1368 ÖB                               | 0,002  | 0,015   | 0,211   | 0,4245   | 0,77     |
| SA-1210+ PSE ATCC27853                             | 0,008  | 0,04    | 0,265   | 0,4535   | 0,692    |
| SA-775+ PSE 809 ÖB                                 | 0,001  | 0,0035  | 0,192   | 0,3715   | 0,783    |
| SA-775+ PSE ATCC27853                              | 0,0015 | 0,005   | 0,2475  | 0,427    | 0,886    |
| SA 1314 +PSE 1556 ÖB                               | 0,0025 | 0,021   | 0,248   | 0,5445   | 0,6985   |
| SA1314+ PSE ATCC27853                              | 0,002  | 0,022   | 0,2435  | 0,3745   | 0,4945   |
| SA 1157+ PSE 1332 ÖB                               | 0,003  | 0,002   | 0,002   | 0,002    | 0,0495   |
| SA 1157+ PSE ATCC27853                             | 0,0015 | 0,0005  | 0,005   | 0,1025   | 0,255    |
| SA 254+ PSE 246                                    | 0,002  | 0,001   | 0,0015  | 0,0015   | 0,1125   |
| SA 254+ PSE ATCC27853                              | 0,002  | 0,0165  | 0,242   | 0,374    | 0,5895   |
| SA 539+ PSE 571                                    | 0,002  | 0,002   | 0,035   | 0,3045   | 0,674    |
| SA 539+ PSE ATCC27853                              | 0,001  | 0,0045  | 0,1235  | 0,49     | 0,7785   |
| SA 995+ PSE 1082 ÖB                                | 0,0015 | 0,002   | 0,0055  | 0,138    | 0,381    |
| SA 995+ PSE ATCC27853                              | 0,0015 | 0,002   | 0,006   | 0,144    | 0,344    |
| MRSA ATCC 43300 + PSE ATCC 27853 ÖB                | 0,0025 | 0,0025  | 0,0145  | 0,1665   | 0,5855   |

Her iki grup klinik izolatın, birlikte izole edilen ve standart kökenden elde edilen bakteri lizatı fraksiyonu ile beraber inkübasyonu sürecinde, 0, 4, 8, 12, ve 24. saatlerdeki üremelere ait spektrofotometrik ölçüm (600 nm) ile elde edilen değerler Tablo 5’de gösterilmiştir. Kontrole göre, bakteri lizatının *P.aeruginosa* kökenlerinin üremesini %7.7, *S.aureus* kökenlerinin üremesini ise % 12.1 baskıladığı anlaşılmıştır.

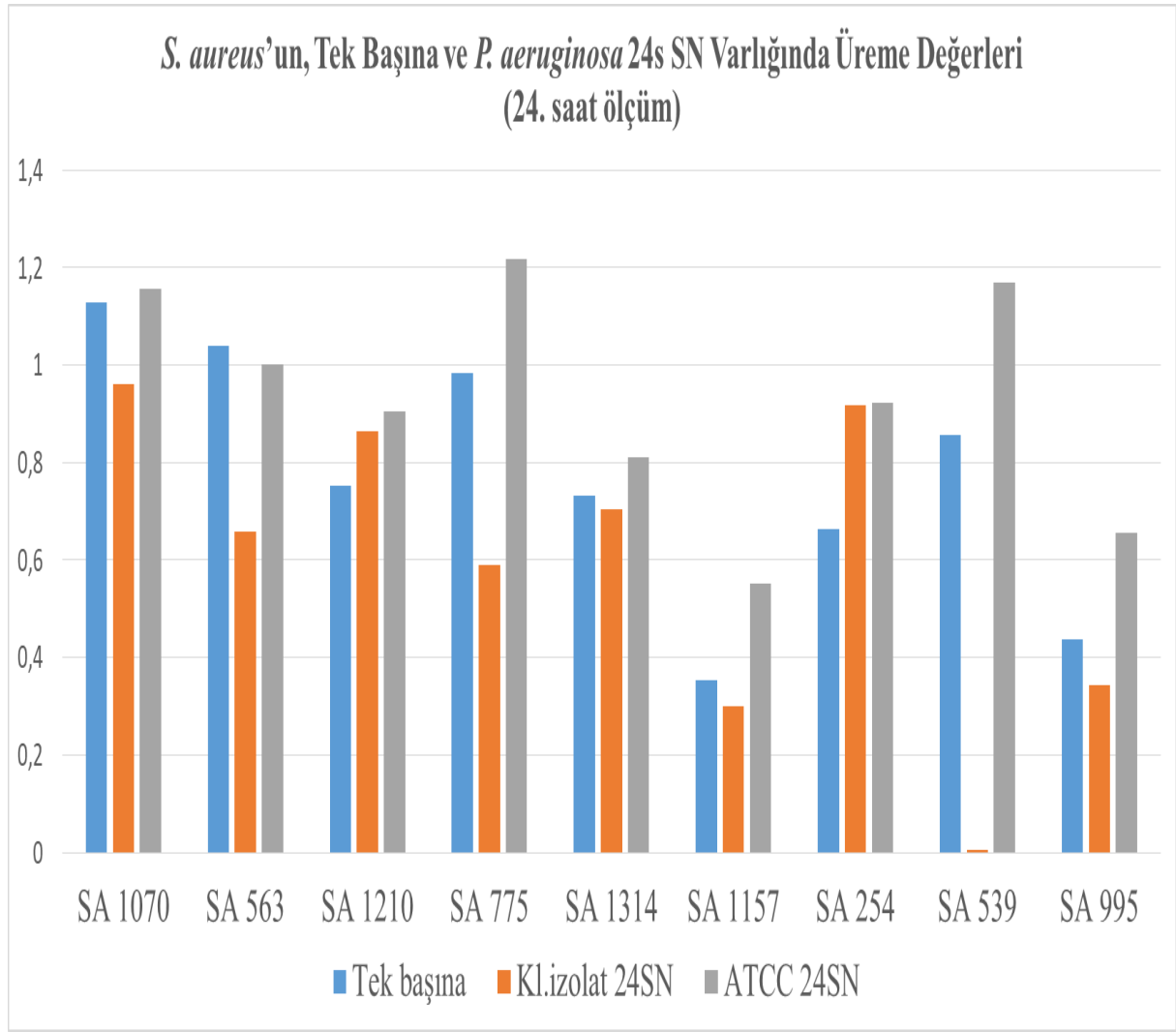
Tablo 5 Klinik izolatların Bakteri lizatı (BL) fraksiyonu varlığında üreme değerleri (OD 600 nm)

|                                                    | 0.SAAT | 4. SAAT | 8. SAAT | 12. SAAT | 24. SAAT |
|----------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |         |         |          |          |
| PSE 1094+SA 1070 BL                                | 0,0115 | 0,0125  | 0,003   | 0,1605   | 0,8535   |
| PSE 1094+MRSA ATCC43300 BL                         | 0,009  | 0,009   | 0,007   | 0,1105   | 0,911    |
| PSE 614+SA 563 BL                                  | 0,0255 | 0,026   | 0,0275  | 0,0895   | 0,801    |
| PSE 614+MRSA ATCC43300 BL                          | 0,01   | 0,02    | 0,002   | 0,113    | 0,836    |
| PSE 1368+SA 1210 BL                                | 0,0015 | 0,006   | 0,0005  | 0,1595   | 0,6505   |
| PSE 1368+MRSA ATCC43300 BL                         | 0,0085 | 0,012   | 0,015   | 0,104    | 0,648    |
| PSE 809+SA 775 BL                                  | 0,007  | 0,012   | 0,0125  | 0,1725   | 0,76     |
| PSE 809+MRSA ATCC43300 BL                          | 0,006  | 0,001   | 0,001   | 0,261    | 0,8335   |
| PSE 1556+SA 1314 BL                                | 0,001  | 0,0025  | 0,003   | 0,1785   | 1,103    |
| PSE 1556+MRSA ATCC43300 BL                         | 0,001  | 0,002   | 0,01    | 0,1515   | 0,9485   |
| PSE 1332+SA 1157 BL                                | 0,007  | 0,0055  | 0,0045  | 0,0895   | 0,9105   |
| PSE 1332+MRSA ATCC43300 BL                         | 0,0095 | 0,012   | 0,02    | 0,101    | 1,0075   |
| PSE 246+SA 254 BL                                  | 0,022  | 0,021   | 0,02    | 0,066    | 0,539    |
| PSE 246+MRSA ATCC43300 BL                          | 0,0085 | 0,014   | 0,0115  | 0,074    | 0,4725   |
| PSE 571+SA 539 BL                                  | 0,034  | 0,0345  | 0,031   | 0,169    | 0,7035   |
| PSE571+MRSA ATCC43300 BL                           | 0,001  | 0,008   | 0,0105  | 0,149    | 0,956    |
| PSE 1082+SA 995 BL                                 | 0,014  | 0,014   | 0,0125  | 0,049    | 0,8495   |
| PSE 1082+MRSA ATCC43300 BL                         | 0,001  | 0,006   | 0,011   | 0,0315   | 1,083    |
| PSE ATCC27853+MRSA ATCC43300 BL                    | 0,006  | 0,0095  | 0,008   | 0,1845   | 0,9475   |
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b>     |        |         |         |          |          |
| SA 1070+PSE 1094 BL                                | 0,003  | 0,0095  | 0,2175  | 0,442    | 0,9935   |
| SA 1070+ PSE ATCC 27853 BL                         | 0,0085 | 0,0095  | 0,174   | 0,3515   | 0,775    |
| SA 563+ PSE 614 BL                                 | 0,0075 | 0,0235  | 0,2645  | 0,4115   | 0,768    |
| SA 563+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,0075 | 0,0235  | 0,239   | 0,356    | 0,774    |
| SA 1210+ PSE 1368 BL                               | 0,0005 | 0,0365  | 0,2425  | 0,391    | 0,7295   |
| SA-1210+ PSE ATCC 27853 BL                         | 0,0065 | 0,031   | 0,226   | 0,37     | 0,742    |
| SA-775+ PSE 809 BL                                 | 0,0035 | 0,01    | 0,172   | 0,344    | 0,887    |
| SA-775+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,005  | 0,0065  | 0,175   | 0,385    | 0,7825   |
| SA 1314 +PSE 1556 BL                               | 0,016  | 0,0115  | 0,2575  | 0,4295   | 0,6305   |
| SA1314+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,0095 | 0,0075  | 0,2105  | 0,353    | 0,5565   |
| SA 1157+ PSE 1332 BL                               | 0,001  | 0,0017  | 0,012   | 0,0905   | 0,711    |
| SA 1157+ PSE ATCC 27853 BL                         | 0,0045 | 0,0015  | 0,0065  | 0,0985   | 0,5865   |
| SA 254+ PSE 246                                    | 0,013  | 0,017   | 0,1915  | 0,309    | 0,6305   |
| SA 254+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,011  | 0,013   | 0,194   | 0,309    | 0,5605   |
| SA 539+ PSE 571                                    | 0,0195 | 0,018   | 0,059   | 0,2825   | 0,5925   |
| SA 539+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,0165 | 0,0015  | 0,1     | 0,3115   | 0,6275   |
| SA 995+ PSE 1082 BL                                | 0,02   | 0,015   | 0,0115  | 0,1355   | 0,659    |
| SA 995+ PSE ATCC 27853 BL                          | 0,001  | 0,0085  | 0,02    | 0,1035   | 0,3985   |
| MRSA ATCC43300+ PSE ATCC27853 BL                   | 0,001  | 0,004   | 0,02    | 0,0895   | 0,2685   |

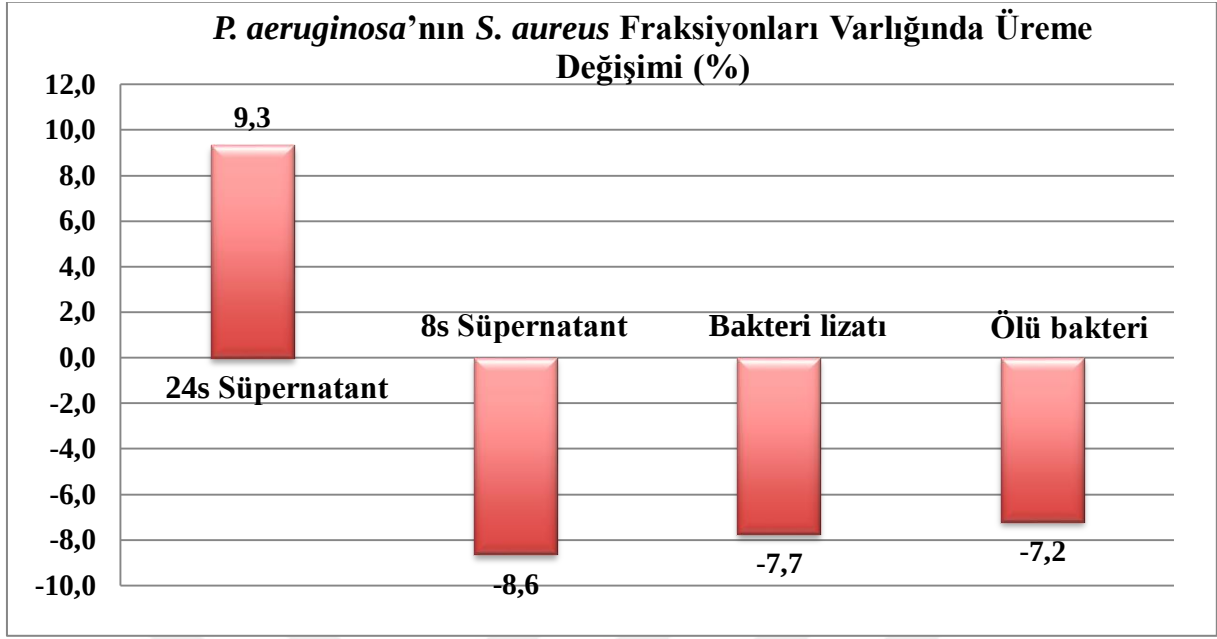
Çalışmaya alınan *S. aureus* ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarının, hazırlanan farklı fraksiyonların varlığında üremelerindeki kontrole göre saptanan değişimler Şekil 10, 11, 12, 13’de gösterilmiştir. Hesaplamalarda her bir fraksiyon varlığında saptanan 24.saat spektrofotometrik ölçümlerin ortalaması alınmış ve kontrole göre (izolatın tek başına üremesinde elde edilen ölçüm değeri) oluşan fark (%) bulunmuştur.



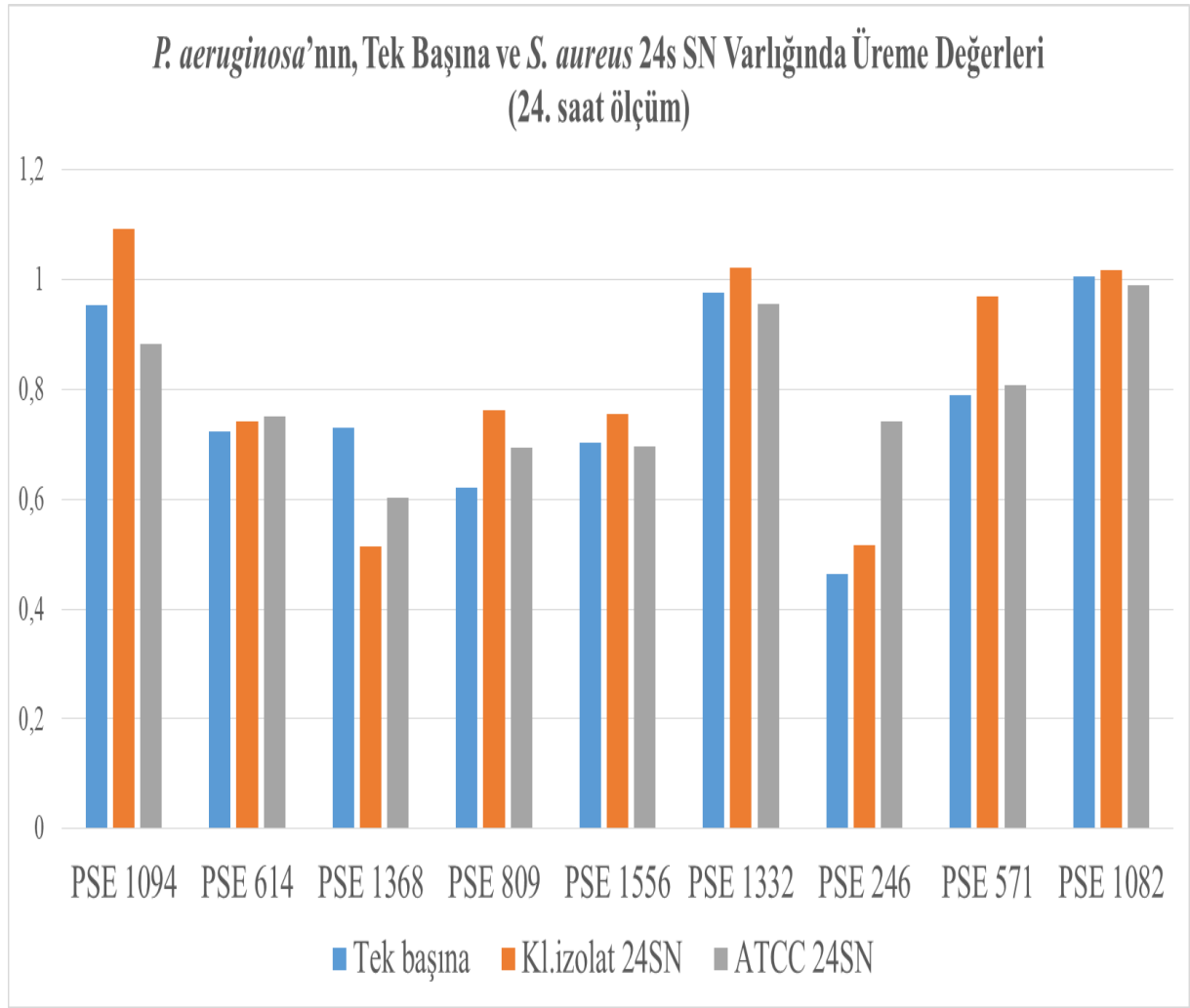
**Şekil 10** *P. aeruginosa*’dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizati ve ölü bakteri fraksiyonlarının *S. aureus* izolatlarının üremesi üzerindeki etkileri



**Şekil 11** *S. aureus* kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* 24s SN varlığında üreme değerlerinin karşılaştırılması



**Şekil 12** *S. aureus*'dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının *P. aeruginosa* izolatlarının üremesi üzerindeki etkileri



**Şekil 13** *P. aeruginosa* kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart *S. aureus* 24s SN varlığında üreme değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.2. Klinik İzolatların Biyofilm Üretimi

Çalışmaya alınan dokuz çift klinik *P. aeruginosa* ve *S. aureus* kökeninin, 37°C’de 48 saat inkübasyon sonrası saptanan biyofilm üretimlerine ait spektrofotometrik ölçüm ile (OD 550 nm) elde edilen değerler Tablo 6’de gösterilmiştir.

**Tablo 6** Klinik izolatların biyofilm üretim değerleri (48s, OD: 550 nm)

| <b>Biyofilm</b>                                     |                  |
|-----------------------------------------------------|------------------|
| <b><u>Klinik <i>P. aeruginosa</i> kökenleri</u></b> | <b>OD 550 nm</b> |
| PSE 1094                                            | 2,292            |
| PSE 614                                             | 0,937            |
| PSE 1368                                            | 0,147            |
| PSE 809                                             | 1,243            |
| PSE 1556                                            | >4               |
| PSE 1332                                            | 0,533            |
| PSE 246                                             | 0,603            |
| PSE 571                                             | >4               |
| PSE 1082                                            | 1,659            |
| *PSE ATCC 27853                                     | 1,606            |
| <b><u>Klinik <i>S. aureus</i> kökenleri</u></b>     |                  |
| SA 1070                                             | 1,559            |
| SA 563                                              | 0,2135           |
| SA 1210                                             | 0,3295           |
| SA 775                                              | 0,712            |
| SA 1314                                             | 0,107            |
| SA 1157                                             | 0,886            |
| SA 254                                              | 0,639            |
| SA 539                                              | 0,218            |
| SA 995                                              | 0,8925           |
| #MRSA ATCC 43300                                    | 0,8585           |

\* PSE ATCC

27853: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

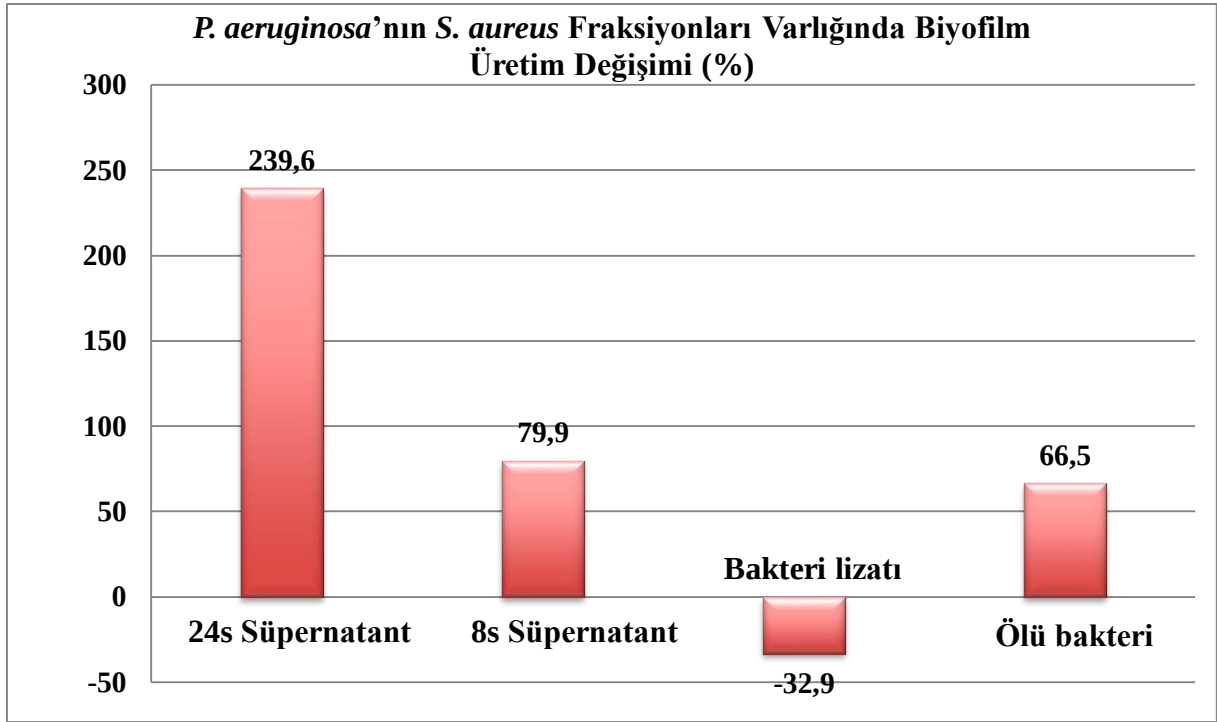
# MRSA ATCC 43300: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Klinik *P. aeruginosa* izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart *S. aureus* kökenlerinden hazırlanan hücre fraksiyonları (8s SN, 24s SN, ölü bakteri, bakteri lizatu) varlığında saptanan biyofilm üretimlerine (48 saat inkübasyon sonrası) ait spektrofotometrik ölçüm (550 nm) ile elde edilen değerler Tablo.7’de gösterilmiştir.

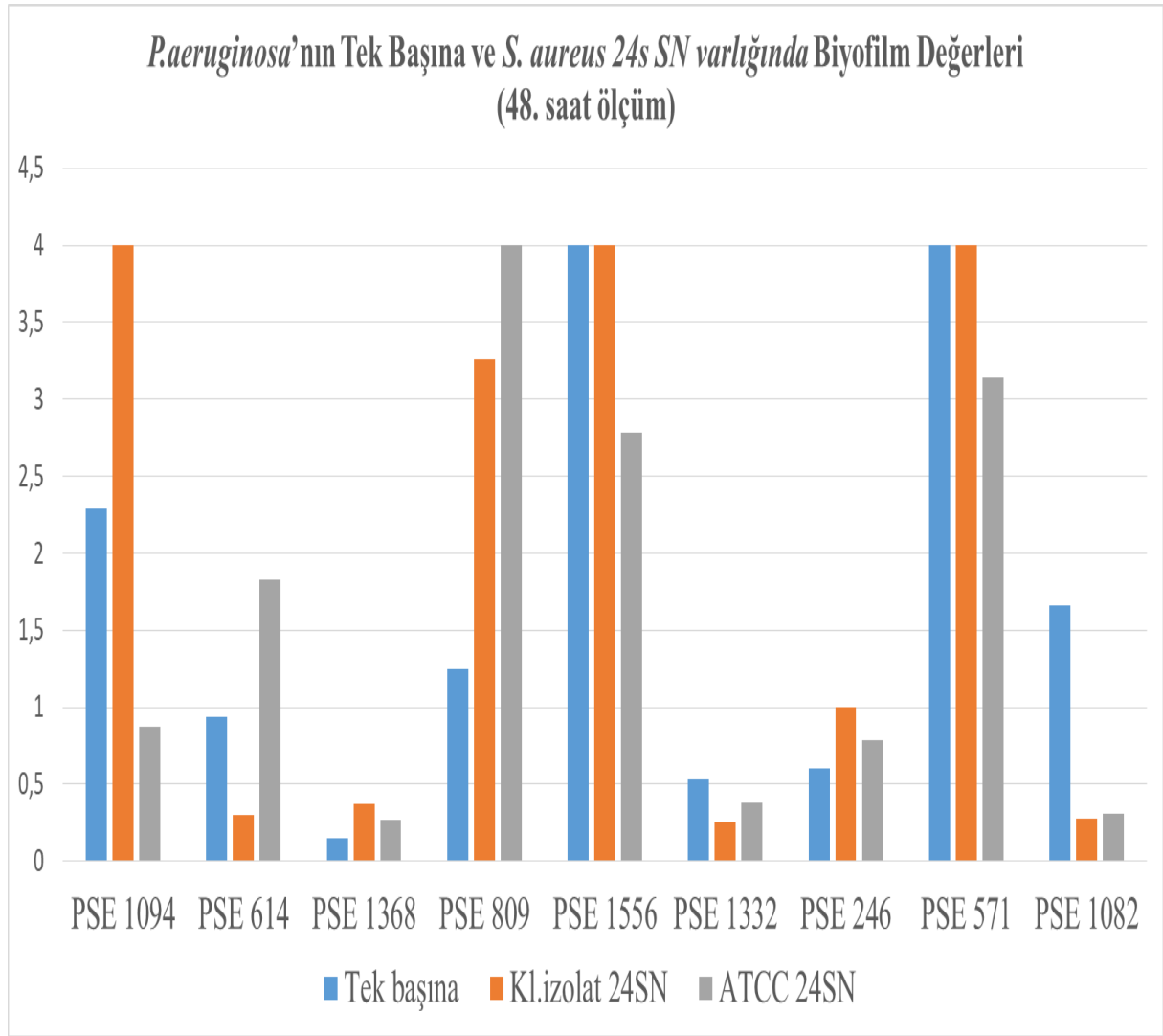
**Tablo 7.** Klinik *P.aeruginosa* izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart *S. aureus* kökenlerinden hazırlanan çeşitli hücre fraksiyonları varlığında biyofilm üretim değerleri

|                                                    | 8s SN  | 24s SN | Ölü Bakteri | Bakteri Lizatı |
|----------------------------------------------------|--------|--------|-------------|----------------|
| <b><u>Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri</u></b> |        |        |             |                |
| PSE 1094+SA 1070                                   | >4     | >4     | 2,18        | 0,5715         |
| PSE 1094+MRSA ATCC43300                            | 0,662  | 0,873  | 0,9395      | 0,507          |
| PSE 614+SA 563                                     | 0,203  | 0,303  | 0,1665      | 0,1475         |
| PSE 614+MRSA ATCC43300                             | 0,1965 | 1,829  | 0,1205      | 0,078          |
| PSE 1368+SA 1210                                   | 0,1565 | 0,373  | 0,194       | 0,148          |
| PSE 1368+MRSA ATCC43300                            | 0,2995 | 0,27   | 0,17        | 0,118          |
| PSE 809+SA 775                                     | 1,321  | 3,264  | 1,2655      | 0,994          |
| PSE 809+MRSA ATCC43300                             | >4     | >4     | 2,243       | 3,003          |
| PSE 1556+SA 1314                                   | >4     | >4     | 2,865       | 0,793          |
| PSE 1556+MRSA ATCC43300                            | 2,048  | 2,785  | 1,934       | 1,544          |
| PSE 1332+SA 1157                                   | 0,473  | 0,249  | 0,806       | 0,107          |
| PSE 1332+MRSA ATCC43300                            | 0,6205 | 0,378  | 0,721       | 0,2115         |
| PSE 246+SA 254                                     | 0,7025 | 1      | 0,977       | 0,1895         |
| PSE 246+MRSA ATCC43300                             | 0,379  | 0,7865 | 0,4375      | 0,394          |
| PSE 571+SA 539                                     | >4     | >4     | 2,811       | >4             |
| PSE571+MRSA ATCC43300                              | 2,473  | 3,141  | 1,662       | 1,6405         |
| PSE 1082+SA 995                                    | 0,3205 | 0,2745 | 0,4905      | 0,676          |
| PSE 1082+MRSA ATCC43300                            | 0,312  | 0,3105 | 1,35        | 0,9855         |
| PSE ATCC27853+MRSA ATCC43300                       | 0,4035 | 1,274  | 0,967       | 0,76           |

Yukarıdaki veriler incelendiğinde, *S. aureus*'tan hazırlanan 24s süpernatant, 8s süpernatant ve ölü bakteri fraksiyonlarının klinik *P.aeruginosa* kökenlerinin biyofilm üretimini, kontrole göre sırasıyla, %239.6, %79.9 ve %66.5 oranında artırdığı, bakteri lizatı ürünlerinin ise %32.9 azalttığı saptanmıştır (Şekil 14). Bunun dışında *P. aeruginosa*'nın tek başına, birlikte izole edilen ve standart *S. aureus* 24s SN varlığındaki üreme değerleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 15).



**Şekil 14** *S. aureus*'dan elde edilen 24s süpernatant, 8s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm üretimi üzerindeki etkileri



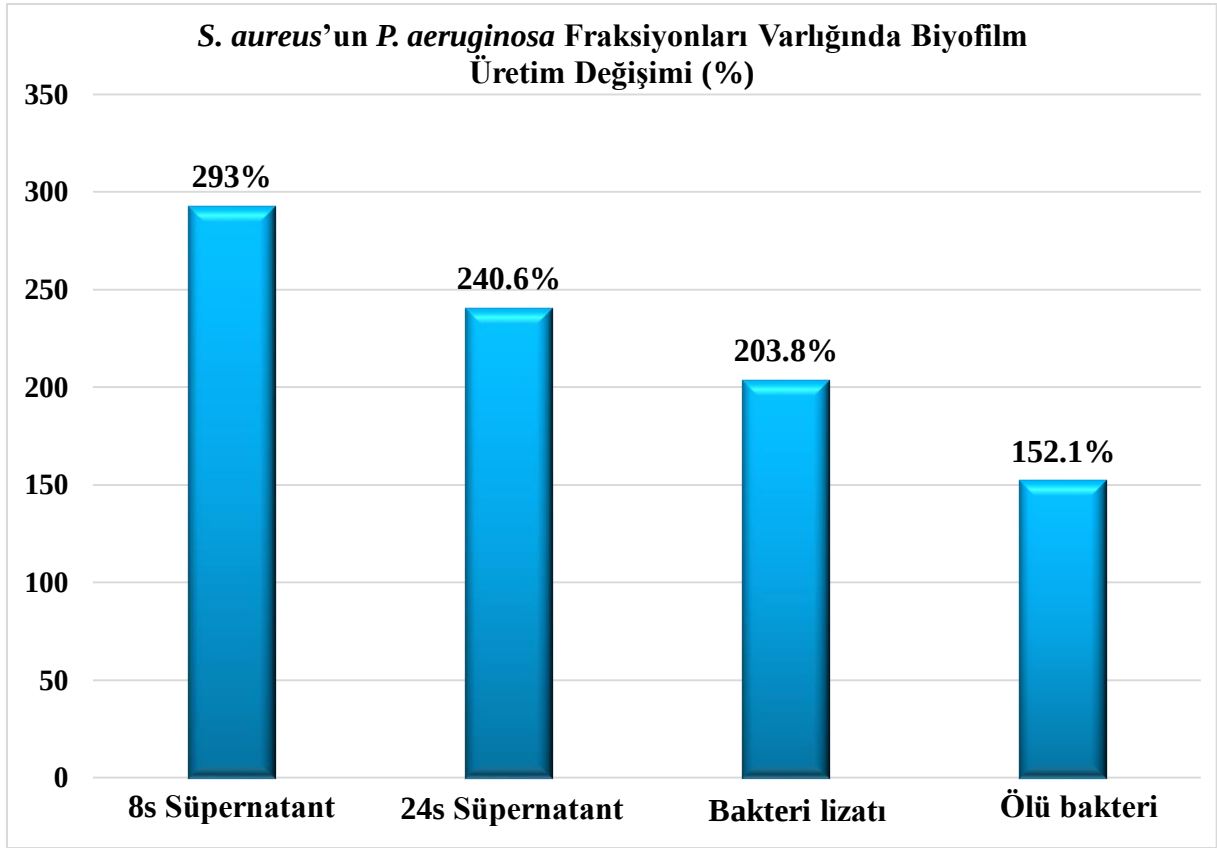
**Şekil 15** *P. aeruginosa* kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart *S. aureus* 24s SN varlığında biyofilm üretim değerlerinin karşılaştırılması

Klinik *S. aureus* izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* kökenlerinden hazırlanan hücre fraksiyonları (8s SN, 24s SN, ölü bakteri, bakteri lizati) varlığında saptanan biyofilm üretimlerine (48 saat inkübasyon sonrası) ait spektrofotometrik ölçüm (550 nm) ile elde edilen değerler Tablo.8'de gösterilmiştir.

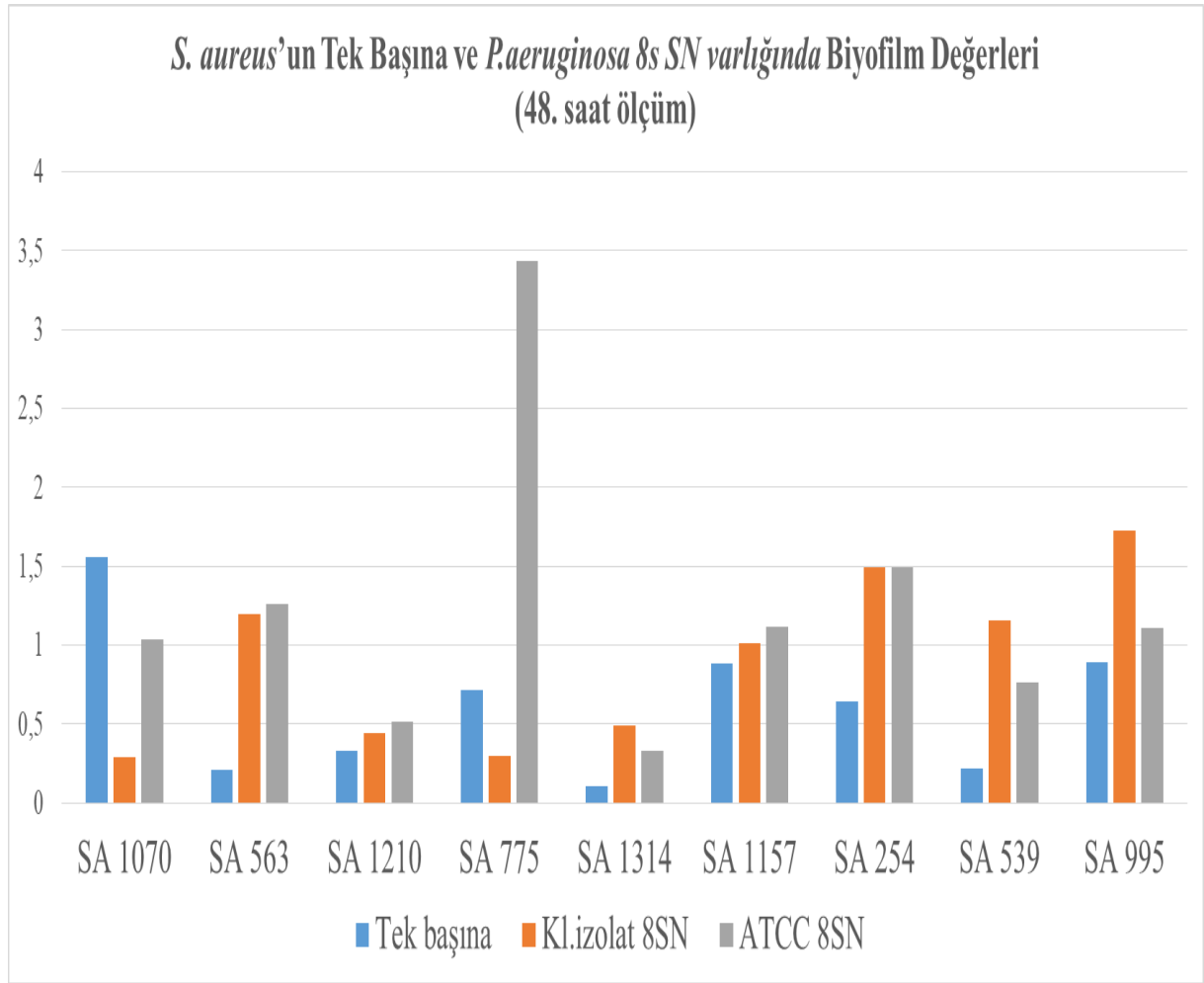
**Tablo 8** Klinik *S.aureus* izolatlarının, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* kökenlerinden hazırlanan çeşitli hücre fraksiyonları varlığında biyofilm üretimleri

|                                                | 8s SN  | 24s SN | Ölü Bakteri | Bakteri Lizatı |
|------------------------------------------------|--------|--------|-------------|----------------|
| <b><u>Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri</u></b> |        |        |             |                |
| SA 1070+ PSE 1094                              | 0,2925 | 3,495  | 0,2545      | 0,6575         |
| SA 1070+ PSE ATCC27853                         | 1,033  | 1,852  | 0,5215      | 0,814          |
| SA 563+ PSE 614                                | 1,196  | 1,2045 | 3,581       | 0,247          |
| SA 563+ PSE ATCC27853                          | 1,259  | 1,416  | 0,341       | 0,847          |
| SA 1210+ PSE 1368                              | 0,4455 | 0,636  | 0,1245      | 0,3485         |
| SA-1210+ PSE ATCC27853                         | 0,512  | 0,12   | 0,26        | 0,2555         |
| SA-775+ PSE 809                                | 0,2985 | 0,7705 | 1,191       | 1,1715         |
| SA-775+ PSE ATCC27853                          | 3,435  | 3,956  | 0,168       | 0,1965         |
| SA 1314 +PSE 1556                              | 0,487  | 0,301  | 0,1915      | 0,3895         |
| SA1314+ PSE ATCC27853                          | 0,33   | 0,1345 | 1,1035      | 0,3705         |
| SA 1157+ PSE 1332                              | 1,0135 | 1,6735 | 0,8735      | 0,4145         |
| SA 1157+ PSE ATCC27853                         | 1,119  | 1,247  | 1,12        | 0,4895         |
| SA 254+ PSE 246                                | 1,4935 | 0,471  | 0,916       | 1,79           |
| SA 254+ PSE ATCC27853                          | 1,495  | 0,3935 | 0,393       | 1,403          |
| SA 539+ PSE 571                                | 1,1565 | 2,023  | 0,2785      | 0,467          |
| SA 539+ PSE ATCC27853                          | 0,7655 | 2,3185 | 3,707       | 1,1975         |
| SA 995+ PSE 1082                               | 1,726  | 0,619  | 1,644       | 1,5705         |
| SA 995+ PSE ATCC27853                          | 1,107  | 0,7485 | 1,657       | 0,581          |
| MRSA ATCC43300+ PSE ATCC27853                  | 0,3475 | 0,5035 | 0,877       | 0,3825         |

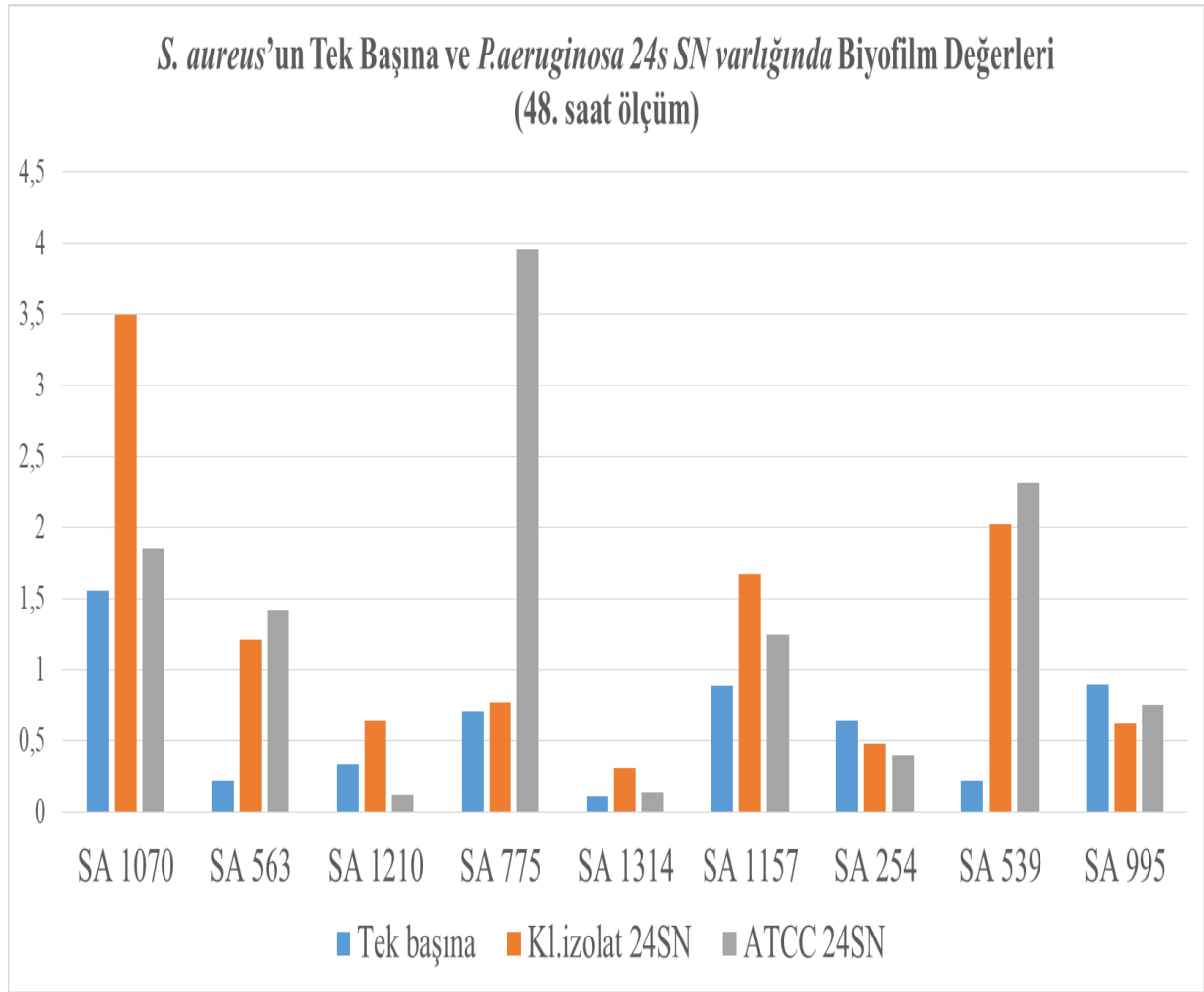
Yukarıdaki veriler incelendiğinde, *P. aeruginosa*'dan hazırlanan 8s süpernatant, 24s süpernatant, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonlarının klinik *S. aureus* kökenlerinin biyofilm üretimini, kontrole göre sırasıyla, %293, %240.6, %203.8 ve %152.1 oranında artırdığı saptanmıştır (Şekil 16). Ayrıca *S. aureus*'un tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* 8s SN ve 24s SN varlığındaki üreme değerleri ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır (Şekil 17-18).



**Şekil 16** *P. aeruginosa*'dan elde edilen 8s süpernatant, 24s süpernatant, bakteri lizatu ve ölü bakteri fraksiyonlarının *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretimi üzerindeki etkileri



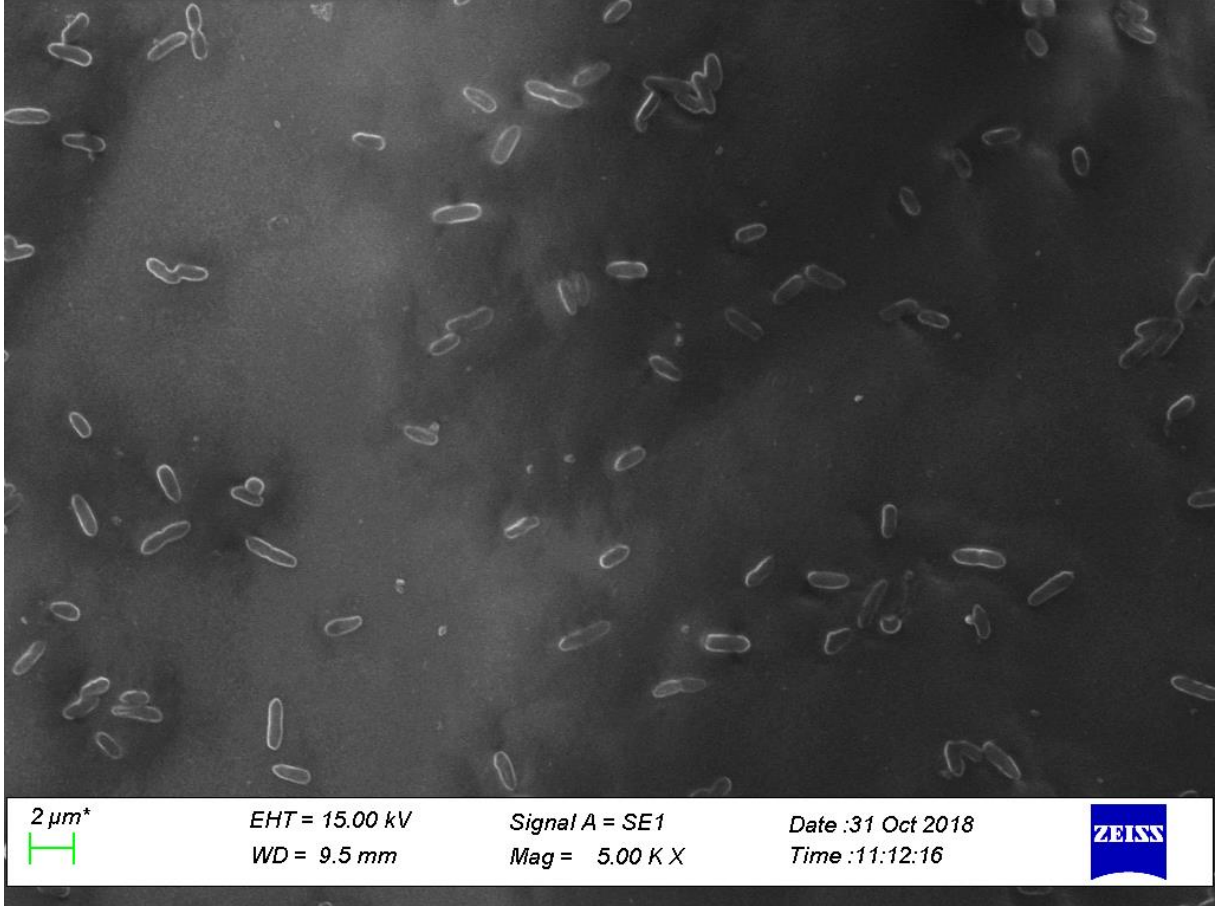
**Şekil 17** *S. aureus* kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* 8s SN varlığında biyo film üretim değerlerinin karşılaştırılması



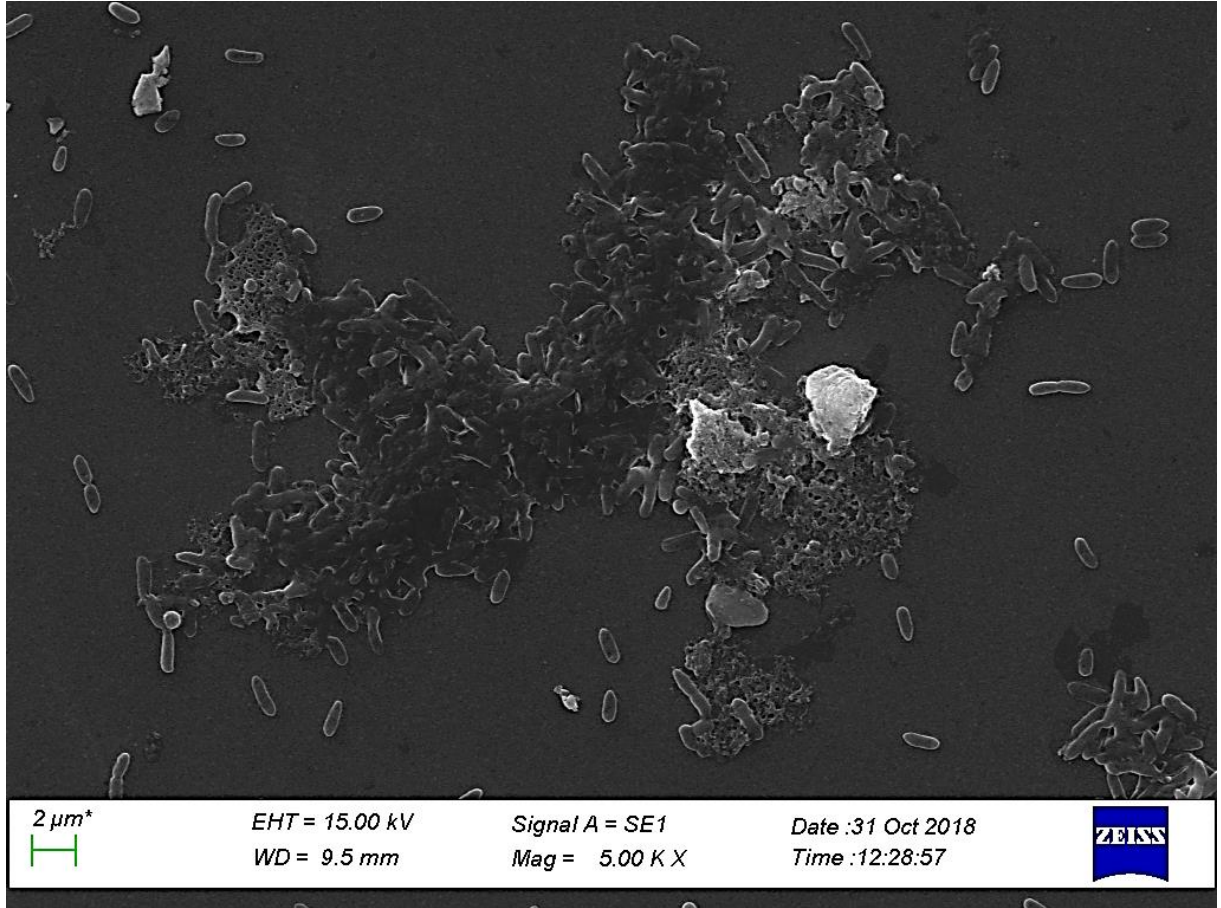
**Şekil 18** *S. aureus* kökenlerinin tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P. aeruginosa* 24s SN varlığında biyofilm üretim değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.3. Biyofilm Üretiminin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi

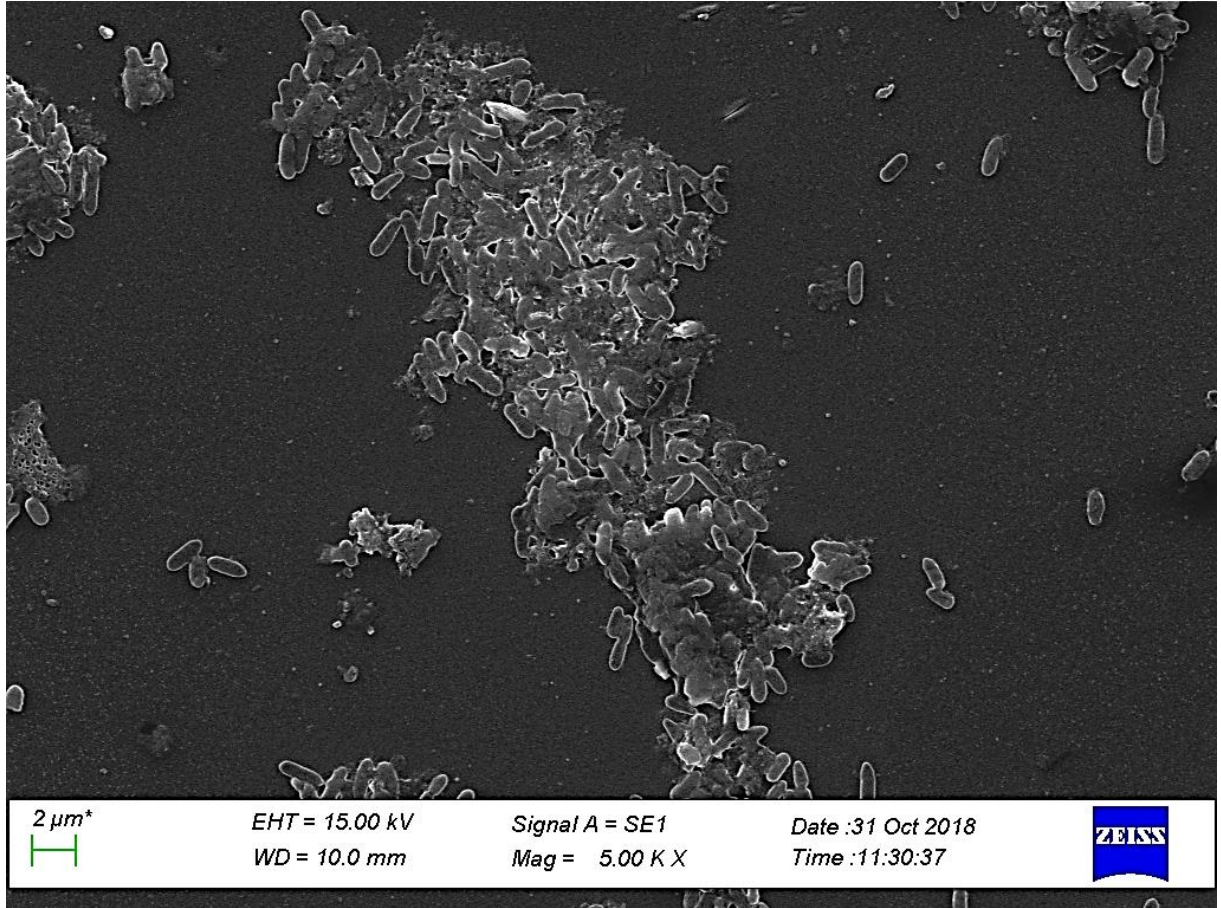
Biyofilm çalışmalarında yüksek oranda biyofilm ürettikleri saptanan PSE 1094 ve SA 1070 no.lu klinik izolatlar SEM analizi ile biyofilm üretimi açısından değerlendirildi. İzolatların tek başına ve birlikte izole edilen kökene ait 8s ve 24s süpernatant ile inkübasyon sonrası alınan örnekler taramalı elektron mikroskopunda (EVO MA10, Zeiss, Almanya) 2.5-5 K $\times$  büyütmede incelenerek fotoğraflandı (Resim 1-6). Fotoğraflar incelendiğinde, her iki klinik izolat için 24s süpernatant varlığının, 8s süpernatant ve tek başına inkübasyona göre daha yoğun bir biyofilm üretimine yol açtığı gözlenmiştir.



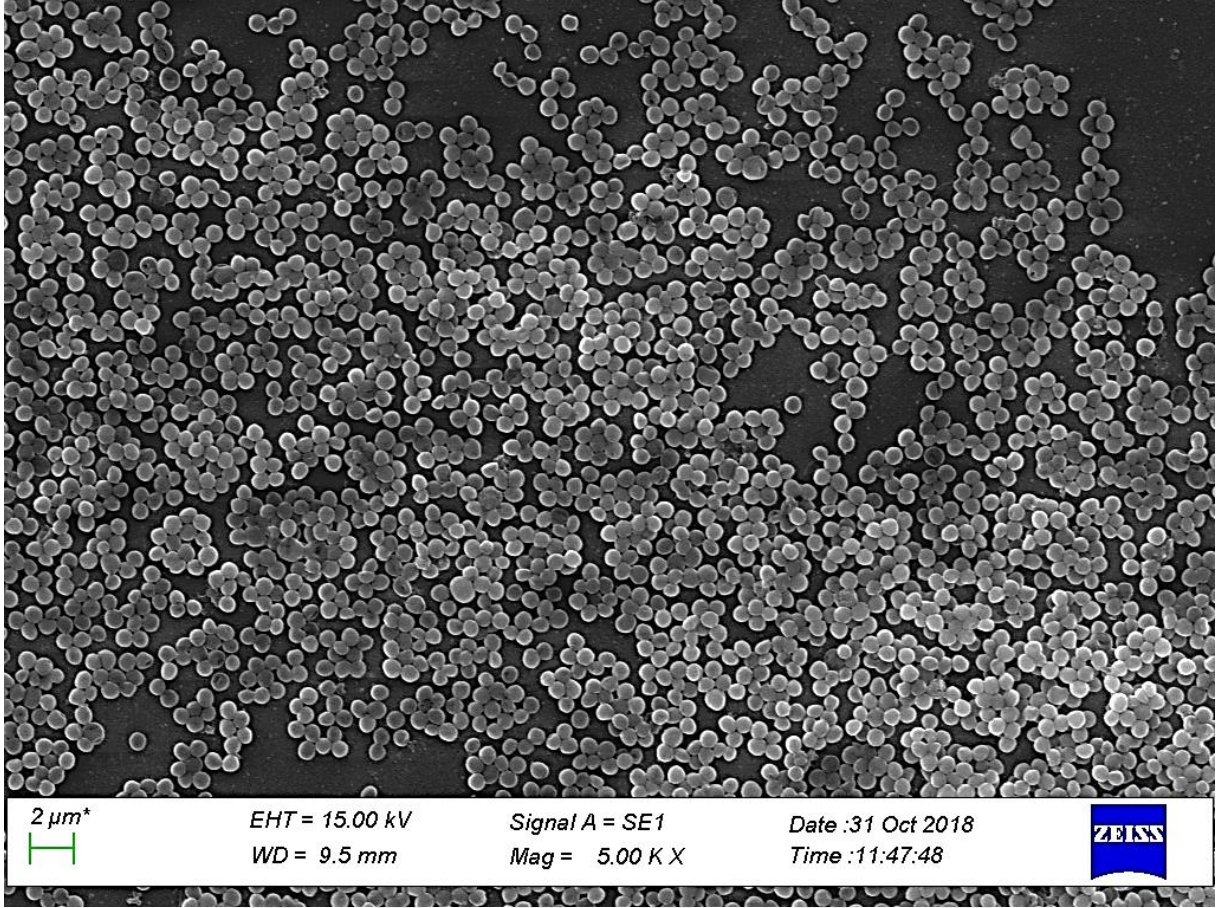
**Resim 1** Klinik *P.aeruginosa* (PSE 1094) kökeninin tek başına inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).



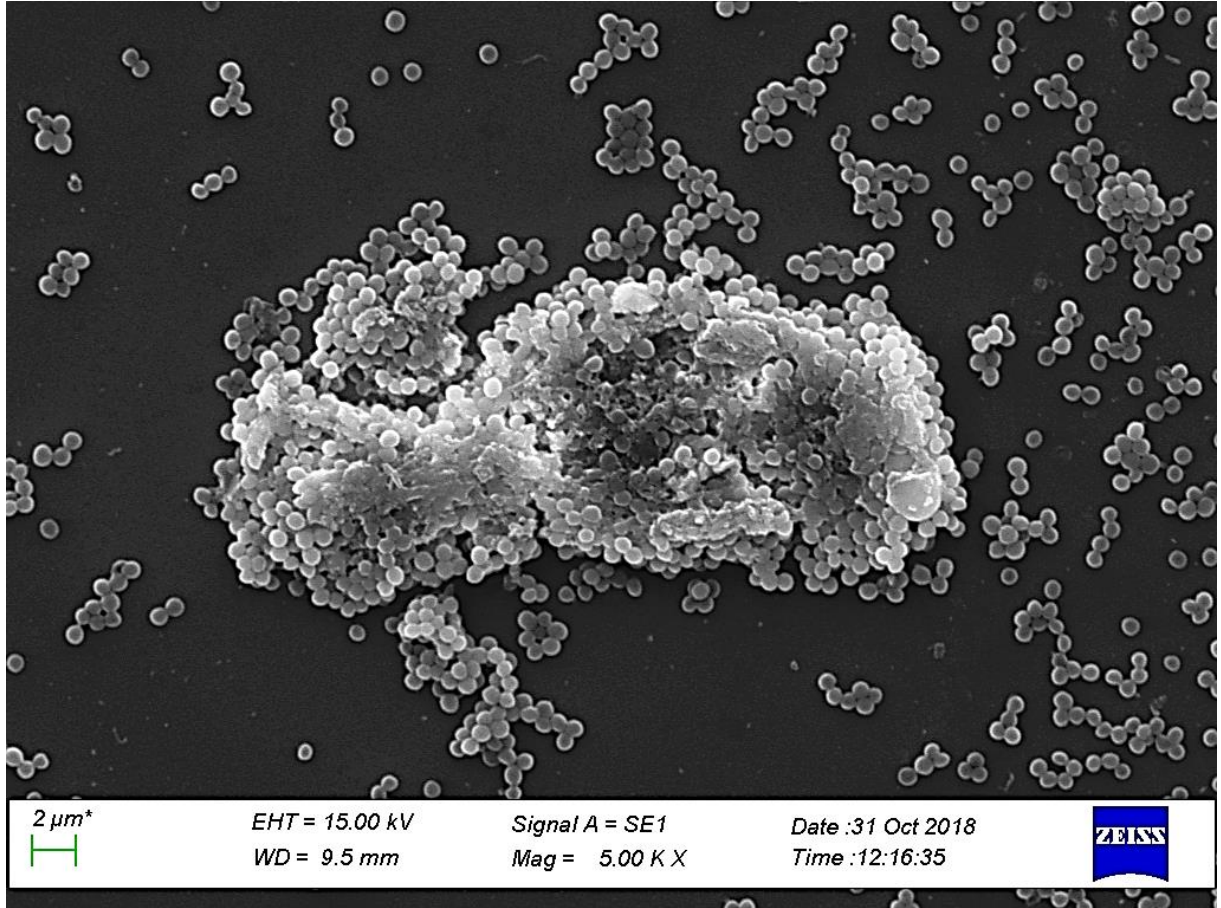
**Resim 2** Birlikte izole edilen *S.aureus* (SA 1070) 8s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik *P.aeruginosa* (PSE 1094) kökeninin SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).



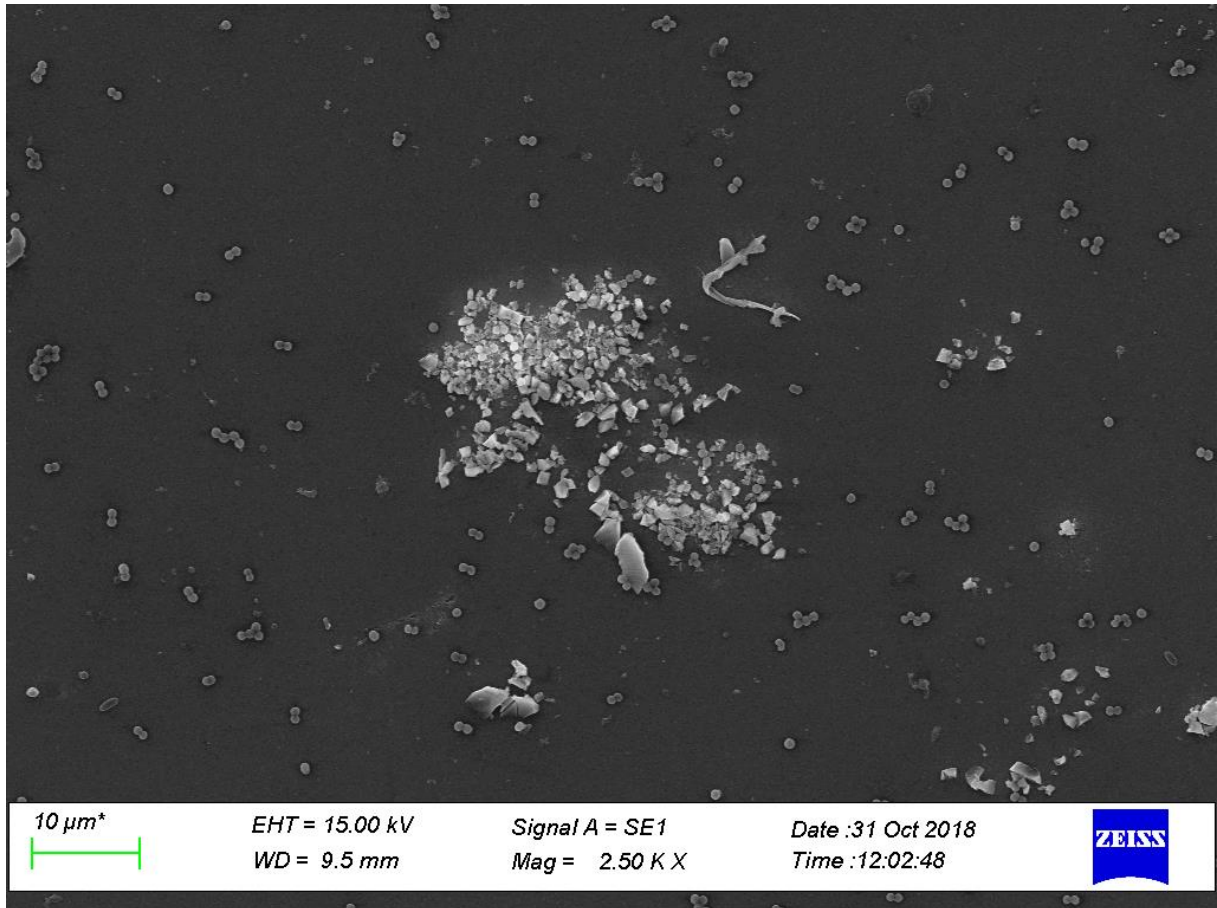
**Resim 3** Birlikte izole edilen *S.aureus* (SA 1070) 24s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik *P.aeruginosa* (PSE 1094) kökeninin SEM görüntüleri (5 K $\times$  büyütmedeki görünümü).



**Resim 4** Klinik *S.aureus* (SA 1070) kökeninin tek başına inkübasyonu sonrası SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).



**Resim 5** Birlikte izole edilen *P.aeruginosa* (PSE 1096) 8s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik *S.aureus* (SA 1070) kökeninin SEM görüntüleri (5 K× büyütmedeki görünümü).



**Resim 6** Birlikte izole edilen *P.aeruginosa* (PSE 1096) 24s süpernatantı ile inkübasyonu sonrası klinik *S.aureus* (SA 1070) kökeninin SEM görüntüleri (2.50 K× büyütmedeki görünümü).

#### 4.4. Klinik İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Klinik *P. aeruginosa* izolatlarının, tek başına, birlikte izole edilen ve standart *S.aureus* kökenlerinden hazırlanan 24s süpernatantı varlığında yapılan tobramisin duyarlılık testi sonuçları Tablo 9’de gösterilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, klinik *S.aureus* 24s süpernatantlarının *P.aeruginosa* kökenlerinin tobramisin MİK değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Buna karşın, PSE1082 kökeninde tobramisin duyarlılığının arttığı (4 kat MİK düşüşü) belirlenmiştir.

**Tablo 9** Klinik *P. aeruginosa* izolatlarının *S. aureus* 24s SN varlığında tobramisin MİK değerlerinde değişim

| Klinik <i>P.aeruginosa</i> kökenleri | MİK (µg/mL) | Klinik <i>S.aureus</i> 24s SN ile MİK (µg/mL) | #MRSA 43300 24s SN ile MİK (µg/mL) |
|--------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|
| PSE 1094                             | 0,5         | 0,5                                           | 2                                  |
| PSE 614                              | 0,5         | 1                                             | 1                                  |
| PSE 1368                             | 0,25        | 0,25                                          | 0,25                               |
| PSE 809                              | 1           | 0,25                                          | 0,25                               |
| PSE 1556                             | 0,25        | 0,5                                           | 0,5                                |
| PSE 1332                             | 0,25        | 0,25                                          | 0,25                               |
| PSE 246                              | 0,5         | 0,5                                           | 0,5                                |
| PSE 571                              | 0,5         | 0,25                                          | 0,25                               |
| PSE 1082                             | 4           | 1                                             | 1                                  |
| <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853       | 0,25        | -                                             | 0,25                               |

#MRSA 43300: Staphylococcus aureus ATCC 43300

Klinik *S. aureus* izolatlarının, tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P.aeruginosa* kökenlerinden hazırlanan 24s süpernatantı varlığında yapılan vankomisin duyarlılık testi sonuçları Tablo.10'de gösterilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, klinik *P.aeruginosa* ve standart kökenden hazırlanan 24s süpernatantlarının, *S.aureus* kökenlerinin vankomisin MİK değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

**Tablo 10** Klinik *S. aureus* izolatlarının *P.aeruginosa* 24s SN varlığında vankomisin MİK değerlerinde değişim

| Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri | MİK (µg/mL) | Klinik <i>P.aeruginosa</i> 24s SN ile MİK (µg/mL) | *PSE ATCC 27853 24s SN ile MİK (µg/mL) |
|----------------------------------|-------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|
| SA 1070                          | 1           | 2                                                 | 1                                      |
| SA 563                           | 2           | 2                                                 | 1                                      |
| SA 1210                          | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 775                           | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 1314                          | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 1157                          | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 254                           | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 539                           | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| SA 995                           | 1           | 1                                                 | 1                                      |
| <i>S.aureus</i> ATCC 29213       | 1           | -                                                 | 1                                      |

\* PSE ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Klinik *S. aureus* izolatlarının, tek başına, birlikte izole edilen ve standart *P.aeruginosa* kökenlerinden hazırlanan 24s süpernatantı varlığında yapılan linezolid duyarlılık testi sonuçları Tablo.11’de gösterilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, klinik ve standart kökenlerden hazırlanan *P.aeruginosa* 24s süpernatantlarının, *S.aureus* linezolid duyarlılığını azalttığı (2 - >32 kat MİK artışı) belirlenmiştir. Buna karşın, SA1157 kökeninde, birlikte izole edilen kökenden elde edilen 24s süpernatantın MİK değişimine neden olmadığı görülmüştür.

**Tablo 11** Klinik *S. aureus* izolatlarının *P.aeruginosa* 24s SN varlığında linezolid MİK değerlerinde değişim

| Klinik <i>S.aureus</i> kökenleri | MİK (µg/mL) | Klinik <i>P.aeruginosa</i><br>24s SN ile MİK<br>(µg/mL) | *PSE ATCC 27853 24s<br>SN ile MİK (µg/mL) |
|----------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| SA 1070                          | 2           | 8                                                       | 4                                         |
| SA 563                           | 2           | 4                                                       | 8                                         |
| SA 1210                          | 2           | >32                                                     | 4                                         |
| SA 775                           | 2           | 16                                                      | >32                                       |
| SA 1314                          | 2           | 8                                                       | 32                                        |
| SA 1157                          | 2           | 2                                                       | 4                                         |
| SA 254                           | 2           | >32                                                     | 32                                        |
| SA 539                           | 2           | 8                                                       | 8                                         |
| SA 995                           | 2           | 16                                                      | 8                                         |
| <i>S.aureus</i> ATCC 29213       | 1           | -                                                       | 2                                         |

\* PSE ATCC 27853: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*S. aureus* ve *P. aeruginosa* insanlarda hem toplum hem de hastane kaynaklı birçok akut veya kronik enfeksiyondan, tek veya birlikte izole edilebilen patojenlerdir. Ayrıca görülme sıklığı nedeniyle, birçok antimikrobiyal ajana maruz kalan bu patojenler arasında, MDR kökenlerin sıklığı giderek artmaktadır. Bu patojenler, KF hastalarında solunum yolunun kolonizasyona elverişli olmasından dolayı, bu bölgede tek veya birlikte kolonize olmakta ve enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bir bakterinin konakta uzun süre kolonize kalabilmesi, konak immün yanıtının yetersizliğine, inokulum miktarına, biyofilm üretimine, virülans faktörlerine ve antimikrobiyal toleransına bağlıdır. Bu belirtilen faktörler doğrultusunda, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* birlikte stratejik bir ortaklık yürüterek, KF hastalarının solunum yolunda uzun dönemli kolonizasyon gerçekleştirebilmektedir. Karşılıklı etkileşime dayalı bu ortaklıktaki mekanizmanın, hem model bakterilerle, hem de klinik kökenler ile yapılacak çalışmalar ile aydınlatılması, KF’da polimikrobiyal enfeksiyonların patogenezinin anlaşılması ve tedavisi açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Çalışmamız KF hastalarından elde edilen bu iki patojenin *in vitro* koşullarda birbirleri arasındaki etkileşimlere bağlı olarak, üreme, biyofilm üretimi ve antibiyotik duyarlılığındaki değişimin tespit edilmesini kapsamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, üreme ve biyofilm üretimi çalışmalarında, farklı üreme fazlarında hücre dışı salgılanan ürünlerin etkilerinin belirlenmesi için logaritmik (8s SN) ve statik faz (24s SN) kültür süpernatantları hazırlanmıştır. Buna ek olarak, bakteri hücre duvarının ve hücre içi moleküllerin etkilerini belirlemek üzere ısı ile inaktive edilmiş tam bakteri ve mekanik lizise uğratılmış bakteri fraksiyonları da çalışmaya dahil edilmiştir.

Literatür incelemesinde, antimikrobiyal duyarlılığı üzerinde yapılmış çalışmalarda daha çok hücre dışı ürünlerin ve biyofilm üretiminden kaynaklı duyarlılık değişimlerinin bildirilmiş olmasından yola çıkarak, antimikrobiyal duyarlılığı çalışmalarında biyofilm üretiminde belirgin artışa neden olan 24s SN kullanılması uygun bulunmuştur (Baldan ve ark., 2014; Woods ve ark., 2018).

Çalışmamızda logaritmik faz süpernatantının (8s SN) üreme üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde, *P. aeruginosa* kökenlerinin monokültürlerinin spektrofotometrik ölçümlerinde ilk anlamlı sayısal artış 8 saatlik inkübasyon sonrasında görülürken, 8s SN varlığında bu artış 12. saatte başladığı görülmüştür.

*S. aureus*'da ise monokültürde 4. saatte artış gözlenirken, hem klinik hem de standart kökenin 8s SN ürünlerinin varlığında artış 8. saatte başlamaktadır. Her iki tür bakteride de, klinik ve standart kökenlerinin 8s SN varlığında üremenin yüksek oranda olmasa da inhibe olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu inhibisyon kökenler arasında değişiklik gösterdiği gibi, klinik izolattan elde edilen ürünle gözlenen inhibisyon, standart kökenden elde edilene göre daha belirgindir. Bu durumun, birlikte izole edilen kökenlerde karşılıklı etkileşimlerden kaynaklı QS moleküllerinin daha fazla ekprese olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Statik faz kültür süpernatantları (24s SN) ile yapılan üreme çalışmalarda ise, her iki patojende de üreme eğrisinde adaptasyon fazı uzamış olarak saptanmasına rağmen, genel anlamda *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un birbirlerinin üremesini desteklediği gözlenmiştir (sırasıyla, %9.3, %15.3). Ancak SA 539 kökeninin üremesinin birlikte izole edilen klinik kökene ait süpernatant (24s SN PSE 571) varlığında inkübasyon süresi boyunca yüksek oranda baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum, PSE 571 kökeninin HQNO, rhamnolipid veya piyoverdin gibi inhibitör etkili ve hücre lizisinde rol oynayan molekülleri yüksek düzeyde sentezlediğini düşündürmektedir (Radlinski ve ark., 2017). Çalışmamızın bu basamağında, özellikle standart kökenlere ait 24s SN ürünlerinin klinik *S. aureus* izolatlarında daha belirgin olmak üzere üremeyi desteklediği görülmüştür. Bu sinerjistik etkinin olası nedenleri arasında, 24 saatlik inkübasyon ile elde edilen süpernatantların içeriğinde inhibisyonda etkili moleküllerin inaktivasyonu veya yetersiz miktarlarda üretilmesi, bununla birlikte bu inkübasyon sürecinin sonunda ölüm fazının başlamasından kaynaklı demir gibi üremede gerekli besinlerin ortamda yoğun miktarda bulunması yer almaktadır.

Üreme ile ilişkili deneylerde, 8s SN ve 24s SN ürünlerinin daha çok üremenin adaptasyon fazını uzatmada etkili olduğu ve bu fazda *P. aeruginosa* ürünü 8s SN'ların, *S. aureus* kaynaklı 8s SN'lara göre daha baskılayıcı etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Bunun nedenleri arasında, *P. aeruginosa*'nın QS sisteminin daha aktif moleküllere ve bu sistem ile ilişkili virülans faktörlerine sahip olmasına bağlamaktayız.

Ölü bakteri fraksiyonu ile yapılan üreme deneylerinde, *P. aeruginosa*'nın baskılanma oranı 8s SN ile benzer değerlere sahiptir (sırasıyla, %-7.2, %-8.6). PSE 571 ve PSE 1082 kökenlerinde, 12. saatte hem birlikte izole edilen klinik kökenin hem de standart kökenin ürünleri üremeyi yarı yarıya baskılamıştır.

*S. aureus* kökenlerinin üremesinin, diğer fraksiyonlarla karşılaştırıldığında, ölü bakteri fraksiyonu ile oldukça yüksek (%30.3) bir oranda inhibe olması ilginçtir. Ayrıca SA 1157 ve SA 254 kökenlerinin birlikte izole edilen *P. aeruginosa* ölü bakteri ürünü varlığında, standart köken ve monokültüre göre yüksek oranda inhibe olması diğer bir çarpıcı sonuç olmuştur. Bu belirgin inhibisyon, ürün içeriğinde fazla miktardaki ekzotoksin varlığına bağlı olabileceği gibi, 60°C’de inaktive ettiğimiz *P. aeruginosa*’nın stres ortamında ısıya dayanıklı proteinlerini fazla eksprese etmesinden de kaynaklanabilir.

*S. aureus* bakteri lizatları, *P. aeruginosa* üremesinde 8s SN ve ölü bakteri fraksiyonları ile aynı etkiyi yaratmıştır. Adaptasyon fazının, 8. saatten sonra logaritmik üreme fazına geçtiği görülmüştür. *P. aeruginosa*’nın bakteri lizatlarının *S. aureus* üremesine etkisinde ise 12. saate kadar inhibe edebildiği, fakat 24. saatte ise monokültüre göre hafif düzeyde inhibe edebildiği görülmüştür. En etkin inhibisyon SA 995 ve SA 1157’de, monokültüre göre yaklaşık %50 civarında olmuştur.

Çalışmamızda, *S. aureus*’a ait 24s SN, *P. aeruginosa* kökenlerinin biyofilm üretimini en yüksek oranda (%239.6) artıran ürün olmuştur. Buna karşın, bakteri lizatı fraksiyonları antagonistik bir etki yaratarak biyofilm üretiminde monokültüre göre %32.9 oranında azalmaya neden olmuştur. Bu iki fraksiyonun yarattığı farklı sonuçların, bakteri lizatında denatürasyondan kaynaklı demir gibi destekleyici ürünlerin yüksek miktarda bulunması, bakteri üzerinde stres baskısının oluşmaması, biyofilm üretimini uyarıcı QS moleküllerinin bulunmaması veya aktif olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. 8s SN ve ölü bakteri fraksiyonlarında ise 24s SN’ye oranla daha sınırlı bir biyofilm üretimi artışı saptanmıştır.

*S. aureus* kökenlerinde ise, *P. aeruginosa* kaynaklı tüm ürünlerin çok yüksek oranda biyofilm üretimine neden olduğu görülmektedir. Biyofilm üretimini en yüksek oranda 8s SN indüklemiş, bunu 24s SN, bakteri lizatı ve ölü bakteri fraksiyonları izlemiştir (kontrole göre sırasıyla, %293, % 240.6, % 203.8 ve % 152.1 artış). *S. aureus*’da görülen yüksek biyofilm sentezinin, *P. aeruginosa*’nın kinolon sinyal molekülü olan ve biyofilm üretiminde önemli bir role sahip HQNO molekülünden kaynaklandığını düşündürmektedir. Bununla birlikte daha önce de belirttiğimiz gibi, *P. aeruginosa*’nın, *S. aureus*’a göre daha kompleks ve daha etkin bir QS sistemine sahip olması, *P. aeruginosa*’nın ürünlerinin daha etkin bir role sahip olabileceğini de desteklemektedir.

KF hastalığında solunum yolu, epitel hücrelerindeki defekte bağlı sekresyon fonksiyonu bozukluğu ve mikrosiliyar yapıların kaybindan kaynaklı yoğun bir mukus tabakası ile kaplıdır. Bununla birlikte, KF'da solunum yollarında kolonize bakterilerin oluşturdukları biyofilm, ortamın daha fazla mukoid hal almasına ve hastalarda pulmoner alevlenmelerin sıklaşması ile kötü prognoza neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm, antimikrobiyal ajanlara yanıtızlığa da sebep olmakta ve sonuç olarak kronik enfeksiyon gelişimine neden olmaktadır. KF'da gelişen polimikrobiyal enfeksiyonlarda biyofilm üretiminin, bakteriler arasında görülen etkileşime bağlı olarak daha yoğun biçimde gerçekleştiği elde ettiğimiz verilerle desteklenmiştir.

Limoli ve ark. yaptıkları çalışmada, KF solunum yolu örneklerinden tek başına izole edilmiş ve *S. aureus* ile birlikte izole edilmiş *P. aeruginosa* kökenlerinin, standart *S. aureus* kökenlerinin üremesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuçlarında mono etken olarak izole edilmiş *P. aeruginosa* kökenlerinin, *S. aureus*'a karşı, birlikte izole edilen kökenlere göre daha rekabetçi olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca *S. aureus* üremesinde en az inhibisyona sebep olan kökenlerin, mukoid fenotipte olan ve yüksek düzeyde aljinat ekspresyonuna sahip izolatlar olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmanın moleküler incelemesinde, aljinat ifadesinin yüksek olduğu kökenlerde sideroforlar, rhamnolipidler ve HQNO gibi salgı moleküllerinin üretimini azaldığını göstermişlerdir. Bunu aljinatın üstte belirtilen moleküllerin ifadesini baskıladığından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. (Limoli ve ark., 2017).

Baldan ve ark. ise çalışmalarında KF hastalarının solunum yolunda erken ve geç dönem kolonizasyon yapan *P. aeruginosa* kökenlerinin, *S. aureus* üzerindeki üreme ve biyofilmdeki etkilerini karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, hastalığın başlangıç döneminde kolonizasyon yapan tüm klinik *P. aeruginosa* kökenlerinin, *S. aureus*'un üremesini yüksek düzeyde inhibisyona uğrattığını, geç evre kolonizasyondan soyutlanan kökenlerin ise ancak yarısının üremeyi baskılayabildiğini ve bu inhibisyon düzeyinin yüksek oranda olmadığını saptamışlardır. Biyofilm üretiminde, yeni kolonize olan kökenlerin herhangi bir negatif veya pozitif etki yaratmadığını, uzun süre kolonize kökenlerin ise biyofilm kütlesini azalttıkları belirlenmiştir (Baldan ve ark., 2014).

Woods ve ark. bu iki patojen arasındaki etkileşimleri incelerken, *S. aureus*'un erken dönem kolonizasyon yapmasından yola çıkarak, bakterinin 5 gün boyunca biyofilm üretmesine izin vermiş ve sonrasında aynı ortama *P. aeruginosa* inoküle ederek, biyofilm içerisindeki canlılık oranını incelemiştir. Bu iki patojenin ilk karşılaşma oranları, *S. aureus* için  $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>, *P. aeruginosa* için  $10^3$  cfu/cm<sup>2</sup> (1/250) olarak belirlenmiştir. Deneylerinde bu oranların 24. saatte eşitlendiğini, 48 saat sonra ise durumun tersine döndüğünü gözlemlemişlerdir. Beşinci günde *S. aureus*'un miktarının  $10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>'ye kadar gerilediğini, bu aşamadan sonra canlılığın tamamen ortadan kalkmadığını ve azalmanın durduğunu göstermişlerdir. Bu sonucun, bu iki patojenin sayısal bir denge oluşturmuş olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca 5 günlük birlikte inkübasyon sırasında *P. aeruginosa*'nın virülans genlerinin ekspresyonuna bakılmıştır. İlk üç günde, yani inhibisyonun en yüksek olduğu evrede, QS moleküllerini kodlayan *las* ve *rhl* genlerinin yüksek oranda eksprese edildiği, daha sonra ifadenin azaldığı belirlenmiş ve bu genlerin eksprese ettikleri proteinler ile bu baskılanma ilişkilendirilmiştir (Woods ve ark., 2018).

Mitchell ve ark. *P. aeruginosa*'nın HQNO kinolon sinyal molekülünün, *S. aureus*'un üreme ve biyofilm üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bunun için HQNO eksprese eden genleri susturulmuş ve aktif olan iki *P. aeruginosa* suşu kullanmışlardır. HQNO moleküllerinin *S. aureus*'un elektron transport zincirinde değişikliklere neden olarak bu patojeni oksijensiz solunuma zorladığını ve *S. aureus*'un fenotipik SCV (küçük koloni varyant *S. aureus*) koloniler oluşturduğunu ve üremesinin baskılandığını göstermişlerdir. Ayrıca HQNO varlığında, *S. aureus*'da sigma faktör B'nin aktive olduğunu, bu molekülün biyofilm ilişkili protein A ve *sarA* genini aktive ettiğini belirlemişlerdir. HQNO'nun hem üremeyi inhibe edebildiğini hemde biyofilm üretimini indükleyebildiğini çalışmalarıyla göstermişlerdir (Mitchell ve ark., 2010).

Biswas ve ark. *P. aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden piyosiyanın varlığında, *S. aureus*'daki üreme ve biyofilm üretimini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar *S. aureus*'un bu molekül varlığında SCV fenotipine dönmeye zorlandığını, üremesinin yavaşladığını ve yüksek miktarda biyofilm ürettiğini göstermiştir (Biswas ve ark., 2009).

Mashburn ve ark. çalışma hipotezini *P. aeruginosa*'nın kendi çoğalma ve metabolitlerinin üretiminde gerekli demir ihtiyacını karşılamak için *S. aureus*'u lizise uğratarak demir kaynağı olarak kullandığını öne sürerek oluşturmuşlardır.

Her iki patojenin birlikte ve monokültürdeki 16 saatlik inkübasyon sonrası üremelerini karşılaştırdıklarında, *S. aureus*'un monokültürde daha yoğun miktarda ürediğini, fakat *P. aeruginosa* ile birlikte inkübasyonunda daha düşük miktarda üreme gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca *P. aeruginosa*'nın her iki kültür ortamında siderofor proteinlerini kodlayan genlerinin ekspresyonunu incelediklerinde, monokültürde bu genlerin daha fazla eksprese olduğunu bildirmişlerdir (Mashburn ve ark., 2005).

Çalışmamızda antimikrobiyal duyarlılık ile ilişkili deneylerde, ilk basamakta *S. aureus*'un 24s SN varlığında *P. aeruginosa*'nın tobramisin duyarlılığındaki değişim değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre birlikte izole edilen köken ve standart kökene ait 24s SN ürünlerinin *P. aeruginosa* izolatlarında tobramisin MİK'leri üzerinde anlamlı bir değişim yapmadığı gözlenmiştir. Yalnız PSE 1082 kökeninde, her iki gruba ait ürünün varlığında da, tobramisin duyarlılığının arttığı (4 kat MİK değişimi) belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *P. aeruginosa*'nın tobramisine karşı duyarlılığının azalmasında sadece *S. aureus*'un QS moleküllerinin yeterli olmayacağını, bakterinin oluşturacağı biyofilm katmanının da direnç önemli ölçüde katkı sağlayabileceğini öngörmekteyiz.

Antimikrobiyal duyarlılık ile ilişkili deneylerin ikinci basamağında, *P. aeruginosa* 24s SN ürünlerinin *S. aureus* izolatlarının linezolid duyarlılığındaki etkileri belirlenmiştir. SA 1157 kökeni dışında tüm izolatlarda, hem birlikte izole edilmiş hem de standart kökene ait 24s SN varlığında linezolid MİK'lerinde 2 ile 32 kata varan artışlar saptanmıştır. SA 1157 kökeninde birlikte izole edilen kökene ait ürününün duyarlılık değişimine neden olmadığı, fakat standart kökene ait 24s SN varlığında linezolid MİK değerini 2 kat arttığı belirlenmiştir. EUCAST kriterlerine göre *S. aureus* izolatlarının linezolid sonuçlarını değerlendirdiğimizde (duyarlı kategori için MİK  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ), birlikte izole edilen *P. aeruginosa* 24s SN varlığında bir kökenin direnç sınırına (MİK 4  $\mu\text{g/mL}$ ), 6 kökenin ise dirençli kategoriye (8  $\mu\text{g/mL}$  -> 32  $\mu\text{g/mL}$ , MİK aralığında) geçtiği saptanmıştır. Ribozom üzerinde etkili bir ajan olan linezolid için saptanan bu belirgin MİK değişimlerinin, *P. aeruginosa* 24s SN içeriğindeki moleküllerin biyofilm artışını desteklemesinden kaynaklanacağı gibi, farklı moleküllerin linezolidin hücre içine girişini bloke edici ya da hücre içinden dışarı atılmasını destekleyici etkilerinden kaynaklı olabilir. Literatür taramasında daha önce bu ajan ile yapılmış benzer bir çalışma bulunamamıştır. Elde ettiğimiz sonuçların polimikrobiyal enfeksiyonlarda bu ajan için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

*S. aureus* izolatlarının tümü MİK sonuçlarına göre vankomisin için duyarlı saptanmış; 24s SN *P. aeruginosa* ürünleri varlığında yapılan vankomisin duyarlılık testinde ise MİK değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda ise *S. aureus*'ta vankomisin duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda, önce *S. aureus*'un biyofilm üretmesi sağlanmış, daha sonra *P. aeruginosa* süpernatantı eklenerek vankomisin duyarlılığı değerlendirmeye alınmıştır. Bu çalışmalar MİK değişimi yerine, biyofilm içerisindeki bakterinin canlılığındaki azalmayı değerlendirmiştir (Orazi ve O'Toole, 2017; Radlinski ve ark., 2017b).

Radlinski ve ark. üç farklı antimikrobiyal ajanın (tobramisin, vakomisin ve siprofloksasin), KF hastalarında gelişen enfeksiyonlar ve KF dışında yara enfeksiyonlarından izole ettikleri klinik *P. aeruginosa* süpernatantları ile HQNO, rhamnolipid ve elastaz ekspresyonu aktif ve inaktif mutant *P. aeruginosa* süpernatantları varlığında MRSA üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, klinik izolatlarda üç antimikrobiyal ajana karşı farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Mutant kökenler ile yaptıkları çalışmalarda, HQNO varlığının MRSA kökenlerini tobramisin etkisinden koruduğu saptanmıştır; elde ettikleri bu sonucun HQNO'nun *S. aureus*'un elektron transfer zincirinde değişikliklere neden olarak membran proton değişikliğine neden olduğunu, buna bağlı olarak tobramisinin bakteri yüzeyine bağlanamayarak hücre içerisine girememesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Ortamda rhamnolipid varlığının ise MRSA'nın membran geçirgenliğini artırarak, tobramisinin içeri girişini kolaylaştırması nedeniyle bu ajana karşı duyarlılığı artırıcı etki yarattığı sonucuna ulaşılmıştır. Elastazın MRSA'nın peptidoglikan yapısındaki pentaglisin çapraz köprüsünü yıkarak MRSA'ya karşı vankomisin ile sinerjistik bir etki sağladığını buna bağlı duyarlılık artışına neden olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, mutant kökenler ile yapılan bu çalışmanın sonucunda, polimikrobiyal enfeksiyonlarda *P. aeruginosa* kaynaklı ürünlerin tedavi sonucu üzerinde etkili olabileceğinin altını çizmişlerdir (Radlinski ve ark., 2017). Bu çalışma biyofilm içerisindeki bakterinin canlılık oranına göre değerlendirildiğinden, kendi çalışmamızla tam bir karşılaştırma yapılamasa da benzer sonuçların elde edildiği öngörülmüştür.

Beaudoin ve ark. *S. aureus* süpernatantı varlığında, *P. aeruginosa*'nın biyofilm artışı ile tobramisine karşı duyarlılığında değişimi araştırmışlardır. Çalışmalarında, KF solunum yolundan izole edilen ve kendi içlerinde aynı fenotipik özelliği gösteren 14 *P. aeruginosa*

kökene kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan kökenlerin izole edildiği hastalarda inhale tobramisinle tedavi yanıtında, 7'si başarılı iken 7'sinin başarısız olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalarında *S. aureus* ürünlerinin biyofilm üretimine herhangi bir etki göstermediği ve tobramisin duyarlılığında da bir değişiklik yaratmadığı sonucuna ulaşmışlardır (Beaudoin ve ark., 2017). Bu çalışma bizim verilerimiz ile karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa*'nın antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermesinde, ortamda *S. aureus*'un ürünlerinden çok, biyofilm üretmeye ihtiyaç duyduğu sonucu çıkarılmaktadır. Bu durum KF'da solunum yolunda *S. aureus*'un daha erken kolonizasyonu ve sonrasında *P. aeruginosa*'nın yerleşmesinin nedenlerinden birisi olarak düşünülebilir.

Orazi ve O'Toole çalışmalarında, tek başına biyofilm oluşturmuş *S. aureus* suşlarının, *P. aeruginosa*'nın HQNO, fanezin, elastaz ve siderofor salgılayan ve salgılamayan mutant suşlarının süpernatantları ve vankomisin varlığında, biyofilm içindeki bakteri canlılığının değişimini araştırmışlardır. HQNO ve siderofor salgılayan *P. aeruginosa* süpernatantlarının vankomisin varlığında, biyofilm içerisindeki canlı *S. aureus* miktarını yaklaşık 3 log artırdığını göstermişlerdir. *P. aeruginosa*'nın diğer molekülleri herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Orazi ve O'Toole, 2017). Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışma da, vankomisin duyarlılığındaki azalmanın doğrudan biyofilm kütlesi ile ilişkili olduğunu ve KF'da uzun dönemli *S. aureus* kolonizasyonuna ikincil patojen olarak *P. aeruginosa*'nın eklenmesi ile vankomisine karşı duyarlılığı azaltabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda KF hastalarında polimikrobiyal enfeksiyonlara neden olan *S. aureus* ve *P. aeruginosa* arasındaki etkileşimlerin, bu patojenlerin biyofilm üretimi, üremesi ve antimikrobiyal duyarlılıkları üzerinde önemli etkileri olduğu ve tüm bu süreçleri doğrudan ya da dolaylı olarak değiştirebildiği gösterilmiştir. Verilerimiz, KF hastalarında gelişen polimikrobiyal enfeksiyonlara klinik yaklaşımda bu faktörlerin göz önünde bulundurulması gerektiğinin altını çizmektedir.

## 6. KAYNAKÇA

Aires De Sousa, Marta, and Hermínia De Lencastre, Bridges from Hospitals to the Laboratory: Genetic Portraits of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2004; 40 (2): 101–11.

Akil Nour, and Marianne S. Muhlebach, Biology and Management of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Cystic Fibrosis, *Pediatric Pulmonology*, 2018; 53 (S3): S64–74.

Alhazmi Alaa, *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms, *International Journal of Biology*, 2015; 7 (2): 44–67.

Alvarez Susana, Claudia Herrero, Elena Bru, and Gabriela Perdigon, Effect of *Lactobacillus Casei* and Yogurt Administration on Prevention of *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Young Mice, *Journal of Food Protection*, 2001; 64(11): 1768-74.

Anzaudo M M, Busquets N P, Ronchi S, and Mayoral C, Isolated Pathogen Microorganisms in Respiratory Samples from Children with Cystic Fibrosis, *Revista Argentina de Microbiologia*, 2005; 37 (3): 129–34.

Baldan Rossella, Cristina Cigana, Francesca Testa, Irene Bianconi, Maura De Simone, Danilo Pellin, and others, Adaptation of *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of *Staphylococcus Aureus* In Vitro and Murine Models of Co-Infection, ed. by Nades Palaniyar, *PLoS ONE*, 2014; 9: e89614.

Beaudoin T., Yau Y. C. W., Stapleton P. J., Gong Y., Wang P. W., Guttman D. S., and others, *Staphylococcus Aureus* Interaction with *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Enhances Tobramycin Resistance, *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2017; 3: 25.

Bhagirath Anjali Y, Yanqi Li, Deepti Somayajula, Maryam Dadashi, Sara Badr, and Kangmin Duan, Cystic Fibrosis Lung Environment and *Pseudomonas Aeruginosa* Infection, *BMC Pulmonary Medicine*, 2016; 16: 174.

Bien Justyna, Olga Sokolova, and Przemyslaw Bozko, Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus Aureus* : Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response , *Journal of Pathogens*, 2011; 1–13.

Biswas Lalitha, Raja Biswas, Martin Schlag, Ralph Bertram, and Friedrich Götz, Small-Colony Variant Selection as a Survival Strategy for *Staphylococcus Aureus* in the Presence of *Pseudomonas Aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2009; 75: 6910–12.

Bjarnsholt Thomas, Peter Østrup Jensen, Tim Holm Jakobsen, Richard Phipps, Anne Kirstine Nielsen, Morten Theil Rybtke, and others, Quorum Sensing and Virulence of *Pseudomonas Aeruginosa* during Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients, *PLoS One*, 2010; 5: e10115.

De Boeck K, A Zolin, H Cuppens, H V Olesen, and L Viviani, The Relative Frequency of CFTR Mutation Classes in European Patients with Cystic Fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, 2014; 13: 403–9.

Brogden Kim A, Janet M Guthmiller, and Christopher E Taylor, Human Polymicrobial Infections, *Lancet*, 2005; 365: 253–55.

Chmiel James F., Timothy R. Aksamit, Sanjay H. Chotirmall, Elliott C. Dasenbrook, J. Stuart Elborn, John J. LiPuma, and others, Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis: I. The Microbiome, Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, Gram-Negative Bacteria, and Multiple Infections, *Annals of the American Thoracic Society*, 2014; 11: 1120–29.

Colin D A, I Mazurier, S Sire, and V Finck-Barbançon, Interaction of the Two Components of Leukocidin from *Staphylococcus Aureus* with Human Polymorphonuclear Leukocyte Membranes: Sequential Binding and Subsequent Activation., *Infection and Immunity*, 1994; 62: 3184–88.

Dasenbrook Elliott C., William Checkley, Christian A Merlo, Michael W Konstan, Noah Lechtzin, and Michael P Boyle, Association between Respiratory Tract Methicillin-Resistant

Staphylococcus Aureus and Survival in Cystic Fibrosis, JAMA - Journal of the American Medical Association, 2010; 303: 2386–93.

Davis P B, M Drumm, and M W Konstan, Cystic Fibrosis., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1996; 154: 1229–56.

Driscoll, James A, Steven L Brody, and Marin H Kollef, The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections, Drugs, 2007; 67 (3): 351-68.

Van Ewijk, Bart E, Marieke M Van Der Zalm, Tom F W Wolfs, and Cornelis K Van Der Ent, Viral Respiratory Infections in Cystic Fibrosis, Journal of Cystic Fibrosis, 2005; 4 (2): 31-6.

Filkins Laura M, and George A OToole, Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat., PLoS Pathogens, 2015; 11: e1005258.

Fodor Anthony A, Erich R Klem, Deirdre F Gilpin, J. Stuart Elborn, Richard C Boucher, Michael M Tunney, and others, The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations, PLoS ONE, 2012; 7 (9): e45001.

Foster Timothy J., Immune Evasion by Staphylococci, Nature Reviews Microbiology, 2005; 3: 948–58.

Goerke Christiane and Christiane Wolz, Adaptation of Staphylococcus Aureus to the Cystic Fibrosis Lung, International Journal of Medical Microbiology, 2010; 300: 520–25.

Haas Barbara, Jerome Kraut, John Marks, Susan Cassin Zanker, and Domenic Castignetti1, Siderophore Presence in Sputa of Cystic Fibrosis Patients, Infection and Immunity, 1991; 59(11): 3997-4000.

Harrison Freya, Microbial Ecology of the Cystic Fibrosis Lung, Microbiology, 2007; 153(Pt 4): 917-23.

Hensler T, M Koller, C Geoffroy, J E Alouf, and W König, Staphylococcus Aureus Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and Streptococcus Pyogenes Erythrogenic Toxin A Modulate

Inflammatory Mediator Release from Human Neutrophils, *Infection and Immunity*, 1993; 61(3): 1055-61.

Hibbing Michael E, Clay Fuqua, Matthew R Parsek, and S Brook Peterson, Bacterial Competition: Surviving and Thriving in the Microbial Jungle., *Nature Reviews. Microbiology*, 8 (2010), 15–25.

Hoffman Lucas R., Eric Déziel, David A. DArgenio, François Lépine, Julia Emerson, Sharon McNamara, and others, Selection for *Staphylococcus Aureus* Small-Colony Variants Due to Growth in the Presence of *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006; 103: 19890–95.

Hoffman Lucas R, David A. DArgenio, Michael J. MacCoss, Zhaoying Zhang, Roger A Jones, and Samuel I Miller, Aminoglycoside Antibiotics Induce Bacterial Biofilm Formation, *Nature*, 2005; 436: 1171–75.

Hoffman Lucas R, Eric Dé Ziel, David A Dargenio, Julia Emerson, Sharon Mcnamara, Ronald L Gibson, and others, Selection for *Staphylococcus Aureus* Small-Colony Variants Due to Growth in the Presence of *Pseudomonas Aeruginosa*, *PNAS*, 2006; 26;103(52):19890-5.

Hoiby N, Epidemiological Investigations of the Respiratory Tract Bacteriology in Patients with Cystic Fibrosis., *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology*, 1974; 82: 541–50.

Høiby N, B Frederiksen, and T Pressler, Eradication of Early *Pseudomonas Aeruginosa* Infection, *Journal of Cystic Fibrosis*, 2005; 2: 49-54.

Hooi Doreen S W, Barrie W Bycroft, Siri Ram Chhabra, Paul Williams, and David I Pritchard, Differential Immune Modulatory Activity of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum-Sensing Signal Molecules, *Infection and Immunity*, 2004; 72: 6463–70.

Hotterbeekx An, Samir Kumar-Singh, Herman Goossens, and Surbhi Malhotra-Kumar, In Vivo and In Vitro Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Spp.*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017; 7: 1–13.

Karatuna Onur, ve Ayşgöl Yağcı, *Pseudomonas Aeruginosa*da Virölans Faktörleri ve Quorum Sensing, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2008; 38 (1): 42–51.

Kipnis E, T Sawa, and J Wiener-Kronish, General Review Targeting Mechanisms of *Pseudomonas Aeruginosa* Pathogenesis Thérapeutiques Ciblant Les Mécanismes Pathogéniques de *Pseudomonas Aeruginosa*, *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2006; 36 (2): 78-91.

Kumar Shankar, Anand Tana, and Anu Shankar, Cystic Fibrosis — What Are the Prospects for a Cure?, *European Journal of Internal Medicine*, 2014, 25: 803–7.

Lau Gee W., Daniel J. Hassett, and Bradley E. Britigan, Modulation of Lung Epithelial Functions by *Pseudomonas Aeruginosa*, *Trends in Microbiology*, 2005; 13: 389–97.

Lau Gee W., Daniel J. Hassett, Huimin Ran, and Fansheng Kong, The Role of Pyocyanin in *Pseudomonas Aeruginosa* Infection, *Trends in Molecular Medicine*, 2004; 10(12): 599–606.

Limoli Dominique H, Gregory B Whitfield, Tomoe Kitao, Melissa L Ivey, Michael R Davis, Nora Grahl, and others, *Pseudomonas Aeruginosa* Alginate Overproduction Promotes Coexistence with *Staphylococcus Aureus* in a Model of Cystic Fibrosis Respiratory Infection, *MBio*, 2017; 8 (2). pii: e00186-17.

Lipuma John J, The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis, *Clinical microbiology Reviews*, 2010; 23: 299–323.

Lowy Franklin D., Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus Aureus*, *Journal of Clinical Investigation*, 2003; 111: 1265–73.

Lowy Franklin D, How *Staphylococcus Aureus* Adapts to Its Host, *New England Journal of Medicine*, 2011; 364: 1987–90.

Lyczak Jeffrey B, Carolyn L Cannon, and Gerald B Pier, Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15: 194–222.

Magalhães Andreia P, Susana P Lopes, and Maria O Pereira, Insights into Cystic Fibrosis Polymicrobial Consortia: The Role of Species Interactions in Biofilm Development, Phenotype, and Response to in-Use Antibiotics, *Frontiers in Microbiology*, 2016; 7: 2146.

Mashburn Lauren M, Amy M Jett, Darrin R Akins, and Marvin Whiteley, *Staphylococcus Aureus* Serves as an Iron Source for *Pseudomonas Aeruginosa* during In Vivo Coculture, *Journal of Bacteriology*, 2005; 187: 554–66.

Matsui Hirotoshi, Barbara R. Grubb, Robert Tarran, Scott H. Randell, John T. Gatz, C. William Davis, and others, Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease, *Cell*, 1998; 23; 95 (7): 1005-15.

May T B, D Shinabarger, R Maharaj, J Kato, L Chu, J D DeVault, and others, Alginate Synthesis by *Pseudomonas Aeruginosa*: A Key Pathogenic Factor in Chronic Pulmonary Infections of Cystic Fibrosis Patients., *Clinical Microbiology Reviews*, 1991; 4: 191–206.

McIlwaine M P, and A G Davidson, Airway Clearance Techniques in the Treatment of Cystic Fibrosis., *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 1996; 2: 447–51.

Meyer Jean-Marie, Alice Neely, Alain Stintzi, Claude Georges, Laboratoire De Microbiologie, and De Ge, Pyoverdine Is Essential for Virulence of *Pseudomonas Aeruginosa*, *Infection and Immunity*, 1996; 64: 518–23.

Michel-Briand Yvon, and Christine Baysse, The Pyocins of *Pseudomonas Aeruginosa*, *Biochimie*, 2002; 84 (5-6): 499-510.

Mitchell Gabriel, David Lalonde Séguin, Ann-Elise Asselin, Eric Déziel, André M Cantin, Eric H Frost, and others, *Staphylococcus Aureus* Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to *Pseudomonas Aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxide, *BMC Microbiology*, 2010; 10: 33.

Nguyen Angela T, and Amanda G Oglesby-Sherrouse, Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* during Co-Cultivations and Polymicrobial Infections, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016; 6141–48.

Osullivan Brian P, and Steven D Freedman, Cystic fibrosis, *Lancet*, 2009 ; 373 (9678): 1891-904.

O'Toole George A., Microtiter Dish Biofilm Formation Assay, *Journal of Visualized Experiments*, 2011; 10–11.

Orazi Giulia, and George A. O'Toole, *Pseudomonas Aeruginosa* Alters *Staphylococcus Aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection, *MBio*, 2017; 8: 1–17.

Petersen N. T., Høiby N., Mordhorst C. H., Lind K., Flensburg E. W. and Bruun B., Respiratory Infections in Cystic Fibrosis Patients Caused by Virus, Chlamydia and Mycoplasma–Possible Synergism with *Pseudomonas Aeruginosa*, *Acta Paediatrica*, 1981; 70: 623–28.

Pezzulo Alejandro A, Xiao Xiao Tang, Mark J Hoegger, Mahmoud H Abou Alaiwa, Shyam Ramachandran, Thomas O Moninger, and others, Reduced Airway Surface PH Impairs Bacterial Killing in the Porcine Cystic Fibrosis Lung, *Nature*, 2012; 109–13.

Pihet Marc, Jacqueline Carrere, Bernard Cimon, Dominique Chabasse, Laurence Delhaes, Françoise Symoens, and others, Occurrence and Relevance of Filamentous Fungi in Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis - A Review, *Medical Mycology*, 2009; 387–97.

Proctor Richard A., Christof von Eiff, Barbara C. Kahl, Karsten Becker, Peter McNamara, Mathias Herrmann, and others, Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections, *Nature Reviews Microbiology*, 2006; 4: 295–305.

Radlinski L, Rowe SE, Kartchner LB, Maile R, Cairns BA, Vitko NP, Gode CJ, Lachiewicz AM, Wolfgang MC, Conlon BP, *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*, *PLoS Biol*, 2017; 15(11): e2003981.

Raivio Tracy L, Donald E Woods, Claude V Gallant, Joan C Olson, and Douglas G Storey, *Pseudomonas Aeruginosa* Cystic Fibrosis Clinical Isolates Produce Exotoxin A with Altered ADP-Ribosyltransferase Activity and Cytotoxicity, *Microbiology*, 2015; 146: 1891–99.

Ramsey Bonnie W., *Management of Pulmonary Disease in Patients with Cystic Fibrosis*, ed. by Alastair J.J. Wood, *New England Journal of Medicine*, 1996; 335: 179–88.

Ren Clement L., Wayne J. Morgan, Michael W. Konstan, Michael S. Schechter, Jeffrey S. Wagener, Kathryn A. Fisher, and others, Presence of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* in Respiratory Cultures from Cystic Fibrosis Patients Is Associated with Lower Lung Function, *Pediatric Pulmonology*, 2007; 42: 513–18.

Renders Nicole, Henri Verbrugh, and Alex Van Belkum, Dynamics of Bacterial Colonisation in the Respiratory Tract of Patients with Cystic Fibrosis, *Infection, Genetics and Evolution*, 2001; 1(1): 29-39.

Riedel Kathrin, Morten Hentzer, Otto Geisenberger, Birgit Huber, Anette Steidle, Hong Wu, and others, N-Acylhomoserine-Lactone-Mediated Communication between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Burkholderia Cepacia* in Mixed Biofilms, *Microbiology*, 2001; 147 (PT 12): 3249-62.

Rogers G B, C A Hart, J R Mason, M Hughes, M J Walshaw, and K D Bruce, Bacterial Diversity in Cases of Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients: 16S Ribosomal DNA (RDNA) Length Heterogeneity PCR and 16S RDNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling, *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41: 3548–58.

Rogers Geraint B, Franziska A Stressmann, Alan W Walker, Mary P Carroll, and Kenneth D Bruce, Lung Infections in Cystic Fibrosis: Deriving Clinical Insight from Microbial Complexity, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2010; 10: 187–96.

Sadikot Ruxana T, Timothy S Blackwell, John W Christman, and Alice S Prince, Pathogen-Host Interactions in *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005; 1209–23.

Sherrard Laura J., Michael M. Tunney, and J. Stuart Elborn, Antimicrobial Resistance in the Respiratory Microbiota of People with Cystic Fibrosis, *The Lancet*, 2014; 384: 703–13.

Sibley Christopher D., Harvey Rabin, and Michael G. Surette, Cystic Fibrosis: A Polymicrobial Infectious Disease., *Future Microbiology*, 2006; 1: 53–61.

Smith H., The Role of Microbial Interactions in Infectious Disease, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1982; 297: 551–61.

Stone Anne, and Lisa Saiman, Update on the Epidemiology and Management of *Staphylococcus Aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, in Patients with Cystic Fibrosis, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2007; 13 (6): 515–21.

Szamosvári Dávid, and Thomas Böttcher, An Unsaturated Quinolone N-Oxide of *Pseudomonas Aeruginosa* Modulates Growth and Virulence of *Staphylococcus Aureus*, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2017; 56 (25): 7271–75.

Toyofuku Masanori, and Sang-Sun Yoon, Nitric Oxide, an Old Molecule With Noble Functions in *Pseudomonas Aeruginosa* Biology, *Advances in Microbial Physiology*, 2018; 72: 117–45.

Wahab A. A., Janahi I A, Marafia M M, and El-Shafie S, Microbiological Identification in Cystic Fibrosis Patients with CFTR I1234V Mutation, *Journal of Tropical Pediatrics*, 2004; 50 (4): 229–33.

Windmüller Nadine, Anika Witten, Desirée Block, Boyke Bunk, Cathrin Spröer, Barbara C Kahl, and others, Transcriptional Adaptations during Long-Term Persistence of *Staphylococcus Aureus* in the Airways of a Cystic Fibrosis Patient, *International Journal of Medical Microbiology*, 2015; 305 (1): 38-46.

Woods Paul W, Zane M Haynes, Elin G Mina, and Cláudia N H Marques, Maintenance of *S. Aureus* in Co-Culture With *P. Aeruginosa* While Growing as Biofilms., *Frontiers in Microbiology*, 2018; 9: 3291.

Worlitzsch Dieter, Robert Tarran, Martina Ulrich, Ute Schwab, Aynur Cekici, Keith C. Meyer, and others, Effects of Reduced Mucus Oxygen Concentration in Airway *Pseudomonas* Infections of Cystic Fibrosis Patients, *Journal of Clinical Investigation*, 2002; 109 (3): 317-25.

Wu Weihui, Yongxin Jin, Fang Bai, and Shouguang Jin, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Molecular Medical Microbiology*, 2015; 753–67.



## EKLER

### EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Etik Kurulu

**PROJENİN ADI :** Kistik Fibroz Hastalarında Saptanan Polimikrobiyal Enfeksiyon Etkenleri Arasındaki Etkileşimlerin Araştırılması

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Burak AKSU

**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR :** Mehmet Mücahit GÜNCÜ

**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI:** 02.04.2018-105

**Sayın; Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Burak AKSU**

105 protokol nolu “Kistik Fibroz Hastalarında Saptanan Polimikrobiyal Enfeksiyon Etkenleri Arasındaki Etkileşimlerin Araştırılması” isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Komisyon Başkanı

Doç.Dr. Pınar MEGA TİBER

Prof. Dr. Dilşad SAVE

Prof.Dr. Hülya AŞCI

Prof.Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Prof.Dr. Nefise BAHÇECİK

Prof.Dr. Hakkı ARIKAN

Doç.Dr. Oya ORUN

Doç.Dr. Gürkan SERT

Doç.Dr. İlksen DEMİRBÜKEN

Doç.Dr. M. Ümit UĞURLU

Doç.Dr. Betül OKUYAN

Av. Funda IŞIK ÖZCAN



Marmara Üniversitesi Göztepe  
Kampüsü Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü 34688 Kadıköy /  
İSTANBUL

0 (216) 414 44 23/12 (Faks)  
0 (216) 414 44 23

[saglik.ogrenci@marmara.edu.tr](mailto:saglik.ogrenci@marmara.edu.tr)  
<http://saglik.marmara.edu.tr>

Ayrıntılı bilgi için:  
Süleyman  
TÜRKMEÑOĞLU

were tested for their biofilm-forming capacity as monocultures and in bacterial coculture with confirmed non-biofilm producing strain of *Lactobacillus*, in a ratio of 1:1. The ability to form biofilm was investigated using the microtiter plate assay, a standard test for detection of biofilm production. As part of this assay biofilm biomass quantification was done with crystal violet assay and the isolates were classified as: non-biofilm producers, weak-, moderate- and strong-biofilm producers.

## Results and conclusion

*Lactobacillus* strain in our study was capable of interfering with the growth of *G. vaginalis* biofilms to different degrees.

According to the criteria for biofilm-forming ability, after 24-h incubation of the monocultures 25%, 27%, 22% and 25% of *Gardnerella* strains were strong, intermediate, and negative biofilm producers, while in cocultures of *Gardnerella* and *Lactobacillus* the percentages were 5.5%, 13.8 %, 19% and 47%, respectively.

Our results indicate the potential of lactobacilli as probiotics, since they effectively reduced the adhesion and biofilm formation of the tested *Gardnerella* species which is a well-known and desired effect of strains for potential vaginal probiotic application. The elucidation of the antagonistic mechanisms as well as their effect on human cells may be useful in providing insight into the clinical situation in which probiotic and indigenous vaginal lactobacilli interfere with *Gardnerella's* presence and reduce the risk of bacterial vaginosis and enlighten the importance of development of new products containing such microorganisms or products secreted by them.

## MB3 EFFECTS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ON GROWTH AND BIOFILM PRODUCTION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CO-ISOLATED FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

M. Mucahit Guncu, B. Aksu

Marmara University, School of Medicine, Dept. Medical Microbiology, Istanbul TURKEY

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is an important pathogen which colonizes and infects respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients. This bacterium can be also co-existed with *Pseudomonas aeruginosa* in later periods of the disease. Both pathogens produce various virulence factors including exotoxins, enzymes and cell wall proteins.

## OBJECTIVES

We aimed to characterize dual-species interaction by exploring whether *P. aeruginosa* influences the growth and biofilm production of co-isolated methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from sputum

samples of CF patients.

#### MATERIAL, METHODS

Experiments were performed with 11 couples of MRSA and *P. aeruginosa* isolates from sputa of CF patients. Each MRSA isolate was grown in monoculture or in culture supplemented (1:1 volume) with 8h and 24h culture supernatants, heat-killed whole cells, and cell lysates of co-isolated *P. aeruginosa* in Luria-Bertani medium in microplates. Bacterial growth was determined by optical density measurements (OD600) at selected time points (4h, 8h, 12h, and 24 h). Biofilm production was measured using the crystal violet assay after 48h incubation at 37°C.

#### RESULTS AND CONCLUSION

Growth of MRSA isolates was increased by 8h culture supernatants of *P. aeruginosa* (mean growth was increased 15.4%  $\pm$  8.5SD) and inhibited by heat-killed whole cells of *P. aeruginosa* (mean growth reduction was -30.3%  $\pm$  31.4SD). Biofilm formation by MRSA strains at 48h was increased with the presence of 8h and 24h culture supernatants, cell lysates and heat killed cells of co-isolated *P. aeruginosa*; the corresponding biofilm mass increment rates in comparison to monoculture were 293%, 240%, 203% and 152%.

Our results highlighted that 8h culture supernatants of *P. aeruginosa* strains had an inducible effect on the growth of MRSA. All culture supplements prepared from *P. aeruginosa* were exhibited a positive effect on the biofilm production of MRSA. We suggest that our findings may facilitate the understanding of inter- and intraspecies bacterial interactions in CF.

#### MB4 СЕКСУАЛНО ПРЕНОСЛИВИ ИНФЕКЦИИ КАКО ГОЛЕМ ГЛОБАЛЕН ЗДРАВСТВЕН ПРОБЛЕМ

**В. Марковски**

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип,  
Р. Македонија

Повеќе од 30 различни бактерии, вируси и паразити предизвикуваат сексуално преносливи инфекции, се пренесуваат преку сексуален контакт, вклучувајќи вагинален, анален и орален секс. Осум од триесет познати патогени сè со најголема инциденца. Од овие осум инфекции, успешно можат да се лекуваат четири: сифилис, гонореја, хламидија и трихомонијаза. Другите четири: хепатитис Б, херпес, ХИВ и ХПВ се вирусни инфекции и како такви сè уште се неизлечиви, но може да се ублажат или да се модулира нивниот тек.

СПИ сепуште се игнорирани иако се еден од најголемите проблеми на



# Uluslararası International XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi Turkish Microbiology Congress



Uluslararası 10. Moleküler ve  
Tıbbi Mikrobiyoloji Kongresi  
Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Starlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım November 2018

SÖZEL BİLDİRİLER



International Symposium on  
Migration, Travel & Infection  
Turkish Society of Microbiology  
Turkish Society for Parasitology



**Keywords:** Burkholderia spp, Molecular identification, Multilocus sequence typing,

akış şeması

SS-119

## KARBAPENEMAZ ÜRETEK KLEBSIELLA SPP. SUŞLARINDA OXA-48-BENZERİ GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Elmas Pınar Kahraman<sup>1</sup>, Hande Toptan<sup>1</sup>, Barış Otlu<sup>2</sup>, Mehmet Koroğlu<sup>1</sup>, Mustafa Altındış<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

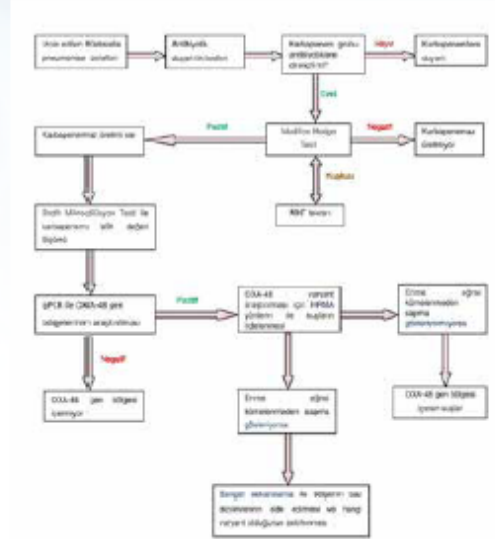
**Amaç:** Son yıllarda karbapeneme dirençli Enterobacteriaceae izolatlarının dünya genelinde giderek arttığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten Klebsiella pneumoniae izolatlarında OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerini tespit etmektir.

**Yöntem:** Çalışmamız için kullanılan izolatlar, SEAH Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınmıştır. Identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık analizleri VITEK 2 otomatize sistemi ile değerlendirilmiştir. Karbapeneme dirençli olan izolatların karbapenemaz üretileri Modifiye Hodge Testi ile saptanmıştır. Her bir suşa ait MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra bu izolatlardan, Real time PCR (qPCR) yöntemi ile OXA-48 gen bölgesini içerenler tespit edilmiştir. Sonrasında High Resolution Melting Analysis (HRMA) yöntemi ile OXA-48 varyantları olduğundan şüphelenilen suşlar hangi varyant olduğunu tespit etmek için Sanger dizi analizi yöntemi ile irdelenmiştir.

**Bulgular:** Karbapenemaz üreten K. pneumoniae suşlarında imipenem için VITEK 2 ve mikrodilüsyon yöntemi arasında %82, meropenem için %77, ertapenem için %90 uyum saptanmıştır. qPCR yöntemi ile 100 K. pneumoniae suşunun 45 tanesinde OXA-48 gen bölgesi pozitif olarak tespit edilmiştir. OXA-48 varyantlarını belirlemek için PCR ile pozitif bulunan 45 suş HRMA metodu ile yorumlanmıştır. Sonrasında dizi analizi ile 41 suşun OXA-48/OXA-245 gen bölgelerini içerdiği, 2 suşun OXA-181 ve 2 suşun da OXA-244 gen bölgelerini içerdiği tespit edilmiştir.

**Sonuçlar:** Çalışmamız sonucunda OXA-48 pozitifliği %45 olarak bulunmuştur. Bu suşların da %4.4'ünün OXA-181, %4.4'ünün de OXA-244 bölgelerini içerdiği bulunmuştur. Ülkemizde OXA-48 varyantlarının geniş kapsamlı olarak irdelendiği ilk çalışma olması, epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlaması, karbapenemaz tespiti ile ilgili yerli tanı kitlerinin yapımına zemin oluşturmaya, kliniklere doğru ve etkin sonuçların iletilmesi nedeniyle çalışmamız önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** OXA-48 benzeri gen bölgesi, karbapenemaz, Klebsiella pneumoniae, high resolution melting analysis, tek nükleotid polimorfizmi



SS-120

## KİSTİK FİBROZ HASTALARINDA SAPTANAN POLİMİKROBİYAL ENFEKSİYON ETKENLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI - ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞINDA DEĞİŞİM

Mehmet Mücahit Güncü<sup>1</sup>, Burak Aksu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

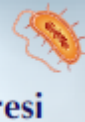
<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

**Amaç:** Bakterilerin "çoğunluk algılama" (quorum sensing) sistemleri aracılığıyla gerek kendi türleri içinde, gerekse diğer cins bakterileri ile iletişim kurabildikleri ve böylece çeşitli fizyolojik süreçleri ve virulans özelliklerini düzenledikleri saptanmıştır. Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) ve Pseudomonas aeruginosa kistik fibroz (KF) hastalarının solunum yollarında kolonizasyon yapan ve enfeksiyonlara neden olan başlıca patojenlerdir. Bu iki patojenin KF akciğerinde bir arada olması, akciğer fonksiyonlarında bozulma, daha yüksek morbidite ve daha kötü prognoz ile karakterizedir. Gram pozitif bakterilere karşı güçlü etkili antibiyotikler olan linezolid ve vankomisin, KF hastalarında gelişen MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın kullanılmaktadır. Bu çalışmada KF hastalarının alt solunum yolu örneklerinden izole edilen Paeruginosa kökenlerinin, beraber izole edilen MRSA kökenlerinin linezolid ve vankomisin duyarlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

**Yöntem:** Çalışmamızda KF hastalarının alt solunum yolu örneklerinden birlikte izole edilmiş 9 çift Paeruginosa ve MRSA kökeni kulla-



# Uluslararası International XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Turkish Microbiology Congress



Uluslararası 10. Mikrobiyoloji ve  
Tıbbi Mikrobiyoloji Kongresi  
Ankara Mikrobiyoloji Derneği

Starlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım  
November 2018

## SÖZEL BİLDİRİLER



International Symposium on  
Migration, Travel & Infection  
Turkish Society of Microbiology  
Turkish Society for Parasitology



nıldı. Klinik Paeruginosa izolatları ve standart suş (ATCC27853) Luria Bertani besiyerinde 37°C'de 24 saat üretilerek kültür süpernatantları toplandı. Klinik MRSA izolatlarının linezolid ve vankomisin duyarlılığı, birlikte izole edilmiş Paeruginosa izolatlarına ait süpernatantların varlığında ve yokluğunda, sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak test edildi. Sonuçlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi.

**Bulgular:** MRSA izolatlarına ait linezolid ve vankomisin duyarlılık sonuçları Tablo'da gösterilmiştir.

**Sonuçlar:** Klinik MRSA izolatlarının linezolid MK değeri 2 mg/L olarak belirlendi ve EUCAST kriterlerine göre duyarlı olarak tanımlandı. Paeruginosa ATCC27853 süpernatantının varlığında linezolid MK değerleri 4->32 mg/L aralığında; birlikte izole edilmiş klinik Paeruginosa izolatlarına ait süpernatantların varlığında da yine 4->32 mg/L arasında saptandı. Tek bir MRSA izolatında ise değişim saptanmadı. MRSA izolatlarının vankomisin MK değerleri 1-2 mg/L aralığında saptandı ve tümü duyarlı olarak tanımlandı. Paeruginosa süpernatantlarının eklenmesi, hiçbir izolatta vankomisin MK değerini belirgin değiştirmeydi. Çalışmamızda Paeruginosa'nın kültür süpernatantının varlığında MRSA izolatlarının linezolid duyarlılığında önemli değişim olduğu (2-32 kat MK artışı) saptanmıştır. Bulgularımız, polimikrobiyal enfeksiyonlarda patojenler arası etkileşimin antibiyotik duyarlılığını değiştirebileceğini desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kistik Fibroz, MRSA, Polimikrobiyal Enfeksiyon, Pseudomonas aeruginosa

**Tablo. Klinik MRSA izolatlarına ait linezolid ve vankomisin duyarlılık sonuçları ve MK değeri değişimleri**

| MRSA izolat No      | Linezolid MK mg/L | Linezolid MK (Pa-Bert) Pa ATCC-27853 mg/L | Linezolid MK değeri (x kat) | Vankomisin MK mg/L | Vankomisin MK (Pa-Bert) Pa ATCC-27853 mg/L | Vankomisin MK değeri (x kat) |
|---------------------|-------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------------------------|------------------------------|
| SA-1073             | 2                 | 8 / 4                                     | x4 / x2                     | 1                  | 2 / 1                                      | x2 / -                       |
| SA-063              | 2                 | 4 / 8                                     | x2 / x4                     | 2                  | 2 / 1                                      | -                            |
| SA-1210             | 2                 | >32 / 4                                   | >x64 / x2                   | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| SA-716              | 2                 | 16 / >32                                  | x8 / >x32                   | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| SA-1314             | 2                 | 0 / 32                                    | x4 / x16                    | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| SA-1157             | 2                 | 2 / 4                                     | - / x2                      | 1                  | 2 / 1                                      | x2 / -                       |
| SA-254              | 2                 | >32 / 32                                  | >x16 / x16                  | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| SA-028              | 2                 | 8 / 8                                     | x4 / x4                     | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| SA-055              | 2                 | 10 / 8                                    | x16 / x4                    | 1                  | 1 / 1                                      | -                            |
| S aureus ATCC 29213 | 1                 | -                                         | -                           | 1                  | -                                          | -                            |

\* Pa-Bert: Klinik Paeruginosa süpernatant eklenmesi

\* PaATCC-122: Paeruginosa ATCC 27853 süpernatant eklenmesi

SS-121

## PERİTONİT ETKENİ OLARAK NADİR İZOLE EDİLEN PSEUDOMONAS STUTZERİ OLGUSU

**Sultan Gülbahçe Orhan<sup>1</sup>, Ömmühan Taşyürek<sup>1</sup>, Mıhrıban Yücel<sup>1</sup>, Serap Yağcı<sup>1</sup>, Semahat Karahisar Şıralı<sup>2</sup>, Bedia Dinç<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nefroloji Kliniği, Ankara

Pseudomonas stutzeri suda, toprakta, hastane ortamında bulunabilen gram negatif, hareketli, nonfermenter, saprofit bir basildir. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde nadiren de olsa bakteriyemi, peritonit, menenjit, septik artrit, travmatik yara yeri enfeksiyonu, vertebral osteomyelit etkeni olarak bildirilmiştir.

**Olgu:** 64 yaşında kadın hasta iki gündür devam eden şiddetli karın ağrısı yakınması ile Acil Servise başvurmuştur. Hastanın bilinen diabeti, hipertansiyonu, kronik böbrek yetmezliği mevcuttur ve 10 yıldır hemodiyaliz tedavisi almaktadır. Başvurudan iki ay önce periferik damar yolu problemi sebebiyle sürekli ayakta periton diyalizi (SAPD) uygulanmaya başlanan hastanın muayenesinde karında yaygın hassasiyet gözlenmiştir. Lökosit (6810/μL, %86 PMNL) ve C reaktif protein (187 mg/L) yüksekliği saptanan hastanın tüm batin ultrasonografisinde peritonda serbest sıvı izlenmiştir. Peritonit ön tanısıyla alınan periton sıvısı örneği kültür ve hücre sayımı için laboratuvarımıza gönderilmiştir.

**Bulgular:** Mikroskopik incelemede 1600/mm<sup>3</sup> lökosit (%100 PMNL) saptanan örnek %5 koyun kanlı, EMB ve çikolata agara ekildi. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrası EMB agarda üreme olmazken, %5 koyun kanlı agar ve çikolata agarda taba-kahverengi, kuru, kabarcıklı, kenarları düzensiz, agara yapışık koloniler ve ekim alanının son kısmında aynı renkte fakat daha düzgün kenarlı, agardan ayrılabilen S koloniler üretti. Her iki koloninin gram boyamadaki morfolojileri gram negatif basil olup oksidaz testleri pozitif. İnkübasyon süresi uzadıkça koloni morfolojilerinin R forma döndüğünün gözlenmesi üzerine iki koloninin birbirinin varyasyonu olduğu düşünüldü. İzolatın VITEK 2 sistem (bioMérieux, Fransa) ile tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışıldı; mikroorganizma Pseudomonas stutzeri olarak tanımlandı. MALDI-TOF MS (BioMérieux, Fransa) ile de bakterinin Pseudomonas stutzeri olduğu doğrulandı. Duyarlılık test sonuçları EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi. İzolatın Piperasilin Tazobaktam, Meropenem, Amikasin, Gentamisin ve Kolistine duyarlı; Sefepim ve Siprofloksasine orta duyarlı, Seftazidime dirençli olduğu saptandı. Bu sonuçlarla hastanın ampirik başlanan Sefazolin tedavisi sonlandırıldı ve Gentamisin tedavisine başlandı. Tedavi sonrası periton kültürlerinde üreme olmadı.

**Sonuç:** Etken mikroorganizmanın tanımlanması, antibiyotik seçimi ve SAPD peritonitinin yönetiminde bir tedavi stratejisinin belirlenmesi için önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** pseudomonas stutzeri, peritonit, bakteriyoloji

## EK-3 ÖZGEÇMİŞ

### ÖZGEÇMİŞ

|                   |                   |                     |                 |
|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|
| <b>Adı</b>        | Mehmet Mücahit    | <b>Soyadı</b>       | Güncü           |
| <b>Doğum Yeri</b> | Besni             | <b>Doğum Tarihi</b> | 1981            |
| <b>Uyruğu</b>     | TC                | <b>Tel</b>          | 0 530 702 90 87 |
| <b>E-mail</b>     | mmguncu@gmail.com |                     |                 |

#### Eğitim Düzeyi

|                         | Mezun Olduğu Kurumun Adı                          | Mezuniyet Yılı |
|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------|
| <b>Doktora/Uzmanlık</b> | -                                                 |                |
| <b>Yüksek Lisans</b>    | Marmara Üniversitesi/ Mikrobiyoloji Anabilim Dalı | 2019           |
| <b>Lisans</b>           | Fatih Üniversitesi/ Fen Fakültesi/ Biyoloji       | 2012           |
| <b>Lise</b>             | Keçiören Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesi         | 1999           |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| İngilizce       | İyi               | İyi      | İyi    |

| Yabancı Dil Sınav Notu # |         |       |           |           |           |     |     |     |
|--------------------------|---------|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| YDS                      | Yök-Dil | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
|                          | 67.5    |       |           |           |           |     |     |     |

|                   | Sayısal  | Eşit Ağırlık | Sözel    |
|-------------------|----------|--------------|----------|
| <b>ALES Puanı</b> | 64,19406 | 61,35529     | 63,72181 |

#### Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|---------|-------------------|
| İyi     | İyi               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.