



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KLİNİK *STENOTROPHOMONAS*
MALTOPHILIA KÖKENLERİNİN
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI,
GENOTİPİK PROFİLLERİ VE BİYOFİLM
OLUŞTURMA YETENEKLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Serhat YALÇINKAYA

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mart 2019

İzmir

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KLİNİK *STENOTROPHOMONAS*
MALTOPHILIA KÖKENLERİNİN
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI,
GENOTİPİK PROFİLLERİ VE BİYOFİLM
OLUŞTURMA YETENEKLERİ**

Serhat YALÇINKAYA

Danışman
Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Mart 2019
İzmir

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı : Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji

Program :Yüksek Lisans

Tez Konusu : Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları, Genotipik Profilleri ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

Danışman : Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ

Tezi Hazırlayan : Serhat YALÇINKAYA

Değerlendirme Kurulu Üyeleri :

Adı Soyadı :

Başkan(Danışman) : Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ

Üye / İmza : Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN

Üye / İmza : Prof. Dr. Mehmet Emin LİMONCU

Üye / İmza :

Üye / İmza :

Tezin Kabul Edildiği Tarih : 08.03.2019

Önsöz

Yapılan literatür analizi sonucunda bölgemizde *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. vb. gibi hastane enfeksiyonlarına yol açan pek çok gram-negatif mikroorganizma ile ilgili ayrıntılı çalışmalar bulunduğu halde, *S. maltophilia* ile ilgili olarak biyofilm oluşturma kapasitesi gibi virulans özelliklerini, direnç profilini ve genotipleme çalışmalarını da içeren araştırma sayısının çok olmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın bölgemizden izole edilen *S. maltophilia*'nın direnç profili, özellikle dirençli kökenlerin hastane ortamında yayılımı, epidemiyolojisi ve virulans özellikleri hakkında önemli bir veri kaynağı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca hastane enfeksiyonuna yol açan diğer dirençli mikroorganizmalar arasında fark edilmeyerek potansiyel tehlike oluşturan *S. maltophilia*'nın yeri ve önemi konusunda fikir vereceğinden sağlık personeli tarafından uygulanacak tedavi ve alınması gereken önlemler bakımından da yol gösterici olması beklenmektedir.

İzmir-2019

Serhat YALÇINKAYA

Özet

Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları, Genotipik Profilleri ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri

Nonfermentatif, gram-negatif basil, *Stenotrophomonas maltophilia* sıklıkla solunum sistemi, üriner sistem ve yara infeksiyonlarından izole edilen fırsatçı bir patojendir. Genellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde salgınlara yol açan *S. maltophilia*, biyofilm oluşturma yeteneği ve birçok antibiyotiğe doğal dirençli olma gibi özelliklerinin bir sonucu olarak tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SXT) ilk seçenek olmaktadır. Fakat son yıllarda az da olsa bu antibiyotiğe karşı gelişen direnç, diğer tedavi seçeneklerinin veya yeni antibiyotiklerin araştırılması konusunu gündeme getirmiştir. Bu çalışmada *S. maltophilia* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, genotipik dağılımı ve biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, rutin olarak test edilmiş en az bir antibiyotiğe karşı orta duyarlı veya dirençli bulunan 13 klinik *S. maltophilia* izolatı değerlendirildi. İzolatlar, 2015 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edildi. Bu izolatların siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LEV) ve moksifloksasin (MOK) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemiyle, biyofilm oluşturma yeteneği kristal viyole yöntemi ile araştırıldı. İzolatlar ayrıca M13 universal primerleri ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucunda moleküler olarak tiplendirildi.

Mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre CIP, LEV ve MOK için sırasıyla minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) aralıkları; 2-32 µg/ml, 0,5-16 µg/ml ve < 0,125-8 µg/ml, MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri; 4-16 µg/ml; 2-8 µg/ml ve 0,125-4 µg/ml olarak bulundu. Kristal viyole testinin verilerine göre, 13 izolattan ikisinin orta düzey diğerlerinin güçlü biyofilm oluşturduğu tespit edildi. Moleküler tiplendirme sonucunda klonal yakınlığı olan üç temel grup ve alt gruplar tespit edildi. Ancak bu gruplar arasında antibiyotik duyarlılıkları ve biyofilm oluşturma özelliklerine göre sınıflama yapabilmeyi kolaylaştırabilecek ortak veya ayırt edici bir profil gözlenmedi. Bu çalışmadaki duyarlılık ile ilgili bulgular ve *S. maltophilia*

izolatlarının yüksek düzey biyofilm oluşturma eğilimi olduğuna dair veriler Avrupa'da ve T¼rkiye'de yapılan diğer alışmalardakilere benzemektedir. Sonuç olarak bu çalışmanın, *S. maltophilia*'nin direnç profili, yayılımı, epidemiyolojisi ve virulans özellikleri konusunda önemli bir veri kaynağı olacağı d¼ř¼n¼lmektedir. Hastanedeki salgınların önlenmesi için nozokomiyal fırsatçı patojenlerin varlığı araştırılırken *S. maltophilia*'nin da etken olabileceği d¼ř¼n¼lmelidir. *S. maltophilia* ile ilgili epidemiyoloji, virulans faktörleri ve direnç mekanizmaları konusundaki alışmalar desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: *Stenotrophomonas maltophilia*; biyofilm; antibiyotik direnci; molek¼ler tiplendirme



Abstract

Antibiotic Susceptibilities, Genotype Profiles and Biofilm Forming Abilities of Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Strains

Nonfermentative, gram-negative bacilli *Stenotrophomonas maltophilia* is an opportunistic pathogen that is often isolated from respiratory system, urinary tract and wound infections. *S. maltophilia*, which usually leads to outbreaks in the intensive care units of hospitals, causes refractory infections as a result of its ability to form biofilms and natural resistance to many antibiotics. Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT) is the first choice for the treatment of *S. maltophilia* infections. However, in recent years, the resistance against this antibiotic has been raised slightly, and other treatment options or new antibiotics have been investigated. The aim of this study is to investigate and evaluate the antibiotic susceptibility, genotypic distribution and biofilm forming capacity of *S. maltophilia* isolates.

In this study, 13 clinical *S. maltophilia* isolates which found to be intermediate susceptible or resistant to at least one antibiotic routinely tested were evaluated. The isolates were obtained from the Ege University Faculty of Medicine Medical Microbiology Department Bacteriology Laboratory culture collection in 2015. The susceptibility of these isolates to ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LEV) and moxifloxacin (MOK) antibiotics were investigated by microdilution method and the ability of biofilm formation was investigated by crystal violet method. The isolates were also molecularly typed by polymerase chain reaction (PCR) performed with M13 universal primers.

According to the microdilution test results, CIP, LEV and MOK minimum inhibition concentration (MIC) ranges were found to be 2-32 µg/ml, 0,5-16 µg/ml, < 0,125-8 µg/ml, and the MIC₅₀/MIC₉₀ values were found to be 4-16 µg/ml; 2-8 µg/ml and 0,125-4 µg/ml, respectively. According to the data from the crystal violet test, two of the 13 isolates were determined as medium-level and the others strong-level biofilm producers. Molecular typing revealed three main groups and subgroups with clonally related. However, no common or distinctive profile was observed to facilitate classification according to the antibiotic susceptibility and biofilm formation characteristics of these groups. These findings regarding the sensitivity of the studies and data that isolates of *S. maltophilia* tend to generate high levels of biofilms

resemble those in other studies conducted in Europe and Turkey. In conclusion, this study is thought to be an important source of data on resistance profile, spread, epidemiology and virulence properties of *S. maltophilia*. While investigating the presence of nosocomial opportunistic pathogens to prevent outbreaks in the hospital, it should be thought that *S. maltophilia* may also be a causative agent. Studies on epidemiology, virulence factors and resistance mechanisms related to *S. maltophilia* should be supported.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*; biofilm; antibiotic resistance; molecular typing



İçindekiler

Önsöz	I
Özet	II
Abstract	IV
İçindekiler	VI
Tablolar Dizini	VII
Şekiller Dizini	VIII
Kısaltma Listesi.....	IX
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
2.2. <i>S. maltophilia</i> enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotikler.....	4
2.3. Biyofilm oluşumu.....	5
2.4. Moleküler tiplendirme	5
3. Gereç ve Yöntem.....	6
3.1. Gereç	6
3.1.1. Bakteriler, identifikasyon ve rutin antibiyotik duyarlılık testleri	6
3.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen antibiyotikler ve stok solüsyonları	6
3.1.3. Malzemeler, kimyasallar, besiyerleri ve çözeltiler.....	7
3.1.4. Moleküler Tiplendirmede Kullanılan Madde ve Malzemeler	8
3.2. Yöntem	9
3.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemi	9
3.2.2. Moleküler Tiplendirme.....	10
3.2.3. Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi	12
4. Bulgular.....	13
5. Tartışma.....	16
6. Sonuç ve Öneriler.....	21
7. Kaynaklar	22
Ekler	27
Teşekkür.....	28
Özgeçmiş.....	29

Tablolar Dizini

Tablo 1. CLSI (2015) kriterlerine göre antibiyotiklerin duyarlılık ve direnç sınır değerleri.....	6
Tablo 2. <i>S. maltophilia</i> izolatlarının rutin testlerle belirlenen direnç profili, mikrodilüsyon testi ile belirlenen duyarlılıkları ve biyofilm oluşturma düzeyleri	14



Şekiller Dizini

Şekil 1. Mikrodilüsyon testi.	10
Şekil 2. Kristal viyole yöntemi ile kökenlerin biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi.....	12
Şekil 3. <i>S. maltophilia</i> izolatlarının PZR sonucu elde edilen bant profilleri.....	15
Şekil 4. <i>S. maltophilia</i> izolatlarının PZR sonucu elde edilen bant profillerine göre PyElph programı ile çizilen dendrogram (UPGMA tree; 1,0).....	16



Kısaltma Listesi

AS	: Acil servis
CAP	: Kloramfenikol
CAZ	: Seftazidim
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical Laboratory and Standards Institute
ÇKÜ	: Çocuk kit ünitesi
ÇS-KL	: Çocuk sağlığı klinik
Ç-YBÜ	: Çocuk yoğun bakım ünitesi
ÇYD-YBÜ	: Çocuk yeni doğan yoğun bakım ünitesi
EHKM	: Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji
ERIC-PZR	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PZR
EUCAST	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Test
GHS	: Göğüs hastalıkları servisi
KS	: Kardiyoloji servisi.
LEV	: Levofloksasin
MOK	: Moksifloksasin
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis/ Darbeli alan jel elektroforezi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
REP-PZR	: Repetitive extragenic palindromic-PZR
TMP-SXT	: Trimetoprim-sulfametoksazol
YBÜ	: Yoğun bakım üniteleri
MHB	: Mueller Hinton Broth
MN	: Minosiklin
PBS	: Phosphate buffered saline-fosfat tamponu
SEM	: Scannig electron microscopy
TSB	: Tryptic Soy Broth
TEM	: Transmission electron microscopy
UPGMA	: Unweighted pair group method with hierarchic averages

1. Giriş

Stenotrophomonas maltophilia yoğun bakım üniteleri (YBÜ) ve immün sistemi zayıflamış olan bireylerde yaygın olarak görülen enfeksiyonlarla ilişkili patojen mikroorganizmalardır. Sıklıkla erişkinlerin orofarinkslerinden, balgamlarından izole edilen, nonfermentatif, gram-negatif basil morfolojisinde olan *S. maltophilia*, önceki yıllarda *Pseudomonas* genusundaki bakteriler arasında sınıflandırılmış fırsatçı bir patojendir. Solunum sistemi, üriner sistem ve yara enfeksiyonları gibi farklı klinik tablolarda etken olarak tespit edilebilmekte, özellikle menenjitli hastaların serebrospinal sıvılarından, bacak ülserleri ve yanak mukozası lezyonlarından, kistik fibrozisli hastalardan da sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir. Son zamanlarda ise endokardit etkeni olarak da izole edildiği gözlenmektedir. Hastane personelinin elleri, kontamine dezenfektan solüsyonları, kontamine hastane suları ile salgınlara yol açabilmektedir. Hastane dışında nadiren etken olduğu ve sadece insanlarda değil hayvanlarda da hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmektedir. İleri yaş, prematürite, cerrahi instrumentasyon, diyabet, hematolojik malignite, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi risk faktörlerini taşıyan YBÜ hastalarında enfeksiyon etkeni olarak *S. maltophilia* gibi patojenlerin varlığı da mutlaka araştırılmalıdır. Hastanede *S. maltophilia* klinik suşlarının neden olduğu salgınlar izlenirken, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi gibi fenotipik yöntemler veya ayırım gücü daha yüksek olan moleküler yöntemler ile olası klonalite araştırılmalıdır (Abbasi 2009, Brooke 2012, Gulcan 2004, Dülger ve Berктаş 2007, Pien 2015, Schaumann 2008, Şen 2017, Yıldırım 2009).

S. maltophilia beta-laktamaz, aminoglikozid asetiltransferaz ve eritromisini inaktive eden enzimleri ve dışa atım pompaları kodlayan genleri sayesinde birçok antibiyotiğe doğal (intrensek) olarak direnç göstermektedir. Trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SXT) *S. maltophilia* enfeksiyonları için en etkin antibiyotik olarak kullanılsa da son yıllarda bu ilaca direncin konu edildiği yeni çalışmalara rastlanmaktadır. Florokinolon grubu ilaçlar da *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak da özellikle levofloksasin (LEV) direnci artış göstermektedir. YBÜ’de yaygın görülen nonfermentatif gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnç oranları yüksek olduğundan, tedavide karbapenemler gibi geniş spektrumlu antibiyotikler tercih edilmektedir. Aynı zamanda karbapenemlere doğal dirençli olan *S. maltophilia* gibi fırsatçı patojenlerle ilişkili enfeksiyonlar gözden

kaçabilmekte ve tedavi güçleşebilmektedir. *S. maltophilia* cansız yüzeylerde, prostetik materyaller üzerinde (santral venöz kateter, üriner sistem kateterleri, kardiyak kapaklar vb.) adezyon ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Ayrıca akciğer hücreleri üzerinde de biyofilm oluşturabilmektedirler. Biyofilm, bakterilerin topluluk halindeyken oluşturdukları ekzopolisakkarid bir tabaka ile kendi çevrelerini kuşatması ve sabit bir yüzeye tutunması ile oluşur. Çevresel koşullardan etkilenebilen biyofilm oluşturma yeteneği doğrudan bir direnç mekanizması değildir ancak direnç oranlarının artışına neden olan bir virulans özeliğidir (Brooke 2012, Gulcan 2004, Kandemir 2007, Pien 2015, Şen 2017, Yıldırım 2009).

Bu çalışmada, benzer antibiyotik duyarlılık profili ve biyofilm oluşturma yeteneği gösteren suşların aynı klona ait olabileceği ve hastane içerisinde aynı klona ait olan izolatların belli birimlerde yaygın olabileceği hipotezi değerlendirildi. Bu değerlendirmeyi yapabilmek için, E. Ü. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı' na 2015 yılı içerisinde gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. maltophilia* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık özellikleri, genotipleri ve biyofilm oluşturma kapasitesinin ve elde edilen verilerin birbirleriyle olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

2. Genel Bilgiler

2.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

Çevrede yaygın olarak bulunan aerobik, nonfermentatif, Gram-negatif basillerdir. Özellikle immün sistemi zayıf olanlarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bakteremi, solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit ve menenjit gibi pek çok klinik enfeksiyonda özellikle de ventilatör ile ilişkili pnömonide etken olarak izole edilmektedir. Hematolojik malignite, YBÜ'de olma, santral venöz kateter kullanımı, yakın zamanda geçirilen cerrahi operasyon, ventilatör kullanımı, daha önce kullanılmış olan geniş spektrumlu antibiyotikler, özellikle de karbapenem kullanımı kolonizasyon ve enfeksiyon için risk faktörleri arasındadır. Karbapenemler dahil pek çok antibiyotik *S. maltophilia*' ya karşı etkili olmadığından tedavileri güç olmaktadır. Sıklıkla bakteriyemi ve pnömoni sonucu ölüm görülür (Çıragil 2014, Çıkman 2016, Pien 2015, Şen 2017).

Tedavide ilk tercih edilen ilaç TMP/SXT' dir. Kinolon grubundan LEV, *S. maltophilia* tedavisinde en sık kullanılan antibiyotiklerdendir. Özellikle yeni nesil kinolonların çok etkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca doksisiklin ve seftazidim (CAZ) de etkilidir. Ancak CAZ ile ilgili olarak Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute: CLSI) duyarlılığın test edilmesini önerirken Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Avrupa Komitesi (The European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST) beta-laktamların hiçbiri için test yapılmasını önermemektedir (Çıragil 2014, Kandemir 2016, Pien 2015, Tanrıverdi Çaycı 2013).

S. maltophilia' nın florokinolon direncinde *SmeABC*, *SmeDEF* gibi aktif dışa atım pompalarının, ek olarak bir fosfoglukomutaz olan *SpgM*'nin rol oynadığı bildirilmektedir (Çıragil 2014, Pien 2015). *S.maltophilia*, dış membran geçirgenliğinde azalma, efluks pompa genlerinin ekspresyonunu artırma, çeşitli enzimlerin üretimi (aminoglikozid modifiye eden enzim, beta-laktamaz vb.) gibi mekanizmalar ile aminoglikozidler, beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi pek çok geniş spektrumlu antibiyotiğe direnç gösterdiğinden klinisyenlerin ampirik tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Antibiyotiklere duyarlı ve dirençli bakterilerin oranı coğrafi bölgelere ve hastanelere göre değişebildiğinden sık aralıklarla direnç gelişiminin izlenmesi ve hastane içerisinde olası salgınların belirlenebilmesi için suşların klonal profilinin gösterilmesi önerilmektedir (Dülger ve Berktaş 2007, Schaumann 2008, Özkaya 2014, Tanrıverdi Çaycı 2013, Türk Dağı 2011).

S. maltophilia ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak giderek artan oranlarda, hastane ortamı ve hastane dışı olmak üzere pek çok çevreden ve coğrafi bölgeden izole edilebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) *S. maltophilia*' yı dünya çapında önde gelen hastane enfeksiyonu kaynağı dirençli patojen mikroorganizmalar arasında göstermektedir. "Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends" programı 2012 yılında *S. maltophilia*' nın Asya-Pasifik ülkelerinde (Avustralya, Çin, Hong Kong, Malezya, Yeni Zelanda, Filipinler, Singapur, Güney Kore, Tayvan, Tayland ve Vietnam) intra-abdominal enfeksiyona neden olan ilk dört patojenden biri olduğunu rapor etmiştir. "SENTRY Antimicrobial Surveillance" programı 2012 yılında *S. maltophilia*' nın Brezilya, Arjantin, Meksika ve Şili'de pnömونيye yol açan ilk 10 patojen arasında yer aldığını bildirmiştir (Brooke, 2014).

2.2.S. *maltoiphilia* enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotikler

Trimetoprim (TMP): Antimetabolit etkili bir ajandır. Dihidrofolat redüktazı inhibe edip dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşmesini engelleyerek folik asit metabolizmasını etkiler. Bu inhibisyon sonucu timidin, metiyonin, glisin ve bazı pürinlerin oluşumu engellendiğinden DNA ve RNA sentezi bozulur. Sıklıkla sulfametoksazol ile kombine halde kullanılarak folik asit sentezinin iki basamağına etkili sinerjistik bir etki oluşturulur. Birçok gram pozitif ve gram negatif organizmaya karşı etkilidir (Abbasoğlu ve Onurdağ 2011, Aydın 2014).

Kinolonlar: Bakteride DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirinde görev alan DNA topoizomeras tip II (giraz) veya topoizomeras tip IV enzimlerini inhibe ederek etki gösteren, yapılarında kinolin halkası içeren sentetik kemoteropötik ajanlardır. Gram-pozitiflerde ana hedef topoizomeras tip IV olurken gram-negatiflerde DNA-giraz'ın A alt ünitesidir. İlk kullanılan gram-negatif etkinliği bulunan nalidiksik asitten sonra iki halkalı kinolon çekirdeğinde yapılan değişikliklerle gram-negatiflere ve gram-pozitiflere etkili florokinolonlar geliştirilmiştir. Bunlar; geniş spektrumlu olan siprofloksasin (CIP), LEV ve ofloksasin (OFL) ile çok geniş spektrumlu olan moksifloksasin (MOK), gatifloksasin, klinafloksasin ve trovafloksasindir (Abbasoğlu ve Onurdağ 2011, Aydın 2014).

Kloramfenikol (CAP): Kloramfenikol ilk kez *Streptomyces venezuelae* türü bakteriden elde edilmiş, ancak günümüzde sentetik olarak üretilen bir antibiyotiktir. Geniş spektrumlu ve bakteriyostatik etkili bir ajandır. Etkisini, 50S ribozomal alt ünitenin peptidil transferaz bölümüne geri dönüşümlü olarak bağlanarak ve bunun sonucunda peptid uzamasının inhibisyonuna neden olarak gösterir (Abbasoğlu ve Onurdağ 2011, Aydın 2014).

Seftazidim (CAZ): Sefalosporin grubunda, 3.kuşakta yer alan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Sefalosporinler *Cephalosporum acremonium* mantarından elde edilen, 7-aminosefalosporanik asit yapısını içeren maddelerdir. Hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağını inhibe ederek bakterisidal etki gösterirler. Geniş (broad) spektrumlu üçüncü kuşak ve genişletilmiş (extended) spektrumlu dördüncü kuşak sefalosporinler *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğuna ve *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı etkilidir (Abbasoğlu ve Onurdağ 2011, Aydın 2014).

Minosiklin (MN): Kolay emilen ve yarı ömrü uzun olan bir tetrasiklin türevidir. Tetrasiklin ilk olarak *Streptomyces rimosus* isimli bakteriden elde edilmiştir. Tetrasiklinler, naftasenkarboksiamid yapısından türemiş, geniş spektrumlu, bakteriyostatik etkili antibiyotiklerdir. Ribozomların 30S alt ünitesine reversibl bağlanarak aminoaçil-transfer RNA (tRNA)'nın 30S ribozom ile mRNA'nın oluşturduğu komplekse bağlanmasını engeller ve bu yolla protein sentezini durdurur. (Abbasoğlu ve Onurdağ 2011, Aydın 2014).

2.3. Biyofilm oluşumu

Bakterial aderans (tutunma) mukozal yüzeylerde veya protezlerde biyofilmle ilişkili enfeksiyonların patogeneğinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Klinik ve çevreden izole edilen *S. maltophilia* suşlarının abiyotik ve canlı yüzeylere tutunma özelliğinin olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşumu özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda önemlidir. Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumu, opsonofagositozdan ve antibiyotiklerin etkisinden koruyan etkisi nedeniyle özellikle zayıf immunitesi olanlarda kronik enfeksiyon ve sepsise neden olabilmektedir (Bonaventura 2007, Temel ve Eraç 2018, Wang 2016). *S. maltophilia*'nin biyofilm oluşturma yeteneğine katkı sağlayan mekanizmalarla ilgili olarak henüz kapsamlı araştırmalar yapılmamıştır. Ancak son zamanlarda *rmlA* ve *rpfF* genlerindeki mutasyonların biyofilm oluşumunu azalttığı yönünde bulgular ifade edilmektedir. Fosfoglukomutaz (phosphoglucomutase: PGM) enzimini kodlayan *spgM* geninin de biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Zho 2014).

2.4. Moleküler tiplendirme

Mikroorganizma salgınların çoğunun ortak bir etkene bağlı olarak gerçekleştiğinden enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde izole edilen mikroorganizmalar arasındaki ilişkinin, genetik olarak aynı ya da çok yakın olan organizmaların varlığının gösterilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla 1980'lerin başından itibaren, klasik olarak kullanılan tiplendirme yöntemleri (biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme, antibiyogram gibi fenotipik belirteçler vb.) yerine, moleküler yöntemler kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemler arasında; restriksiyon enzim analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Darbeli Alan Jel Elektforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis: PFGE) bulunmaktadır (Yağcı 2001, Çetinkaya ve Ayhan 2012).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteriler, identifikasyon ve rutin antibiyotik duyarlılık testleri

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Tıbbi Mikrobiyoloji Bakterioloji Laboratuvarı' na Ocak-Aralık 2015 tarihleri arasında gelen kan, sürüntü, idrar, BOS gibi çeşitli klinik örneklerden uygun besiyerine ekilerek üretilmiş ve etken olduğu kabul edilen mikroorganizmaların identifikasyonu Maldi-TOF MS yöntemi (Vitek MS, BioMerieux, Fransa) ile yapıldı. İzole edilen *S. maltophilia* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları CLSI (2015) önerileri doğrultusunda yapılan rutin testlerle değerlendirildi. TMP-SXT, LEV ve MN duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle, CAP ve CAZ duyarlılıkları duyarlılıkları gradiyent-test (E-test, BioMerieux, Fransa) ile belirlendi. Test edilen antibiyotiklerden en az birine orta duyarlı veya dirençli olduğu tespit edilen izolatlar çalışmaya dahil edildi. Gliserinli (%10) BHIB içerisinde stoklanarak çalışmaya kadar -80°C'de kültür dolabında saklandı. *S.maltophilia* ATCC 13637, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kontrol kökenleri olarak kullanıldı.

Tablo 1. CLSI (2015) kriterlerine göre antibiyotiklerin duyarlılık ve direnç sınır değerleri

Antibiyotikler	Zon çapı (mm)			MİK (µg/ml)		
	≥R	I	≥S	≥R	I	≥S
MN-30 µg (Oxoid)	19	15-18	14	16	8	4
SXT-25 µg (Oxoid)	16	11-15	10	4/76	-	2/38
LEV-5 µg (Oxoid)	17	14-16	13	8	4	2
CAP-gradient test (Biomerioux)				32	16	8
CAZ-gradient test (Biomerioux)				32	16	8

R: Dirençli, I: Orta duyarlı, S: Duyarlı, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

3.1.2. Mikrodilüsyon yöntemi ile test edilen antibiyotikler ve stok solüsyonları

Toz halindeki CIP (Koçak Farma, Türkiye), LEV (Koçak Farma, Türkiye) ve MOK (Bayer, Türkiye) stok çözeltilerinin hazırlanması CLSI kriterlerine uygun olarak

aşağıda verilmiş olan formüle göre yapıldı. Antibiyotik stok solüsyonları 0,2 µm por çapındaki membran filtrelerden (Sartorius, Almanya) geçirilerek steril edildi ve kullanılmaya kadar -20°C’de saklandı.

$$W = \frac{1000 \times V \times C}{P}$$

Stok solüsyon hazırlama formülü; W= Antibiyotik ağırlığı (mg)
P= Potens (µg/mg)
V= Hacim (ml)
C= Final konsantrasyon (µg/ml)

3.1.3. Malzemeler, kimyasallar, besiyerleri ve çözeltiler

3.1.3.1.Besiyerleri

- 1- Brain-Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid, Birleşik Krallık)
- 2- Gliserinli (%10) BHIB
- 3- Eosine Methylene Blue Agar (EMB) (Merck, Almanya)
- 4- MacConkey Agar (Merck, Almanya)
- 5- Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck, Almanya)
- 6- Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid, Birleşik Krallık)
- 7- Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya)

Toz halindeki besiyerleri firma önerileri doğrultusunda gerekli miktar distile su ile karıştırıldı ve otoklavda steril edildi. Agarlı besiyerleri steril petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.

Kasyon ekli MHB (KE-MHB) hazırlamak için 0,75M CaCl₂.2H₂O ve 0,82M MgCl₂.6H₂O stok solüsyonu hazırlandı ve MHB besiyerine otoklavlamadan önce ilave edildi.

Besiyerleri kullanılmaya kadar +4°C’de saklandı.

3.1.3.2.Çözeltiler

1.Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu (5X):

Belirtilen kimyasal maddeler tartıldıktan sonra distile su ile 1000ml’ ye tamamlandı ve otoklavda steril edildi. 1X TBE elde etmek için ise distile su ile seyreltme yapıldı.

Trisma base (Bioshop, Kanada)	53,91 g
Borik asit (Sigma-Aldrich, Birleşik Devletler)	27,52 g
Na ₂ EDTA (Applichem, Almanya)	3,72 g

- 1. Fizyolojik tuzlu su (FTS):** NaCl (Merck, Almanya), distile su içerisinde % 0,9 oranında olacak şekilde tartıldı ve çözüldü. Otoklavlanda sterilize edildikten sonra +4 °C' de saklandı.
- 2. Fosfat Tamponu** (Oxoid, Birleşik Krallık): 100 ml distile suda 1 tablet çözüldü ve otoklavlanda sterilize edildikten sonra kullan ıldı.
- 3. Kristal viyole çözeltisi (% 0,1'lik):** Gereken miktar kristal viyole (Sigma-Aldrich, Birleşik Devletler) tartıldı ve distile suda çözüldükten sonra kaba kağıt filtre ile süzülerek iri partiküller uzaklaştırıldı.

3.1.4. Moleküler Tiplendirmede Kullanılan Madde ve Malzemeler

3.1.4.1.PZR için gerekli malzemeler

- 1. dNTP karışımı (2µmol her biri)** (Fermentas, Birleşik Devletler): (2.5 mM/her biri, toplam 10mM) alikotlanarak -20°C' de saklandı.
- 2. Taq DNA polimeraz** (Fermantas, Birleşik Devletler):
10X Taq buffer
25 mM MgCl₂
5U/ µl
- 3. Primerler**
M13 Geri; 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA-3'
M13 İleri; 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG AA-3'
Primerler üretici firma önerileri doğrultusunda 100pmol konsantrasyonda hazırlandı ve alikotlanarak kullanılmaya kadar -20°C' de saklandı.

3.1.4.2.PZR ürünlerini görüntülemek için kullanılan malzemeler

- 1. Agaroz** (Sigma-Aldrich, Birleşik Devletler): PZR ürünlerinin elektrik alanda yürütüleceği jel ortamını hazırlamak için gerekli miktarda toz tartılarak, 1X TBE tamponunda çözüldü ve eritildikten sonra Safeview DNA boyası ilave edilerek tarak yerleştirilmiş olan jel tepsisine döküldü.
- 2. SafeView DNA boyası** (ABM, Kanada): Agaroz jel hazırlanırken jel tepsisine dökülmeden önce 10µl/100 ml oranında ilave edildi.

3. **6X-Jel yükleme boyası** (Fermentas, Birleşik Devletler): PZR ürünlerinin ve belirteçin jele yüklenmesi sırasında 1/6 oranında karıştırılarak kullanıldı.
4. **Merdiven (Belirteç-50bp)** (Fermentas, Birleşik Devletler): PZR ürünleri ile beraber jele yüklenerek görüntülenecek bantların yerlerini doğrulamak amacıyla kullanıldı.

3.2.Yöntem

3.2.1. Mikrodilüsyon Yöntemi

Rutin testler sonucu TMP-SXT, LEV, MN, CAZ veya CAP antibiyotiklerinden en az birine orta duyarlı veya dirençli bulunan 13 *S. maltophilia* izolatının ve ayrıca *E. coli* ATCC 25922 ile *P. aeruginosa* ATCC 27853 kontrol kökenlerinin CIP, LEV ve MOK antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları, CLSI (2015) önerilerine göre mikrodilüsyon testi ile belirlendi ve çıkan sonuçlar duyarlı (S), orta duyarlı (I), dirençli (R) olarak değerlendirildi.

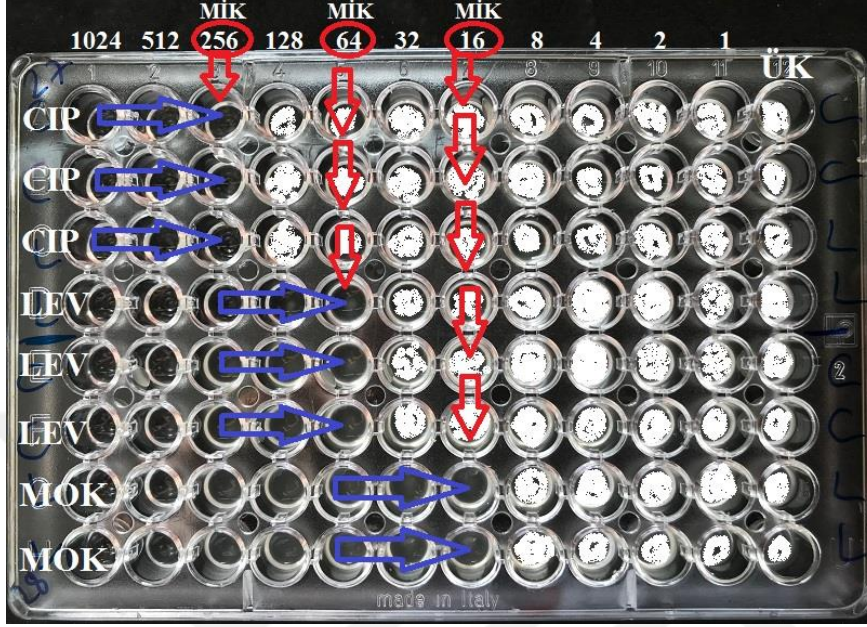
İlk olarak, stoklanmış olan bakteri kültürleri EMB ve Mac Conkey agar besiyerine ekildikten sonra 18-24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılarak canlandırıldı. Hazırlanan taze kültürler fizyolojik tuzlu su FTS içerisinde 0,5 McFarland standardı bulanıklığına (10^7 - 10^8 CFU/ml) getirildikten sonra KE-MHB besiyeri içerisinde 1:100 oranında (10^5 - 10^6 CFU/ml) seyreltildi (100 µl bakteri süspansiyonu + 9,9 ml MHB besiyeri).

Plastik, U tabanlı 96 kuyucuklu mikropkların kuyucuklarına ilk olarak 50'şer µl MHB besiyeri ilave edildi. Daha sonra mikropklak üzerindeki kuyucukların ilk sırasına CIP, LEV ve MOK antibiyotiklerinin, ilk kuyularda olması istenen son konsantrasyonun dört katı konsantrasyondaki stok çözeltilerinden 50'şer µl ilave edildi.

Bu kuyulardan yan kuyucuklara sırayla 50'şer µl aktararak çift katlı seri dilüsyonlar hazırlandı. Serilerin son kuyucuklarına antibiyotik ilave edilmedi ve üreme kontrolü (ÜK) için ayrıldı.

Son olarak 1:100 oranında seyreltilen bakteri süspansiyonlarından 50'şer µl alınıp mikropklardaki kuyucuklar üzerine eklenerek antibiyotik dilüsyonlarıyla biraraya getirildi.

Plaklar 35°C’de 18-24 saat inkübasyon sonunda göz ile değerlendirildi. Üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlendi. Testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (Şekil 1).



Şekil 1. Mikrodilüsyon testi.

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, MOK: moksifloksasin, ÜK: üreme kontrolü.

3.2.2. Moleküler Tiplendirme

Rutin testler sonucu TMP-SXT, LEV, MN, CAZ veya CAP antibiyotiklerinden en az birine orta duyarlı veya dirençli bulunan 13 izolat ve *S. maltophilia* ATCC 13637 kontrol suşu M13 primerleri kullanılarak tiplendirildi (Büyük 2017).

3.2.2.1. Kalıp DNA'nın ekstraksiyonu

Bakterilerin katı besiyerinde üretilmiş taze kültürlerinden bir koloni alınarak, eppendorf tüplere dağıtılmış 200 µL steril distile su içerisine süspande edildi.

Bakteri süspansiyonları 10 dk vortekslendi ve ısıtıcı blokta 95-100 °C’de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda buz içerisine alınarak hızla soğutuldu.

Süspansiyonlar 10dk 14.000g’de santrifüjlendikten sonra ayrılan süpernatant kısmı alikotlanarak PZR’de kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Uygun oranlarda 10X tamponu, dNTP, M13 primerleri, Taq polimeraz ve kalıp DNA ile PZR karışımı hazırlandı ve ısı döngü cihazında (Techne, TC 312, Bibby Scientific Ltd., Birleşik Krallık) ilgili kısımların amplifikasyonu sağlandı.

PZR Karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (μ l)
Deiyonize su	27,5
10X Taq buffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	8
dNTP (2 μ mol)	5
Primer M13-Geri (100 pmol/ μ l)	1
Primer M13-İleri (100 pmol/ μ l)	1
Taq polimeraz (5U/ μ l)	0,5
Kalıp DNA	2
Toplam	50

PZR Programı

94°C'de 5 dk. denatürasyon	} 2 döngü
40°C'de 5 dk. primer bağlanması	
<u>72°C'de 5 dk. primer uzaması</u>	
40°C'de 1 dk. denatürasyon	} 40 döngü
40°C'de 1 dk. primer bağlanması	
72°C'de 1 dk. primer uzaması	

3.2.2.3. Görüntüleme ve genotipik analiz

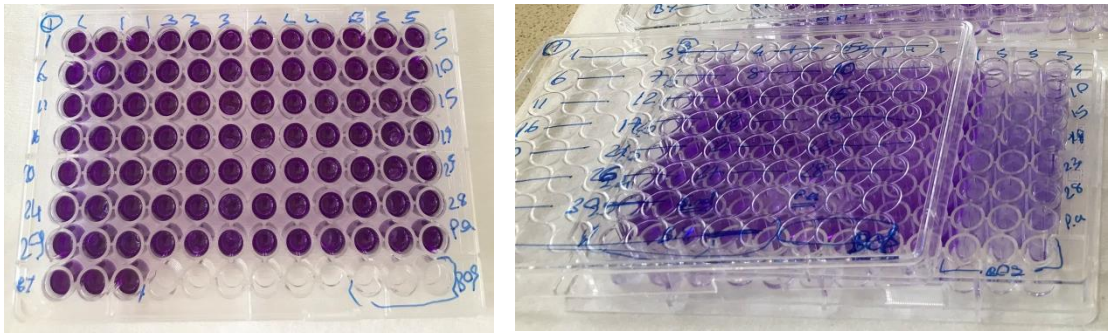
Amplifiye edilen PZR ürünleri %1,5 agaroz içeren jele yüklendikten sonra elektroforez cihazında (Bio-Rad, Birleşik Devletler) 1X TBE tamponu ile 100 Volt ile 60 dk süre ile yürütüldü. Elektroforez sonrasında görüntüleme sistemi Fusion FX7 (Vilber Lourmat, Fransa) ile ürünler UV ışık altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Bu fotoğraflar üzerinden genotip gruplarının analizi PyElph bilgisayar programı ile yapıldı (Pavel ve Vasile 2012)

3.2.3. Biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

Kristal viyole yöntemi ile araştırıldı (Rossi 2009, Zhou 2014). Bu yöntemde steril 96 kuyucuklu düz tabanlı polisitiren mikropalaklar kullanıldı. Rutin testlerde en az bir antibiyotiğe orta duyarlı veya dirençli bulunan 13 izolatta biyofilm oluşturma kapasitesi araştırıldı. Kontrol köken olarak *S. maltophilia* ATCC 13637 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapıldı.

İlk olarak plaklardaki her bir kuyucuğa 180 µl Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri dağıtıldıktan sonra 0,5 McFarland standardı bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonlarından 20 µl eklenip 35°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren kuyucuklara bakteri süspansiyonu yerine 20 µl daha besiyeri eklendi.

İnkübasyon sonunda mikropalaklar boşaltılıp fosfat tamponu (PBS) ile 3 defa yıkandı. Kuyucuklarda meydana gelen biyofilm tabakasını fikse etmek için kuyucuklara 180 µl %95’lik (v/v) etanol dolduruldu ve 20 dk sonra boşaltıldı, plaklar ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuklar 180 µl % 0,1’lik (w/v) kristal viyole çözeltisi ile dolduruldu ve 20 dk. bekledikten sonra boşaltıldı (Şekil 2).



Şekil 2. Kristal viyole yöntemi ile kökenlerin biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi

Kuyucuklardaki biyofilm tabakasına tutunan boya %95’lik (v/v) etanol ile 20 dk. süre ile çözölüp, kuyucuklardaki içeriğ 96 kuyucuklu U tabanlı bir başka mikropalak içine aktarıldı. Kuyucuklardaki içeriğin absorbans değeri, mikropalaka okuyucuda (Thermo Scientific-Varioskan Flash, Birleşik Devletler) 540 nm (OD₅₄₀) dalga boyunda ölçölüdü. Sadece besiyeri içeren negatif kontrol kuyucuklarının optik dansitelerinin ortalamasına, bu kuyucuklarla hesaplanan standart sapma (SD:

standard deviation) değerinin 3 katı eklenerek sınır değer (cut-off: OD_c) belirlendi. Bu değer ile aşağıdaki eşitlikler kullanılarak biyofilm oluşturan suşlar değerlendirildi ve biyofilm dőzeyleri zayıf, orta ve gőçlü olmak üzere sınıflandırıldı.

Negatif:	OD İzolat ≤ OD _c
Zayıf:	OD _c < OD İzolat ≤ 2 x OD _c
Orta:	2 x OD _c < OD İzolat ≤ 4 x OD _c
Gőçlü:	4 x OD _c < OD İzolat

4. Bulgular

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, bakteriyoloji laboratuvarında 2015 yılında izole edilen *S. maltophilia* kökenleri arasından rutin testler sonucu TMP-SXT, MN, LEV, CAZ, CAP antibiyotiklerinden en az birine orta duyarlı veya dirençli 13 izolat ile çalışıldı. Bu izolatlarda CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile CIP, LEV, MOK duyarlılıkları test edildi, kristal viyole yöntemi ile biyofilm oluşturma kapasiteleri test edildi ve M13 primerleri ile PZR yapılarak moleküler tiplendirme yapıldı.

Mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre MİK aralıkları; CIP: 2-32 µg/ml, LEV: 0,5-16 µg/ml, MOK: < 0,125-8 µg/ml olarak belirlendi. CIP, LEV ve MOK için MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri sırasıyla; 4-16 µg/ml; 2-8 µg/ml ve 0,125-4 µg/ml olarak bulundu. Bazı izolatlarda rutin testlerde disk difüzyon testi ile LEV duyarlılıklarının değerlendirmeleri ile mikrodilüsyon testi sonuçlarının değerlendirmeleri arasında yaklaşık bir dilüsyon fark bulunmaktadır. Rutin testlerde yapılan disk difüzyon sonucuna göre LEV' ye dirençli bulunan 16 numaralı izolat ile orta duyarlı bulunan 27 numaralı izolat, mikrodilüsyon testi sonucuna göre duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde 21 ve 23 numaralı izolatlar da disk difüzyon testi ile dirençli bulunurken mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre orta duyarlı bulunmuştur. Sadece 28 numaralı izolat her iki test ile de dirençli olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2).

S. maltophilia izolatlarının kristal viyole yöntemi ile biyofilm oluşturma kapasitelerine bakıldığında, CAZ ve CAP' ye orta duyarlı olan 1 ve 12 no' lu izolatlar orta düzey biyofilm oluşturdu. Bunun dışında diğer duyarlılık profillerindeki

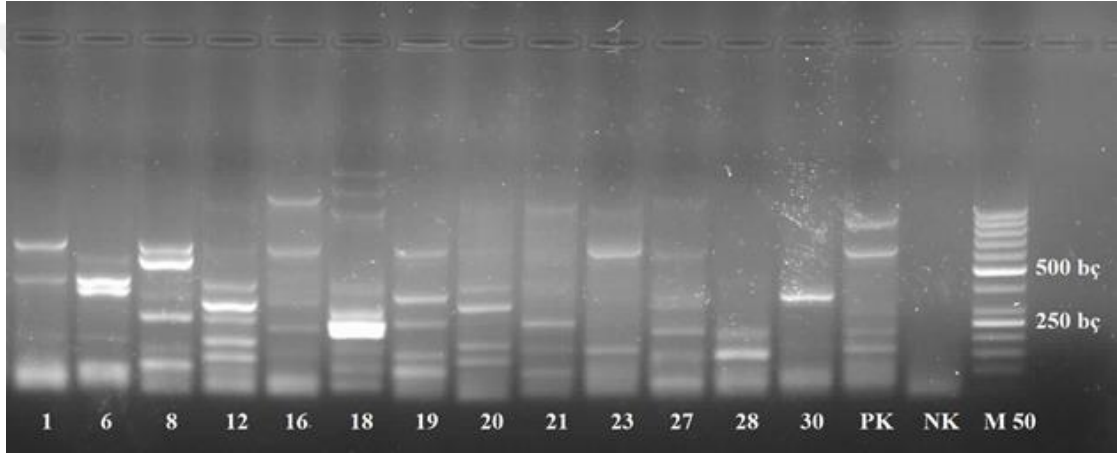
11 izolatın yüksek düzeyde biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. Yüksek düzey biyofilm oluşturan kökenlerin optik dansite değerlerine bakıldığında antibiyotik duyarlılık profilleriyle veya değerleriyle ilişkili olarak bir değişim gözlenmedi (Tablo 2).

Tablo 2. *S. maltophilia* izolatlarının rutin testlerle belirlenen direnç profili, mikrodilüsyon testi ile belirlenen duyarlılıkları ve biyofilm oluşturma düzeyleri

İzolat No	Servis	Direnç Profili	MİK Değerleri			Biyofilm OD ₅₄₀
			CIP	LEV	MOK	
1	ÇYD-YBÜ	CAZ ^I (MİK: 24)	2	1 (S)	0,5	0,4 (orta)
6	ÇS-KL	CAZ ^R (MİK: 48)	2	0,5 (S)	0,125	1,8 (güçlü)
8	AS	CAZ ^R (MİK: 48) CAP ^I (MİK: 24)	2	0,5 (S)	0,125	0,9 (güçlü)
12	KS	CAP ^I (MİK: 16)	2	1 (S)	0,125	0,3 (orta)
16	ÇS-KL	LEV ^R	8	4 (S)	2	1,4 (güçlü)
18	ÇS-KL	TMP-SXT ^R CAZ ^I (MİK: 12) CAP ^R (MİK: 256)	1	0,5 (S)	<0,125	0,5 (güçlü)
19	ÇKÜ	CAP ^R (MİK: 48)	4	2 (S)	1	1,6 (güçlü)
20	Ç-YBÜ	CAP ^R (MİK: 48)	1	0,5 (S)	0,25	0,9 (güçlü)
21	GHS	LEV ^R CAZ ^R (MİK: 96) CAP ^R (MİK: 96)	16	8 (I)	4	0,9 (güçlü)
23	EHKM	LEV ^R	16	8 (I)	4	1,1 (güçlü)
27	ÇKÜ	LEV ^I	8	4 (S)	4	1,0 (güçlü)
28	EHKM	MN ^R TMP-SXT ^R LEV ^R	32	16 (R)	8	0,9 (güçlü)
30	ÇS-KL	CAP ^R (MİK: 256)	8	4 (S)	2	1,2 (güçlü)

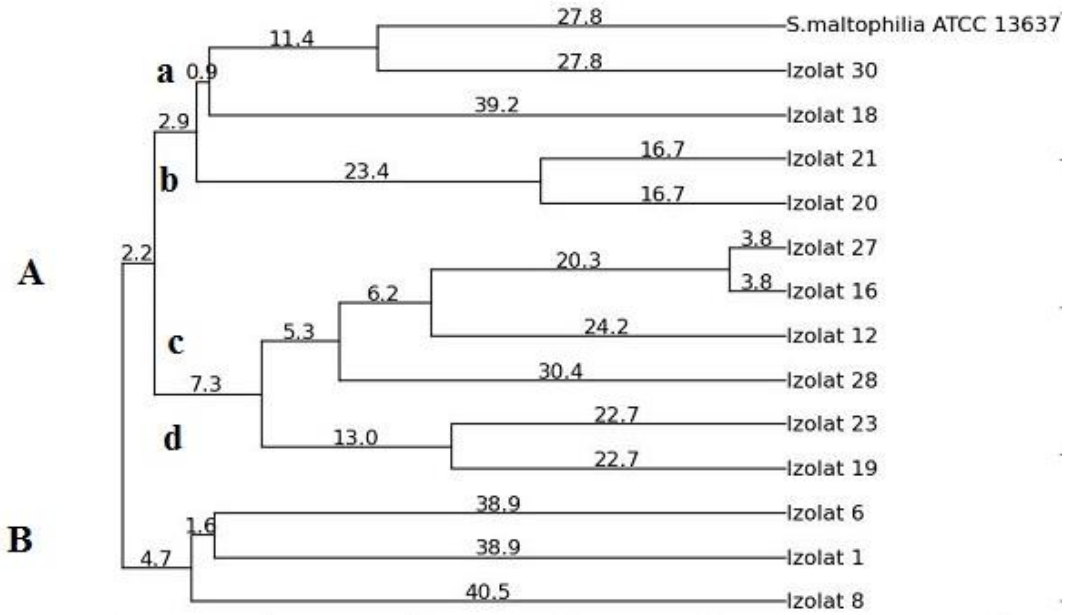
CAP: kloramfenikol, CAZ: seftazidim, CIP: siprofloksasin, TMP-SXT: trimetoprim/sulfametoksazol, LEV: levofloksasin, MN: minosiklin, MOK: moksifloksasin, MİK: minimum inhibitör konsantrasyon (µg/ml), AS: Acil servis, ÇS-KL: Çocuk sağlığı klinik, ÇKÜ: Çocuk kit ünitesi, ÇYD-YBÜ: Çocuk yeni doğan yoğun bakım ünitesi, Ç-YBÜ: Çocuk yoğun bakım ünitesi, EHKM: Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji, GHS: Göğüs hastalıkları servisi, KS: Kardiyoloji servisi.

S. maltophilia izolatlarının PZR sonucunda gözlenen moleküler profili (Şekil 3), PyElph programı ile çizilen dendrogram ile yorumlandı (Şekil 4). Dendrogram incelendiğinde temel olarak 1, 6 ve 8 numaralı izolatların bulunduğu bir grup ile diğer 11 kökenin yer aldığı grup göze çarpmaktadır. Bu 11 izolatu içeren grupta da 18, 20, 21, 30 numaralı ve 12, 16, 19, 23, 27, 28 numaralı izolatları içeren iki ana gruptan oluşmaktadır. Elde edilen moleküler profile göre duyarlılıkları ve/veya biyofilm oluşturma kapasiteleri ile ayırt edilebilecek farklı özellikler gösteren klonal grup oluşumuna rastlanmadı.



Şekil 3. *S. maltophilia* izolatlarının PZR sonucu elde edilen bant profilleri.

PK: Pozitif kontrol, *S. maltophilia* ATCC 13637; **1-** CAZ^I; **6-** CAZ^R; **8-** CAZ^R, CAP^I; **12-** CAP^I; **16-** LEV^R; **18-** TMP-SXT^R, CAZ^I, CAP^R; **19-** CAP^R; **20-** CAP^R; **21-** LEV^R, CAZ^R, CAP^R; **23-** LEV^R; **27-** LEV^I; **28-** MN^R, TMP-SXT^R, LEV^R; **30-** CAP^R; **NK:** Negatif kontrol; **M:** 50 bç DNA merdiveni (belirteç)



Şekil 4. *S. maltophilia* izolatlarının PZR sonucu elde edilen bant profillerine göre PyElph programı ile çizilen dendrogram (UPGMA tree; 1,0)

5. Tartışma

Hastane enfeksiyonlarında büyük öneme sahip, fırsatçı patojen olan *S. maltophilia* çeşitli mekanizmalarla aminoglikozidler, beta-laktamlar, tetrasiklinler gibi birçok geniş spektrumlu antibiyotiğe direnç göstermektedir. TMP-SXT ise güçlü etkisi nedeniyle *S. maltophilia* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen antibiyotiktir. Ancak son yıllarda bazı bölgelerde bu antibiyotiğe direnç görülmesi, araştırmacıları direnç mekanizmalarını ve yeni alternatifleri araştırmaya yöneltmiştir (Juhász 2014, Özkaya 2014). Bu alternatiflerin önemli bir kısmını oluşturan florokinolonlarla yapılan çalışmada, Grillon ve ark. (2016), 40 *S. maltophilia* izolatında CIP, LEV ve MOK duyarlılığını değerlendirmiş ve sırasıyla MİK₅₀-MİK₉₀ değerlerini 4 - >32 mg/L; 1,5 - >32 mg/L ve 0,75 - 6 mg/L olarak tespit etmiştir. Bonavertura ve ark. (2004), güçlü biyofilm üretme yeteneği olduğunu belirledikleri 20 *S. maltophilia* izolatında yedi florokinolon (CIP, LEV, MOK, ofloksasin, grepafloksasin, norfloksasin, rufloksasin), SXT ve CAZ antibiyotiğinin in vitro aktivitesini araştırmıştır. CIP, LEV, MOK için MİK₅₀/MİK₉₀ değerleri sırasıyla; 2 - 32 mg/L; 1-8 mg/L ve 0,5 - 4 mg/L olarak tespit etmiştir. Wang ve ark. (2016), 45 *S. maltophilia* izolatında MİK₅₀/MİK₉₀ değerlerini 1-16 mg/L; 0,5-4 mg/L ve 0,25-4 mg/L olarak

bulmuştur. Çalışmamızdaki 13 izolat için ise bu değerler; 4-16 mg/L; 2-8 mg/L ve 0,125-4 mg/L olarak belirlendi. Duyarlılık oranlarındaki farklılıkların çalışma için seçilen grubun özellikleriyle (ilaç dirençli, biyofilm oluşturma yeteneği olan vb.) bağlantılı olduğu düşünüldü.

S. maltophilia' da florokinolon direncinin artmakta olduğunu belirten bir çalışmada (Pien 2015) LEV' ye dirençli bulunan ve duyarlı olan kontrol grubu olmak üzere iki ayrı grup değerlendirilmiştir. Kökenlerin izole edildiği hastalara ait demografik veriler, önceden antibiyotik kullanımı olup olmadığı konusunda bilgiler ve diğer özellikler de kayıt altına alınmıştır. Ek olarak dirence neden olabilecek *SmeA*, *SmeD* ve *SpgM* genleri de araştırılmıştır. Ancak duyarlı ve dirençli gruplar arasında gen varlığı ve risk faktörleri ile ilgili olarak anlamlı fark görülmemiştir. LEV' ye duyarlı olan izolatların CIP, TMP-SXT, tigesiklin, kolistin gibi diğer antibiyotiklere karşı da yüksek duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda LEV direncine bağlı olarak böyle bir ilişki görülmemiştir. Oranlar hakkında doğru yorum yapabilmek için çalışmamızdaki örnek sayısının yeterli olmadığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda 13 izolattan 8'inin hastanedeki çocuk kit ünitesi, çocuk-YBÜ, çocuk yenidoğan-YBÜ gibi çocuk ile ilişkili bölümlerden gelen örneklerden izole edildiği tespit edilmiştir. Sadece bir izolatta TMP-SXT direnci gözlenmiştir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada 2006-2011 yılları arasında izole edilen 618 *S. maltophilia* suşu retrospektif olarak değerlendirmiş ve izolatların en sık YBÜ' den (%39,8) izole edildiği görülmüş, TMP-SXT dirençli *S. maltophilia* izolatlarının da %49,9' unun yine YBÜ' de saptandığı belirtilmiştir (Özkaya 2014). Neonatal YBÜ' den yaklaşık 7 günlük bir dönem içerisinde izole edilen 3 *S. maltophilia* izolatı ile yapılan bir çalışmada suşların hepsi CIP ve TMP-SXT' ye duyarlı bulunmuş, genotipik olarak da benzer bant profillerine sahip oldukları görülmüştür (Gülcan 2004). İstanbul' da YBÜ' de salgın şüphesiyle yapılan bir çalışmada *S. maltophilia* izole edilen beş hasta izlenmiş ve suşların tamamı TMP-SXT' ye duyarlı bulunmuştur. İki hastadan izole edilen suşlar ise in-vitro olarak CIP' ye dirençli bulunmuştur (Yıldırım, 2009). Ankara' da yapılan beş yıllık bir sürveyans çalışmasında nozokomiyal izolatların %1,6'sı *S. maltophilia* olarak izole edilmiş ve bu izolatlara karşı en etkili antibiyotiklerin sırasıyla TMP-SXT (direnç %21,9) ve CIP (direnç %22,5) olduğu görülmüştür (Dizbay 2009). Gaziantep'te yapılan bir çalışmada %48,6'sı YBÜ'den

olmak üzere 74 *S. maltophilia* suşu izole edilmiş ve bu suşlara en etkili antibiyotiklerin TMP-SXT (direnç %2,7) ve CIP (direnç %9,5) olduğu bulunmuştur. Üçüncü kuşak Sefalosporinlerin ise tedavide yer alamayacağı belirtilmiştir (Zer, 2009). Konya’da yapılan bir çalışmada *S. maltophilia* infeksiyonlarının en sık pediatri kliniğinde görüldüğü ve suşlara en etkili antimikrobiyal ilaçların TMP-SXT (direnç %10) ve LEV (direnç %20) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca LEV’ ye dirençli tüm suşların aynı zamanda TMP-SXT’ ye de dirençli olduğu saptanmıştır (Türk-Dağı 2011). Van’da yürütülen bir çalışmada (Çıkman 2016) 118 *S. maltophilia* kökeninde CAZ, TMP-SXT, CAP ve LEV’ ye karşı direnç oranlarını sırasıyla, %72; %20,3; %18,2 ve %7,6 olarak belirlemiştir. İzolatların % 51’i pediatrik hastalardan elde edilmiştir.

Genotiplendirmede PFGE metodu üstün ayırım gücü nedeniyle en güvenilir sonuçları verse de zaman alıcı olması, özel ekipman ve eğitimli personel gerektirmesi nedeniyle her laboratuvar için uygulanabilir bir yöntem değildir. Bu nedenle tiplendirme amacıyla kolay uygulanabilecek alternatifler olarak PCR tabanlı çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Adamek 2011, Lin 2008). Bu çalışmada antibiyotik direnci saptanmış *S. maltophilia* izolatlarının moleküler tiplendirilmesi, M13 universal primerleri kullanılarak PZR ile yapılmıştır. Temel olarak klonal ilişkili olarak üç grup tespit edilmiştir. Elde edilen moleküler profile göre duyarlılıkları ve/veya biyofilm oluşturma kapasiteleri bakımından ayırt edilebilecek farklılıkta olan gruplara rastlanmamıştır.

Lin ve ark. (2008), 20 *S. maltophilia* klinik izolatında PFGE ve PZR tabanlı 3 yöntem kullanarak (enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PZR), BOX-PZR, ve repetitive extragenic palindromic (REP)-PZR) bunların tiplendirmedeki ayırım gücünü karşılaştırmıştır. BOX-PZR ve REP-PZR’yi PFGE’ye alternatif gösterebilecek derecede başarılı bulurken ERIC-PZR’yi yanlış eşleşmeler ve ayırım gücünün iyi olmaması nedeniyle yetersiz bulmuştur. REP-PZR’yi ise BOX-PZR’ye göre ayırım gücü ve net olarak gözlenebilen parmak izi görüntüleri sağlaması nedeniyle daha başarılı bulmuşlardır. Ayrıca yürütülen bu çalışmada, REP-PZR yönteminin *S. maltophilia* izolatlarının tiplendirilmesinde ilk defa uygulandığını da belirtmişlerdir.

Adamek ve ark. (2011) çalışmalarında izolatlarını tiplendirmek için REP-PZR ve *gyrB* gen sekanslama yöntemini kullanmıştır. Gen profilleri, REP-PZR ile 12, *gyrB* gen sekanslama ile sekiz alt gruba ayrılmış ve gruplardan sekiz tanesindeki izolatların aynı olduğu gözlenmiştir. REP-PZR'in daha çok sayıda grup oluşturması nedeniyle ayırım gücünün daha yüksek ve diğer yönteme kıyasla daha başarılı bulunduğu belirtilmiştir.

Meksika'da *S. maltophilia* izolatlarında antibiyotik direnci ve klonal ilişkinin değerlendirildiği ilk epidemiyolojik çalışma olduğu belirtilen bir araştırmada (Flores-Trevino 2014) PFGE ile tiplendirme yapılarak 119 izolatın 89 tipe ayrıldığı görülmüş ve bunların sadece %21,6'sı dokuz klonda toplanmıştır. Hastane ortamında düşük oranda çapraz direnç geliştiği belirlenmiş ve çok fazla sayıda farklı klon bulunmasının antibiyotik direnci ile klonal ilişkinin birlikte değerlendirilmesini güçleştirdiği bildirilmiştir. Daha geniş sürveyans çalışmalarına ve ek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir. Bazı antibiyotiklere yüksek, TMP-SXT' ye ise orta düzeyde direnç (% 32,8) saptanmıştır. Tüm izolatların biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur.

Malezya'da yapılan bir çalışmada (Neela 2012), MN ve TMP-SXT *S. maltophilia*' ya karşı en etkili ilaçlar olarak değerlendirilmiş ve izolatların genetik olarak farklı bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Homolog izolatların farklı hastalardan izole edildiği durumlar ise çapraz kontaminasyon ihtimalini düşündürmüştür. Macaristan' da yapılan bir çalışmada (Juhász 2014) TMP-SXT, *S. maltophilia*' ya karşı en etkin antibiyotik olarak bulunurken, florokinolonların da gerektiğinde iyi bir alternatif olabileceği bildirilmiştir. ERIC-PCR ile suşların heterojen bir dağılımı olduğu görülmüş ve hastanede bir salgın olmadığı düşünülmüştür.

Mikroorganizma topluluklarının yaşadıkları alanda biyofilm tabakası oluşturmaları onlara antimikrobiyal maddelere karşı dayanıklılık, konak savunmasından kaçabilme yeteneği vb. özellikle solunum yolu enfeksiyonu olmak üzere pek çok enfeksiyonun patogenezinde etkili olan özellikler kazandırır (Temel ve Eraç 2018, Zhuo 2014). *S. maltophilia* izolatları canlı (konak dokuları) ve cansız yüzeylerde (teflon, cam, plastik) biyofilm oluşturarak tutunabilmektedir. Biyofilm oluşumunda etkili olduğu bildirilen bazı genler bulunmaktadır. Klinik *S. maltophilia* izolatlarında biyofilm üretiminin ve biyofilm oluşumuna etkisi olduğu düşünülen *rmlA*, *spgM* ve *rpfF*

genleri ile biyofilm arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada (Zhuo 2014), bu genlerin biyofilm oluşumuna katkı sağladığı ancak biyofilm oluşturma düzeylerinde belirgin etkilerinin olmadığı sonucuna varılmıştır. İzolatlar önceden PFGE ile genotiplendirilmiş ve çalışmaya alınan toplam 37 izolatın 24 klonda toplandığı belirlenmiştir. Biyofilm çalışması temsilci seçilen 24 izolat ile gerçekleştirilmiş ve 8 izolatın güçlü düzeyde biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Biyofilm oluşumu kristal viyole deneyi ile tespit edilmiş, sonrasında elektron mikroskobu (scanning electron microscopy: SEM) ve konfokal mikroskop (CLSM) ile doğrulanmıştır.

Çeşitli antibiyotiklerin, *S. maltophilia*'nin aderansına etkisinin test edildiği ilk çalışma olduğu belirtilen bir araştırmada (Bonaventura 2004), SXT ve CAZ *S. maltophilia* enfeksiyonlarında sıklıkla kullanıldığı için, florokinolonlar gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin biyofilmleri üzerindeki dikkat çeken etkileri nedeniyle tercih edilmiştir. Tüm florokinolonlar (CIP, LEV, MOK, grepafloksasin, norfloksasin, ofloksasin, rufloksasin) ½ MİK olarak kullanıldığında aderansı belirgin olarak azaltmıştır. CAZ ve SXT ise ½ MİK ve ¼ MİK değerlerinde aderansa hiç etki etmemiştir. Çalışmada ayrıca biyofilm oluşumunun kinetiği izlenmiş, 2 saat inkübasyon sonunda bakterilerin polisitiren yüzeylere hızla tutunduğu zamanla biyofilm oluşumunun arttığı ve 24 saatin sonunda maksimum yoğunluğa eriştiği gözlenmiştir. Biyofilm oluşumu kristal viyole deneyi ve elektron mikroskop (transmission electron microscopy: TEM, SEM) analizleri ile tespit edilmiştir.

Wang ve ark. (2016), 45 *S. maltophilia* izolatı ile yürütülen çalışmalarında yüksek biyofilm oluşturma oranını %77,8; orta ve zayıf biyofilm oranını ise sırasıyla %15,6 ve %4,4 olarak tespit etmiştir. Bir izolatta ise biyofilm oluşumuna rastlanmadığı belirtilmiştir. Biyofilm belirlemek için plak boyama yöntemi kullanılmış ve SEM analizi ile sonuçlar doğrulanmıştır.

İtalya'da yapılan bir çalışmada kistik fibroz ve kistik fibroz olmayan hastalar ile çevreden izole edilen *S. maltophilia* kökenlerinde biyofilm oluşturma kapasitesi de dahil pek çok virulans faktörü değerlendirilmiş ve fenotipik olarak aralarında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Moleküler olarak da bu kökenlerin farklı genotipik profile sahip olduğu gösterilmiştir (Pompilio 2011).

Çalışmamızdaki izolatlardan sadece ikisinin orta düzey diğerlerinin ise yüksek düzey biyofilm üretme kapasitesine sahip olduğu görüldü. Biyofilm üretme düzeyi, moleküler profili ve antibiyotik duyarlılık profili ile ilgili olarak ortak bir özelliğe rastlanmadı. Bu durumun antibiyotik duyarlılığını kontrol eden ve biyofilm oluşumunu düzenleyen farklı özellikler veya moleküler mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünüldü.

6. Sonuç ve Öneriler

Stenotrophomonas maltophilia önemli bir fırsatçı patojendir, pek çok antibiyotiğe doğal dirençli olması, neden olduğu enfeksiyonların tedavisini güç hale getirmektedir. Günümüzde tedavisi için sık tercih edilen TMP-SXT ve LEV gibi antibiyotiklere karşı gelişmekte olan direnç ise tedaviyi daha da zorlaştırabilir. Bu nedenle gereksiz antibiyotik kullanımının engellenmesi, antibiyotik duyarlılıklarının düzenli olarak takip edilmesi, tedavide çalışmalarda elde edilen verilerin dikkate alınması, eğer mümkünse yatış sürelerinde kısıtlama yapılması, yataklı servislerde kolonizasyonu önleyici tedbirlerin alınması, temizlik ve hijyen kurallarına uyulması ve sağlık personeline uygun eğitim verilmesi gibi uygulamalar yararlı olacaktır.

Ayrıca *S. maltophilia*'nin yüksek oranda biyofilm oluşturma eğilimi olduğundan, hastanede özellikle YBÜ'de dikkatle takibi gerekmektedir. Bunun için de hastanede özellikle antibiyotiklere karşı yüksek oranda dirençli bulunan ve biyofilm oluşturabilen bakterilerden kaynaklanan salgınları tespit etmek ve moleküler yöntemlerle fenotiplerin yanısıra genotipleri de izlemek salgınların önlenmesi için önemli bir adım olacaktır. Ülkemizde, maddi yetersizlikler, uygun olmayan laboratuvar koşulları, bu alanda uzmanlaşmış personel yetersizliği vb. çeşitli nedenlerle tiplendirme amacıyla moleküler yöntemlerin kullanımı çok yaygın değildir. Ancak yaygınlaşması halinde daha büyük ve önemli kazançlar sağlanacağından, bu gibi yöntemlerin hastanelerdeki kullanımının artması desteklenmelidir. Ayrıca, direnç gelişiminin mekanizmaları, biyofilm oluşumunu kolaylaştıran veya önleyen faktörler ile başarılı bir şekilde tiplendirme yapabilen moleküler yöntemlerin geliştirilebileceği ileri düzey çalışmalar desteklenmeli ve yaygınlaştırılmalıdır.

7. Kaynaklar

- Abbassi, M.-S., Touati, A., Achour, W., Cherif, A., Jabnoun, S., Khrouf, N. ve Ben Hassen, A. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* responsible for respiratory infections in neonatal intensive care unit: antibiotic susceptibility and molecular typing. *Pathologie Biologie*, 57, (s. 363-367).
- Abbasoğlu U. ve Onurdağ F. K. (2011). Antimikrobiyal Ajanlar. Abbasoğlu U. ve evikbaş A. (Ed.), *Farmasötik Mikrobiyoloji* (1. Baskı) (s.84-135). Ankara: Efil.
- Adamek M., Overhage J., Bathe S., Winter J., Fischer R. ve Schwartz T. (2011). Genotyping of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and their pathogenic potential. *PLoS ONE* 6(11), (e27615). doi:10.1371/journal.pone.0027615
- Aydın D. (2014). Antibakteriyel Ajanlar. Başustaoğlu A. C. (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji* (6. Baskı) (s. 199-2018). Ankara: Atlas Kitapılık.
- Brooke, J. S. (2012). *S. maltophilia* a mutiple-drug-resistant pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), (s. 2-41). doi:10.1128/CMR.00019-11
- Brooke, J. S. (2014). New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug resistant opportunistic pathogen. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(1), (s. 1-4).
- Büyük, A., Yılmaz, F. F., Gül-Yurtsever, S., Hoşgör-Limoncu, M. (2017). Antibiotic resistance profiles and genotypes of *Acinetobacter baumannii* isolates and *in vitro* interactions of various antibiotics in combination with tigecycline and colistin. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*, 14(1), (s. 13-18).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 12th ed. CLSI document M02-A12. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard; 25th informational supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Di Bonaventura G., Spedicato I., D'Antonio D., Robuffo I. ve Piccolomini R. (2004). Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), (s. 151-160).
- Di Bonaventura G., Stepanovic S., Picciania C., Pompilio A. ve Piccolomini R. (2007). Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiologica*, 52(1), (s. 86-90).
- Çetinkaya, E. ve Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide kullanılan moleküler teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1), (s. 53-62).
- Çıkman A., Parlak M., Bayram Y., Güdücüoğlu H. ve Berktaş M. (2016). Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. *African Health Sciences* 16(1), (s. 149-152).
- Çıragil P. (2014). *Pseudomonas* ve ilişkili bakteriler. Başustaoğlu A. C. (Ed.), *Tıbbi Mikrobiyoloji* (6. Baskı) (s. 333-341). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Dizbay, M., Güzel Tunçcan, Ö., Maral, I., Aktaş, F. ve Şenol, E. (2009). Five years surveillance of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* infections in Gazi University Hospital. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29(6), (s.1406-1411).
- Dülger, D. ve Berktaş, M. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının klinik önemi. *Van Tıp Dergisi*, 14(3), (s.90-95).
- Flores-Trevino, S., Gutierrez-Ferman, J.L., Morfin-Otero, R., Rodri'guez-Noriega E., Estrada-Rivadeneira D., Rivas-Morales C., ... Garza-Gonzalez E. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and klonal diversity. *Journal of Medical Microbiology*, 63, (s.1524-1530). doi: 10.1099/jmm.0.074385-0

- Grillon A., Schramm F., Kleinberg M. ve Jehl F. (2016). Comparative activity of ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* assessed by minimum inhibitory concentrations and time-kill studies. PLoS ONE 11(6): e0156690. doi:10.1371/journal.pone.0156690
- Gulcan, H., Kuzucu, C. ve Durmaz, R. (2004). Nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection: three cases in newborns. AJIC: American Journal of Infection Control, 32(6), (s.365-368). doi:10.1016/j.ajic.2004.07.003
- Juhász, E., Krizsán, G., Lengyel, G., Grósz, G., Pongrácz, J. ve Kristóf, K. (2014). Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13(333), (s.1-7). doi: 10.1186/s12941-014-0058-9
- Kandemir İ., Özcan N., Alanbayı Ü., Bozdağ H., Akpolat N. ve Gül K. (2016). Klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının dağılımı ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Dicle Tıp Dergisi, 43(2), (s. 237-240).
- Kandemir, Ö. (2007). Çoğul dirençli bakterilerde tedavi yaklaşımı, *Stenotrophomonas maltophilia*. Erişim adresi: www.yogunbakimdergisi.org/managete/folder/2007-01/html/2007-7-1-151-157.html
- Lin, C.-W., Chiou, C.-S., Chang, Y.-C. ve Yang, T.-C. (2008). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates. Letters in Applied Microbiology, 47, (s. 393-398). doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02443.x
- Neela, V., Rouhani Rankouhi, S.Z., Belkum, A., Goering, R.V. ve Awang, R. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia* in Malaysia: molecular epidemiology and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance. International Journal of Infectious Diseases, 16, (s. 603-607).
- Özkaya, E., Aydın, F., Bayramoğlu G., Buruk, C.K. ve Sandallı C. (2014). Klinik örneklerden izole edilen trimetoprim-sülfametoksazole dirençli

Stenotrophomonas maltophilia suşlarında integron, sul1-2 ve dfr genlerinin araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 48(2), (s.201-212).

Pavel A. B. ve Vasile C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. BMC Bioinformatics, 13:9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>

Pien C.-J., Kuo H.-Y., Chang S.-W., Chen P.-R., Yeh H.-W., Liu C.-C. ve Liou M-L (2015). Risk factors for levofloxacin resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* from respiratory tract in a regional hospital. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 48, (s.291-295).

Pompilio, A., Pomponio, S., Crocetta, V., Gherardi G., Verginelli F., Fiscarelli E., ... Bonaventura G. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. BMC: BioMed Central Microbiology, 11, (s.159). doi:10.1186/1471-2180-11-159

Rossi, B.P., García, C., Calenda, M., Vayb, C. ve Franco, M. (2009). Activity of Levofloxacin and Ciprofloxacin on Biofilms and Planktonic Cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, (s.260-264).

Schaumann, R., Laurin, F. ve Rodloff, A.C. (2008). Molecular typing of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and random primer PCR fingerprinting. International Journal of Hygiene Environmental Health, 211, (s.292-298).

Şen, P., Yula, E., Er, H., Güngör, S., Özdemir, R., Baran, N., Demirdal, T. ve Demirci, M. (2017). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında antibiyotiklere direnç oranı. Ortadoğu Tıp Dergisi, 9(3), (s. 113-117).

Tanrıverdi Çaycı, Y., Karadağ, A., Yılmaz H., Yanık, K. ve Günaydın, M. (2013). *Stenotrophomonas maltophilia* klinik suşlarında antimikrobiyal direnç. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 43(1), (s. 22-25).

- Temel, A. ve Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 48(1), (s. 1-13).
- Türk Dağı, H., Arslan, U. ve Tuncer, İ. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik direnci. ANKEM: Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi, 25(1), (s.27-30).
- Wan, A., Wang, Q., Kudinha, T., Xiao, S. ve Zhuo, C. (2016). Effects of fluoroquinolones and azithromycin on biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. Scientific Reports, 6(29701), doi: 10.1038/srep29701
- Yağcı, A. (2001). İnfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik analizinde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri. Flora, 6(2): (s. 67-73).
- Yıldırım, F., Kart Yaşar, K., Şengöz, G., Yamanlar, R., Nayman, F. ve İdin, K. (2009). Erişkin yoğun bakım ünitesinde *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonu ve kontrolü. ANKEM: Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi, 23(4), (s.166-171).
- Zer, Y., Karaoğlan, İ., Çevik, S. ve Erdem, M. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının irdelenmesi. Klimik: Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Dergisi, 22(1), (s.21-24).
- Zhuo C, Zhao Q-y ve Xiao S-n (2014) The impact of *spgM*, *rpfF*, *rmlA* gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. PLoS ONE 9(10): e108409. doi:10.1371/journal.pone.0108409

Ekler

Ek 1



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Muhasebe Bürosu

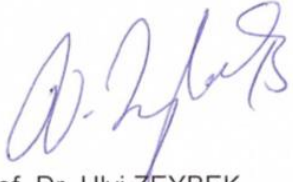
SAYI : 61058267 - 217
KONU : Kom.Kar. hk.

Bornova/İZMİR
11.11.2015

Sn;
Yar.Doç.Dr. Fethiye Ferda YILMAZ

"Klinik Stenotrophomonas Maltophilia Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıkları, Genotipik Profilleri ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri" isimli proje öneriniz, E.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun 22.10.2015 tarih ve 4/2 no'lu kararı ile 5.000 TL bütçe ve 15/ECZ/013 proje numarası ile kabul edilmiştir. İlgili kararda harcama taleplerinin Ekim-2015 tarihinden itibaren karşılanacağı bildirilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Ulvi ZEYBEK
Dekan

Teşekkür

Tez konusunun belirlenmesinde ve gerçekleştirilmesinde emeği geçen başta tez danışmanım Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ' a, üzerinde çalıştığımız *S. maltophilia* izolatlarını ve ilgili bilgileri sağlamamıza yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olan Prof. Dr. Sabire Şöhret AYDEMİR' e, uzmanlık eğitimini tamamlamış olan Uzm. Dr. Hale KALFAOĞLU' na ve uzmanlık öğrencisi Asistan Dr. Münevver KAYIN' a, çalışmamıza ve projemize destekleri nedeniyle Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI' ya, Doç. Dr. Bayrı ERAÇ'a, Prof. Dr. Mine HOŞGÖR-LİMONCU' ya ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN' a, anabilim dalı araştırma görevlileri ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler çalışmamızda jel görüntüleme amacıyla kullandığımız kemigörüntüleme cihazı (FX-Fusion7, Vilber-Lourmat, Germany) ve izolatların biyofilm özelliklerini değerlendirirken kullandığımız mikropalak okuyucu cihazı (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific,US) için Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) personeline teşekkür ederim. Bu çalışmanın gerçekleşmesine maddi destek sağlayarak (Proje No: 15-ECZ-013, (Ek 1)) katkıda bulunan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Destekleme Komisyonuna teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreçte daima yanımda olan ve sabır ve sevgi ile desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen sevgili eşim Derya YALÇINKAYA' ya, bugünlere gelmemi sağlayan eğitim hayatımda ve verdiğim kararlarda yol gösteren değerli aileme ve dostlarıma, çok teşekkür ederim.

İzmir-2019

Serhat YALÇINKAYA

Özgeçmiş

1988 yılında Konak/İzmir’ de doğdu. 2006 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2010 – 2012 yılları arasında WWF – Türkiye Doğal Yaşamı Koruma Vakfı’nda Deniz Kaplumbağaları Koruma ve İzleme Projesinde Biyolog olarak çalıştı. 2013 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2017 - 2018 yılında Ankara 4. Kolordu Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığında Sağlık Asteğmen olarak askerlik görevini tamamladı. 2018 yılı Haziran ayında Derya YALÇINKAYA ile evlendi, eşi ile beraber İzmir’de yaşamaktadır.

e-posta: serhat.sentez@gmail.com