

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PİGMENTLİ VE PİGMENTSİZ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Salih MAÇIN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2014

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PİGMENTLİ VE PİGMENTSİZ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Salih MAÇİN
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ**

**ANKARA
2014**

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ’a göstermiş olduğu özveri için teşekkürlerimi sunarım.

Başta bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Cumhur ÖZKUYUMCU olmak üzere Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimim süresince her zaman desteğini hissettiren ve yardımcı olan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Değerli katkılarını sakınmayan, öğrenim sürecim boyunca ilgi ve desteklerini hissettiğim Prof. Dr. Sibel Ergüven, Prof. Dr. Burçin Şener ve Doç. Dr. Alparslan ALP ‘e teşekkür ederim.

Bu tezin gerçekleşmesinde verdikleri destekten ötürü tüm teknik ekibe teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Aslı Çakar ve Dr. Özlem Doğan Ayçık’a ve diğer arkadaşlarıma bu süreç boyunca yanımda oldukları için teşekkürü bir borç bilirim.

Daima yanımda olan, sevgili eşim Gülay MAÇİN’e sevgisi ve desteğinden ötürü teşekkür ederim. Varlığı ile ailemize mutluluk katan sevgili oğlum Mert MAÇİN’e teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca desteklerini ve sonsuz sevgilerini benden esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime, her zaman yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Maçın, S. Pigmentli Ve Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Fenotipik Ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014. *Pseudomonas aeruginosa* aerob, sporsuz, hareketli, düz veya hafif kıvrımlı, 42 C°de üreyebilen Gram negatif basillerdir. *P. aeruginosa*; son yıllarda artan insidansı, ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkenidir. Bu çalışmadaki amacımız pigment üreten ve pigment üretmeyen *P. aeruginosa* suşları arasındaki virulans faktörlerinin karşılaştırılmasıdır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hastalara ait örneklerden izole edilen ve *P.aeruginosa* olarak tanımlanan suşlar çalışmaya dahil edildi. Hasta suşları (n:100) iki ana gruba ayrıldı. Birinci gruba; kistik fibrozis tanısıyla takip edilen ve *P. aeruginosa* izole edilen hastaların suşları (n:50) alındı. İkinci gruba ise pü, idrar, yanık yarası, beyin omurilik sıvısı ve balgam gibi çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşları alındı. Her iki ana grupta izole edilen *P. aeruginosa* suşları pigment üretimlerine göre de kendi içinde eşit sayıda (n:25) iki gruba ayrıldı. Tüm suşların antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartlarına göre yapıldı. Fenotipik testler olarak DNaz, proteaz, elastaz, hemoliz ve hareket testi çalışıldı. Genotipik testler olarak ise “quorum sensing” mediatörleri olan *rhlA* ve *rhlB* ve virulans ile ilişkili genleri kodlayan ekzotoksinler olan T (*exoT*), S (*exoS*), U (*exoU*) ve Y (*exoY*) bölgeleri Real-time PCR yöntemiyle çalışıldı. *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre virulans faktörleri incelendiğinde, elastaz aktivitesi ve mukus üretimi pigment üreten ve üretmeyen suşlarda benzer bulunmuştur. Proteaz aktivitesi ve hemoliz varlığı pigment üreten *P. aeruginosa* suşlarında pigment üretmeyen suşlara göre daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Hareket özelliğinde pigment üreten suşlarda pigment üretmeyen suşlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. DNaz aktivitesi ise pigment üretmeyen suşlarda pigment üretenlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Pigment üretmeyen *P. aeruginosa* suşlarında pigment üreten suşlara göre daha yüksek antibiyotik direnç oranları saptanmıştır. Pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörleri incelendiğinde; pigment üreten suşların *rhlB*, *exoS* ve *exoY* virulans gen bölgelerine pigment üretimi olmayan suşlara göre daha fazla sahip oldukları görülmüştür ($p \leq 0.05$). *ExoT* gen bölgesi de yine pigment üretimi olan suşlarda daha fazla saptanmıştır. Bu sonuçlar pigment üretimi olan *P. aeruginosa* suşlarının hem fenotipik virulans faktörlerinin hem de genotipik virulans faktörlerinin pigment üretmeyen suşlara göre daha fazla sahip olduklarını göstermektedir. Edinilen sonuçlara göre pigment üretimi virulansı değerlendirmek açısından önemli bir belirteç olarak kabul edilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, virulans, kistik fibrozis, pigment

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 17388665/285)

ABSTRACT

Maçin, S. Comparison of Virulence Factors in Pigmented and Non-Pigmented *Pseudomonas aeruginosa* By Using Phenotypic and Genotypic Tests. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Microbiology, Ankara, 2014.

Pseudomonas aeruginosa is an aerobic, motile, non-spore forming, straight or slightly curved, gram-negative bacilli and it can grow at 42 °C. The incidence of *P. aeruginosa* has been increased in recent years and its virulence factors are various. It has high morbidity and mortality and its rates of antibiotic resistance is increasing constantly. The aim of this study was to compare the differences in the virulence factors of pigmented and non-pigmented *P. aeruginosa* isolates. Isolates of patients that were identified as *P. aeruginosa* were included into the study. Identification was done in Hacettepe University Medical Faculty Microbiology Laboratory. Strains of patients (n: 100) were divided into two main groups. In the first group, strains were isolated from cystic fibrosis patients (n: 50). In the second group, the strains which were isolated from various body parts (pus, urine, burn wounds, sputum, and cerebrospinal fluid) included (n: 50). The isolated *P. aeruginosa* strains from both main groups were divided into two subgroups according to their pigment production (n: 25). Antibiotic susceptibility tests of all strains were performed by disk diffusion method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standards. DNase, protease, elastase, haemolysis and motility tests were performed as phenotypic tests. The presence of several virulence-associated genes encoding exotoxins T (*exoT*), S (*exoS*), U (*exoU*) and Y (*exoY*) and quorum sensing mediators (*rhlA* and *rhlB*) were assessed by Real-time PCR method for genotypic identification. The relationship between pigment production, antibiotic resistance and virulence factors were examined. There was no significant difference between pigmented and non-pigmented isolates when elastolytic activity and mucus production were compared. Pigmented isolates produced significantly more ($p \leq 0.05$) protease and haemolysis activity. Motility was present in pigmented isolates more frequently than in non-pigmented isolates. DNase activity was significant in pigmented isolates then non-pigmented isolates ($p \leq 0.05$). Antibiotic resistance was present more frequently in non-pigmented isolates than pigmented isolates. Pigmented isolates had more frequently and significant more ($p \leq 0.05$) virulence-associated genes *rhlB*, *exoS*, *exoY* ($p \leq 0.05$). *ExoT* was present in pigmented isolates more frequently than in non-pigmented isolates. The results of this study suggest that both phenotypic and genotypic virulence factors are associated with the pigment production in *P. aeruginosa*. Pigment production is easy to determine, which might be a good starting point to identify the virulence status of an isolate.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence, cystic fibrosis, pigment

Supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (Project no: 17388665/285)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	3
2.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın mikrobiyolojik özellikleri	3
2.1.2. Epidemiyoloji ve bulaş	6
2.1.3. Virulans faktörleri ve patogenezi:.....	7
2.1.4. Biyofilm oluşumu	12
2.1.5. “Quorum Sensing” ve virulans faktörlerin üretimi.....	13
2.1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> enfeksiyonları	15
2.1.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tanısı	18
2.1.8. <i>P. aeruginosa</i> suşlarında antimikrobiyal direnç	18
2.1.9. Kistik fibrozis	19
2.1.10. Mikrobiyolojik etkenler	21
2.1.11. Kistik fibroziste klinik bulgular.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. <i>P. Aeruginosa</i> Suşları	24
3.2. Besiyerleri	25
3.2.1. <i>Pseudomonas</i> F agar (King B).....	25
3.2.2. <i>Pseudomonas</i> P agar (King A).....	25
3.2.3. Kanlı agar.....	25
3.2.4. “Brain-Heart Infusion” agar (BHI).....	25
3.2.5. “Brain-Heart Infusion” (BHI) sıvı besiyeri	26

3.2.6. “Skim milk” agar	26
3.2.7. DNase Test Agar (Difco).....	26
3.2.8. Mc Conkey agar.....	26
3.2.9. Luria bertani (LB) sıvı besiyeri (Sigma)	27
3.2.10. Hareket besiyeri	27
3.2.11. Mueller Hinton Agar.....	28
3.2.12. “Triple sugar iron” agar (üç şekerli demirli agar).....	28
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi	29
3.4. Elastaz Üretiminin Saptanması:	30
3.5. Alkali Proteaz Üretiminin Saptanması	31
3.6. Pigment varlığının ve tipinin değerlendirilmesi	31
3.7. Hemoliz testi.....	34
3.8. Hareket testi.....	35
3.9. DNaz testi	36
3.10. Mukoid koloni varlığı.....	37
3.11. Virulans faktörlerinin Real-Time PCR ile araştırılması.....	38
3.12. İstatistiksel değerlendirme.....	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	54
SONUÇLAR	63
6. KAYNAKLAR	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

QS	: “Quorum Sensing”
AI	: Otoindükleyici
QSSM	: “Quorum Sensing” Sinyal Molekülü
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
HSL	: Homoserin Lakton
3-oxo-C12-HSL	: N-3-oksododekanol-homoserin lakton
C4-HSL	: N-bütiril-homoserin lakton
PQS	: Pseudomonas kinolon Sinyal
SAM	: S-adenozil metiyonin
TSA	: Triptik Soy Agar
LB	: Luria Bertani
µg	: mikrogram
ml	: mililitre
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid
BHIB	: Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Buyyon
EMB	: “Eosin methylene blue” agar
TSİ	: Üç şekerli demirli agar (triple sugar iron agar)
SMA	: “Skim Milk” Agar
CLSI	: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
ABC	: “Adenosine Triphosphate Binding Cassette”
IL-8	: İnterlökin-8
KF	: Kistik Fibrozis
KFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
PCN	: Piyosiyanin
PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir tepkimesi)

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Biyofilmin 7. ve 14. günde çelik yüzeydeki görüntüsü.	13
Şekil 2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'da "Quorum Sensing" sistemi	14
Şekil 2.3. Nötropenik hastada <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya bağlı ektima gangrenosum.	16
Şekil 2.4. KF'li hastaların yıllara göre yaşam süreleri.	20
Şekil 2.5. Kistik fibrozisli hastalarda saptanan patojenlerin yaşa göre değişen saptanmasıklıkları.	22
Şekil 3.6. Elastaz üretiminin mikropakta saptanması	30
Şekil 3.7. Alkali proteaz üretiminin "skim milk" agar üzerinde saptanması	31
Şekil 3.8. Pigment varlığının Mueller Hinton agar üzerinde gösterilmesi.....	32
Şekil 3.9. King A ve King B agardaki üremelerin günışığındaki görünimleri	33
Şekil 3.10. Piyosiyanin pigment varlığının King A ve King B agar üzerinde floresan mikroskop altında incelenmesi	33
Şekil 3.11. Piyoverdin pigment varlığının King A ve King B agar üzerinde floresan mikroskop altında incelenmesi	34
Şekil 3.12. Hemoliz varlığının %5 koyun kanlı agarda gösterilmesi.....	35
Şekil 3.14. DNaz varlığının DNaz agarda gösterilmesi	37
Şekil 3.15. Kanlı agarda mukoid koloni görünümü	37

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmamızda kullanılan primer dizileri.....	38
Tablo 4.2. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antibiyotik direnç oranları	41
Tablo 4.3. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri vücut bölgelerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı	42
Tablo 4.4. Pigment üreten <i>P. aeruginosa</i> suşlarının (n: 50) vücut bölgelerine göre pigment türlerinin dağılımı	43
Tablo 4.5. Tüm <i>P. aeruginosa</i> suşlarının (n: 100) virulans faktörlerinin değerlendirilmesi	43
Tablo 4.6. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının pigment üretimlerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı	44
Tablo 4.7. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının pigment üretimlerine göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması	45
Tablo 4.8. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının pigment türlerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı (n:50)	46
Tablo 4.9. Pigment türüne göre antibiyotik direnç oranları (n:50)	47
Tablo 4.10. Kistik fibrozis hastalarından ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının virulans faktörlerinin karşılaştırılması	48
Tablo 4.11. Kistik fibrozis hastalarından ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen <i>P. aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması	49
Tablo 4.12. <i>P. aeruginosa</i> suşlarında mukoid koloni varlığı ve virulans faktörlerinin karşılaştırılması	50
Tablo 4.13. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı	51
Tablo 4.14. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri vücut bölgelerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı	52

Tablo 4.15. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının pigment türlerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı (n:50)	53
--	----

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa; aerob, sporsuz ve hareketli Gram negatif bir basildir. Hidrofilik olduğu için lavabolardan, sebzelerden, nehir sularından ve hatta antiseptik solusyonlardan rahatlıkla izole edilebilir. Sağlıklı insanlarda nadiren kolonize olur (1). Sık antibiyotik kullanan kişilerde gastrointestinal kolonizasyon olabilmektedir. Kanser tedavisi görenler, mekanik ventilasyona bağlı hastalar, nötropenik olanlar ve yanık hastaları *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı ciddi risk altındadır.

P. aeruginosa, tipik koloni morfolojisi, pigmentleri ve üzüksü kokusuyla kolaylıkla tanınabilir. Pozitif oksidaz ve arjinin reaksiyonları ve üç şekerli demirli besiyerinde alkale renk değişimi ile tanı doğrulanabilir.

P. aeruginosa çeşitli genler aracılığı ile hücre dışı proteinler ile ilişkili virülans faktörleri salgılar. Adezinler, pyosiyenin, elastaz, proteazlar, hemolizinler, ekzotoksin ve ekzoenzim S *P. aeruginosa* suşlarında tanımlanmış virülans faktörleridir (2). Elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar. Siderofor proteinleri, bakterinin konak hücrelerden demiri kazanmasını sağlarlar (3). Pigment üretiminin de çeşitli virülans genleriyle ilişkisi gösterilmiştir (4).

P. aeruginosa birçok antibiyotiğe karşı içsel dirence sahiptir. Başlıca iki mekanizma vardır; ampisilin, amoksisilin amoksisilin-klavulanat, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefotaksim ve seftriaksona direnci sağlayan indüklenebilir kromozomal AmpC beta laktamazlar ve çeşitli atım pompa sistemeleri (5). Geniş spektrumlu penisilinler, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar, aminoglikozidler ve kolistin bu içsel direncin üstesinden gelebilir. Bu antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç gelişebilir.

Kistik fibrozis hastalarının solunum yollarından en sık izole edilen patojen *P. aeruginosa*'dır (6). *P. aeruginosa* konağa bir kez yerleştikten sonra genelde kalıcı olur ve mukoid koloni morfolojisi, hareket kaybı, çeşitli ekzotoksinlerin ve diğer ürünlerin hipoekspresyonu gibi bazı değişikliklere uğrar (7-9). Kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde bulunan *P. aeruginosa*'nın non-mukoid fenotipten

mukoid fenotipe dönüşümü genellikle solunum fonksiyonlarında hızlı bir düşüşe ve kötüleşen prognoza neden olmaktadır. Ayrıca kistik fibrozis hastalarının sık sık antibiyotik kullanmaları birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli suşlarla kronik olarak enfekte olmalarına neden olmaktadır (10).

P.aeruginosa enfeksiyonlarında farklı bölgelere kolonizasyon ve enfeksiyondan sorumlu suşların virülans farklılıkları yeterince ortaya konmamıştır. Ayrıca pigmentli olan *P. aeruginosa* suşları ile pigment üretmeyen suşlar arasındaki ve kistik fibrozis gibi sık enfekte olan hasta grubuyla diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlar arasındaki virülans faktörleri arasındaki farklar da yeterince çalışılmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız kistik fibrozis hastalarından izole ettiğimiz balgam örnekleriyle, diğer vücut bölgelerinden izole ettiğimiz pigment üreten ve pigment üretmeyen *P.aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerini fenotipik ve genotipik olarak incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas cinsi *Pseudomonadaceae* ailesi içinde yer alan suda ve toprakta yaşayan büyük bir non-fermentatif bakteri topluluğudur. İnsanların yanı sıra bitki ve hayvanlarda da enfeksiyon oluşturabilmektedirler. *Pseudomonas* cinsinde en sık izole edilen insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *Aeruginosa* adı birçok klinik izolattaki koloniler içinde görülen yeşil-mavi renkten kaynaklanmaktadır. Ondokuzuncu yüzyıl başlarında yaralarda, özellikle de ameliyat yaralarında mavi-yeşil renkli cerahat etkeni olarak göze çarpan *P. aeruginosa* 1882'de Gessard tarafından tanımlanmıştır (44). Bu cinste bulunan bakteriler rRNA homoloji sonuçlarına göre beş grupta incelenmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* homoloji grup I'de bulunmaktadır. Farklı özelliklere sahip olan homoloji grup II'de bulunan türler *Burkholderia* cinsi içine alınmıştır (11).

2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın mikrobiyolojik özellikleri

P. aeruginosa; 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olabilen basil veya kokobasil morfolojisinde Gram negatif boyanan bakterilerdir. Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor ve kapsül oluşturmazlar. *P. aeruginosa* uçta bulunan tek polar flajeli ile hareketlidir. Diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flajel bulunabilir (12).

Zorunlu aerobtur, ancak oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO₃ varsa yaşamını devam ettirir. *Pseudomonas* bakterilerinin mezofil, psikrofil veya psikotrof türleri vardır. En iyi 37°C'de olmakla beraber, 20-42°C arasındaki ısılarda üreyebilir. *P. aeruginosa*'nın 42°C'de de üreyebilme özelliği *P. putida* ve *P. fluorescens*'den ayırmaktadır. *Pseudomonas* türleri pH=5.6 ve pH=8.0 arasında üremelerine rağmen en iyi pH=6.6-7.0 aralığında ürerler. Kolay üreyen bakterilerdir. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla üredikleri için izolasyonları kolaydır.

P. aeruginosa besiyerlerinde çeşitli koloni morfolojilerinde görülebilmektedir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturmaz. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken daha virulan olan diğer tipte bir tür ekzopolisakkarit olan alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir (13). Kistik fibrozis hastalarından, kronik obstrüktif pulmoner hastalığı olan hastalardan izole edilen suşlar sıklıkla mukoid koloni (M koloni) şeklindedir. Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondulan yapıda koloniler oluşturmaz. Genellikle kanlı agarda beta hemoliz oluşturmazlar. “Eosin methylene blue” (EMB), McConkey ve Endo agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. Besiyerinde, triptofan 2-aminoasetofenon sebebiyle tatlımsı aromatik meyve veya tatlı üzüme benzeyen *P. aeruginosa*’ya özgü bir kokusu vardır (14).

Çoğu *Pseudomonas* suşları kültür ortamında pigment üretirler. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur yada aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, oda sıcaklığında daha iyi oluşurlar.

Fluoresan pigmentler, fluoresans özellik taşıyan *Pseudomonas*’ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristik özelliğidir. Bu pigmentler sideroforlardır ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler.

Piyoverdin (“flouressein”), kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir fluoresan pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulur. King B besiyerinde klinik izolatların birçoğu bu pigmenti oluşturur (15).

P. aeruginosa mavi-yeşil bir pigment olan piyosiyanin üretebilir. Piyosiyanin; fenazin yapısındadır, genellikle mavi-yeşil renklidir ve koloni mavi-yeşil renk alır. Bu pigment yalnızca aerob ortamda oluşur, tanı değeri yüksektir. Piyosiyanin üretimi King A besiyeri kullanılarak arttırılabilir. Pyoverdin suda çözünen mavi renkli piyosiyaninle birleştiğinde parlak yeşil renk oluştururlar.

Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen parlak kırmızı renkte, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini yitirir. Piyorubin klinik izolatların %2'sinde saptanmaktadır.

Piyomelanin, *P. aeruginosa* tarafından üretilen kahverengi, siyah renkte sık gözlenmeyen bir pigmenttir. Diğer pigmentlerin varlığı piyosiyanın pigmentinin maskelenmesine neden olabilir (16). Pigmentler bakterinin demir alımı için siderofor olarak görev yaptıkları için demirin sınırlı olduğu durumlarda pigment üretimi artar. Besiyerinde özellikle piyosiyanın ve piyoverdin pigmentlerinin oluşumu *Pseudomonas aeruginosa*'nın tanısı yönünden oldukça önemli bir özelliktir.

Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında pigmentli koloniler tanıda her zaman yardımcı olmuştur. Üretilen pigmentler çoğu zaman konağa karşı virulan etkiler göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın pigmentlerinin yanı sıra; *S. aureus*'un stafiloksantin pigmenti, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* türlerinin koyu kahverengi veya siyah pigmentleri ve *Serratia marcescens*'in kırmızı pigmenti diğer önemli pigment türleridir (17).

Mikrobiyal pigmentlerin bazı doğal etkileri

- 1- Ultraviyole radyasyona karşı koruma
- 2- Oksidan maddelere karşı koruma
- 3- Aşırı sıcak ve soğuğa karşı koruma
- 4- Diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerine karşı koruma
- 5- Besin eldesi (demir vs.)
- 6- Fotosentezle enerji eldesi

Enterobacteriaceae ailesinin aksine *P. aeruginosa* karbonhidratları fermente etmez, karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalayıp asit oluşturur. *P. aeruginosa* oksidaz pozitifdir. Sitokrom C oksidaz içermeleri *Pseudomonas* cinsini *Enterobacteriaceae* ailesinden ayıran temel özelliklerdendir. *Pseudomonas* türleri

değişik şekerleri metabolize etmek için 2-keto-deoksiglukonat yolunu kullanır. Bundan dolayı ATP üretimi için elektron transport zincirine gereksinimleri vardır. Bu özellik *Pseudomonas* cinsini zorunlu aerob yapar. Ancak *P. aeruginosa* anaerobik şartlarda da yaşayabilir, bu farklılığı terminal elektron alıcı olarak nitrati kullanabilme özelliğinden kaynaklanır. Böylece *P. aeruginosa* farklı çevre koşullarında varlığını devam ettirebilmektedir. indofenol oksidaz, katalaz, sitrat, üreaz ve L-arginin dihidrolaz pozitifler. L-lizin dekarboksilaz, L-ornitin dekarboksilaz metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir. Üç şekerli demirli besiyerinde (TSI) alkali reaksiyon verir ve gaz oluşturmazlar.

2.1.2. Epidemiyoloji ve bulaş

P. aeruginosa hidrofilik yapıda olup nemli ortamı sever. İnsanda perine, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşir. Solunum cihazları, yataklar, çarşaf, temizlik solüsyonları, ilaçlar, dezenfektanlar, küvetler, paspaslar ve lavabolardan kolaylıkla ayrıştırılabilir. Çiğ sebzeleri kolonize edebilme yeteneği özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalar için ciddi risk oluşturur (18).

P. aeruginosa sağlıklı kişileri nadiren de olsa kolonize edebilir. Kolonizasyon invaziv enfeksiyona dönüşebilir. Altta yatan risk faktörü olanlarda %50 oranında kolonizasyon invaziv *P. aeruginosa* enfeksiyonuna ilerleyebilir. Hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bakterilerden biridir. Hastane ortamında *P. aeruginosa*'nın kaynak ve yaygınlığının belirlenmesi enfeksiyonun etkin epidemiyolojik kontrolü için gereklidir. Yanık hastalarının derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde ve antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılık olabilmektedir (19). Kistik fibrozis hastalarında akciğer enfeksiyonuna neden olması ve artan antibiyotik direnci sebebiyle önemini giderek artmaktadır (20,21). Kistik fibrozis hastalarının yaşam sürelerinde ki belirgin artış sebebiyle hastalığın tedavisi çocuk sağlığı ve hastalıkları uzmanlarının yanı sıra yetişkin hastalıklarıyla ilgilenen tıp dallarını da ilgilendirmektedir.

2.1.3. Virulans faktörleri ve patogenezi:

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezi konak ve bakteriye ait faktörler rol oynar. Bakterinin virulans faktörleri hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenebilir. Virulans faktörlerinin salınımı; üremenin olduğu, hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar. Virulans faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi karmaşık bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır. Virulans faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı özgül virulans faktörleri kodlayan genlerdeki düzenlemeleri, promotor veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir (22).

P. aeruginosa sağlıklı kişilerde hastalık oluşturmazken, konak savunmasının bozulduğu durumlarda çeşitli virulans faktörlerinin etkisiyle ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Çok çeşitli virulans faktörlerinin de katkısı ile septisemi, üriner enfeksiyon, akut ve kronik akciğer enfeksiyonları, endokardit, dermatit ve osteokondrit gibi enfeksiyon hastalıklarına yol açar.

Bir *P. aeruginosa* enfeksiyon hastalığının gelişme süreci birbirini takip eden üç basamağa ayrılabilir;

- Bakteri adezyon ve kolonizasyonu
- Lokal invazyon
- Yaygın sistemik enfeksiyon

Bakterinin virulans faktörleri her bir basamağı düzenler ve çeşitli sendromlardan sorumludurlar.

2.1.3.1. Kirpik: *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Bakterinin adezyonunu sağlar. Kirpik güçlü bir immunojenidir. Kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında konak bağışıklık cevabından kaçmak için kirpiksiz mutantlar seçilmektedir (4).

2.1.3.2. Pili (Fimbriae): Fimbrialar bakteri yüzeyinde yer alan ince, kısa, düzgün çıkıntılardır. Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklindeki hareketten sorumludur (23). Sadece elektron mikroskopunda görülebilirler. Bakterinin çeşitli yüzeylere ve birbirine tutunması ile bu yüzeylerde üremelerinde rol oynar, küme veya film tabaka oluşturmalarını sağlarlar (24).

2.1.3.3. Aljinat: Aljinat mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum yolu enfeksiyonlarında aljinat üretimi çok önemli rol oynar (25). Aljinat da kirpik gibi bakterinin adezyonunda rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Kistik fibrozis hastalarının solunum yollarında gözlenen suşlar genellikle aljinat aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipte suşlardır.

2.1.3.4. Slime faktör: *P. aeruginosa*'nın bazı koşullarda oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına “slime tabakası” denir. Slime faktörün, konak bağışıklık sistemini etkileyerek bakterinin konak savunmasından korunduğu gözlemlenmiştir (26). Mikroorganizmanın nötrofil ve fagositlere karşı korumasını sağlar. Ayrıca bakteriyi opsonizasyondan ve kompleman sisteminden korur. Diğer taraftan monosit ve makrofajları stimüle eder. Lenfositler üzerine mitojenik etkilidir.

2.1.3.5. Lipopolisakkarit (LPS) : Bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan LPS; fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özümlü polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Uzun O zincirleri komplemanın litik etkisini engelleyerek, bakteriye karşı oluşan yanıtı korumaktadır.

2.1.3.6. Elastaz: Elastaz, elastin proteinini harap eder. Elastin insan akciğer dokusunun majör elamanıdır, ekspansiyon ve kontraksiyondan sorumludur. *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastaz mikroorganizmanın doğal bariyerlerinin bütünlüğünü bozarak doku invazyonu yapar (27). *Pseudomonas* enfeksiyonlarında oluşan doku hasarında kollajen yıkımının önemli rolü vardır Elastaz; tip-3 ve tip-4 kollajeni yıkar. Tip-3 kollajen interstisyel kollajen olarak sınıflandırılır. Deri, akciğer ve damar duvarında bulunur. Karaciğer ve dalak stromasında yer alır. Tip-4 kollajen;

bazal membran da yer alır ve vasküler yapıların majör komponentidir. Yapılan hayvan deneylerinde intratrakeal *Pseudomonas* elastazı uygulanan tavşanlarda hızlı ve yaygın intraalveolar hemoraji gözlemlenmiştir (28). Elastaz eksikliği olan *P. aeruginosa* ile oluşturulan deneysel pnömoni modellerinde enfeksiyonun daha az olduğu gözlemlenmiştir (29).

P. aeruginosa'nın elastolitik etkisinden *LasA* proteaz ve *LasB* elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. *LasA* bir serin metalloproteinazdır. *LasA* proteaz, elastini yıkamaz ancak *lasB* elastazın elastolitik aktivitesini artırır. *LasB* bir çinko metalloproteinazdır, *lasA* proteazın yıprattığı elastini parçalar. *LasB* elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır.

Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum $\alpha 1$ -proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneze önemli rol oynar. Ayrıca solunum yolu epitellerindeki sıkı bağlantıları parçayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar. Elastaz IL-8 üretimini uyarak pro-inflamatuvar etki gösterir.

2.1.3.7. Proteazlar: Proteolitik aktivite gösteren bakteriler arasında *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* ve *Proteus* cinsleri almaktadır. Bu bakterilerin haricinde bazı maya ve küf türleri de proteolitik aktivite gösterebilmektedir. *P. aeruginosa* çeşitli proteazlar salabilir ve bu yolla konak bağışık yanıtını etkisiz hale getirebilir. Bu proteazlar hücrelere toksiktir ve enfeksiyon oluşumuna yol açarlar. Alkali proteaz, *LasA* proteaz, *LasB* elastaz, proteaz IV gibi proteazlar doku hasarına yol açarak *P.aeruginosa* patogenezinde rol almaktadırlar (30).

Alkalın proteaz, yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir, 49 kDa ağırlığındaki enzim *apr* geni tarafından kodlanır ve enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açabilir (31).

Proteaz IV, farelerde yapılan çalışmalarda farelerde ülseratif keratit gelişimine yol açmıştır. Çok sayıda farklı proteazlar ve potensiyel proteazlar fenotipik ve genotipik testlerle gösterilmiştir ancak hiçbirinin patogeneze önemli bir rolü gösterilememiştir.

2.1.3.8. Piyosiyanin: *P. aeruginosa* enfeksiyonu sırasında hücresel hasar, özellikle de akciğerin, epitelyal ve endotelyal hücrelerinde oluşur. Bu hasarın bir kısmı piyosiyanin aracılığıyla olur. *P. aeruginosa*'nın mavi renkli, kloroformda eriyen bir pigmentidir. Öncü molekülü olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenir. *P. aeruginosa* tarafından üretilir, bakterinin fizyolojisinde ve patojenezinde önemli rol oynarken, oluşturduğu mavi renk sayesinde tanı konmasında kolaylık sağlar (32).

Piyosiyanin bakteri metaboizmasındaki bu önemli rolü yanında sitotoksik özelliği ile de virulansa katkıda bulunur. Piyosiyanin hidrojen peroksit ve süperoksit gibi reaktif oksijen türevleri üreterek hücrelere zarar verir. Yapılan çalışmalar sonucunda, piyosiyaninin hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır. Piyosiyanin ayrıca α 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur. Piyosiyanin otooksidasyon yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açmakta ve böylece sitotoksik etki göstermektedir (33,34).

2.1.3.9. Piyoverdin: Bir siderofordur. *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretimini de düzenleyerek virülansta rol oynar (35).

2.1.3.10. Toksin üretimi: Ekzotoksin A (ExoA), lökosidin, fosfolipaz ve hemolizin: Enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa* 'ların birçoğu ekzotoksin A sentezler. Deney hayvanlarında küçük bir dozu bile ölümcül bulunmuştur. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-ribozil transferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir (36).

Başka bir *P. aeruginosa* toksin faktörü ise bir sitotoksin veya lökosidin olarak adlandırılır ve *P. aeruginosa* 158 suşunun kromozomuyla bütünleşmiş faj genomundan üretilir. Sadece bazı *P. aeruginosa* suşlarında saptanmaktadır.

P. aeruginosa suşları hemolitik fosfolipaz C PlcHR üretimi yoluyla eritrositlerin hemolizine neden olabilir. Bir başka fosfolipaz C (PlcN) ise hemolitik özelliği olmayan ve *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen bir enzimdir. PlcHR,

fosfatidilkolin ve sfingomiyelini hidrolize ederken, PlcN ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. PlcHR çeşitli hayvan modellerinde ve in vitro sistemlerde orta seviyede virulan olarak gösterilmiştir. PlcN'nin ise virulans ile ilişkisi gösterilememiştir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen diğer bir hemolizinde ramnolipid yapısındadır.

2.1.3.11. Tip III Sekresyon Sistemi: Bu sistem, ökaryotik hücreler içine bakteri toksinlerinin direkt enjeksiyonunu sağlar. Bunun sonucunda da aktin hücre iskeletini ve protein sentezini inhibe ederek hücrel alışverişi bozarlar. Bakteri hedef hücre üzerinde porlar açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturur ve efektör proteinlerini ökaryot hücreye iletir. *P. aeruginosa* için, tip III toksinlerin ekspresyonu, akut enfekte hastalarda artmış mortalite dahil olmak üzere kötü klinik sonuçlar ile ilişkilidir. *P.aeruginosa*'nın tip III sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ekzoenzim S, ekzoenzim T, ekzoenzim Y ve ekzoenzim U dur (37).

ExoS ve *exoT*'nin birden fazla enzimatik ve kimyasal işlevi vardır. Her iki enzimde, ADP-ribosilat hedef proteinleri olmasına rağmen *ExoT* protein aktivitesi *exoS* ten çok daha düşüktür. *ExoS*'in 53 kdalton ve 49 kdalton olarak iki formu mevcuttur. İki aktif bölgesi olan ve iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. Kronik akciğer enfeksiyonlarına, yanık ve yaralara sebep olan ve bakterinin yayılmasına yardımcı olan önemli bir faktördür. *ExoS* ve *exoA* birlikte enfekte olan hastalarda, mortalite oranı daha yüksek bulunmuştur (38). *ExoS* hücrel apoptozis için gereklidir ve Rho GTPaz'ın protein aktivitesi azalmasına yol açabilir. *ExoT* *P. aeruginosa*'nın makrofajlar tarafından alınmasını engeller. *ExoT*'nin yara iyileşmesini inhibe edici özelliği gösterilmiştir (39).

ExoU fosfolipaz A2 benzeri aktivitesi olan bir fosfolipaz olarak tarif edilen bir güçlü bir sitotoksindir ve çeşitli hedef hücreleri parçalar. *ExoU* ilk olarak kültürü yapılmış memeli hücrelerine sitotoksik olduğu gösterilen *P. aeruginosa* suşlarının bazılarında tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının yaklaşık % 20 - % 30'unda *ExoU* üretilir, daha çok göz enfeksiyonları ve akut pnömonilerden izole edilir (40). Kistik fibrozis hastalarından izole edilen örneklerden (%1) diğer vücut bölgelerinden izole edilen örneklere (%18) göre çok daha az *ExoU* varlığı gösterilmiştir (41). Yapılan hayvan çalışmalarında *ExoU* toksini üreten *P. aeruginosa* suşlarının virülans

ile ilişkisi ortaya konmuştur. *ExoU* son derece öldürücü klinik izolatlar için bir belirteç gibi görünmektedir. Hayvan modellerinde *ExoU* salgılayan suşlar her zaman daha virulan bulunmuştur. *ExoU* üretmeyen suşların virulansında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır (42).

ExoY, *P. aeruginosa*'nın bilinen dördüncü tip III efektör proteindir. *Bordetella pertussis* ve *Bacillus anthracis*'in, hücre dışı adenil siklazlarına benzer adenil siklaz aktivitesi vardır. Sitozolik cAMP'yi arttırarak pulmoner vasküler hücrelerde hücrelerarası boşluk oluşumunun artmasına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına neden olur (43).

2.1.3.12. Hareket: Hareket sayesinde bakteri besin elde eder ve toksik maddelerden

kaçar. Motilite için bakteri flajel ve pili oluşturmalıdır ve bunun için gerekli enerjiye sahip olmalıdır (44). Hareket özelliği sayesinde *P. aeruginosa* konak hücresine translokasyon yapar, oluşturuğu koloni içerisinde yer değiştirir ve biyofilm içinde hareket eder.

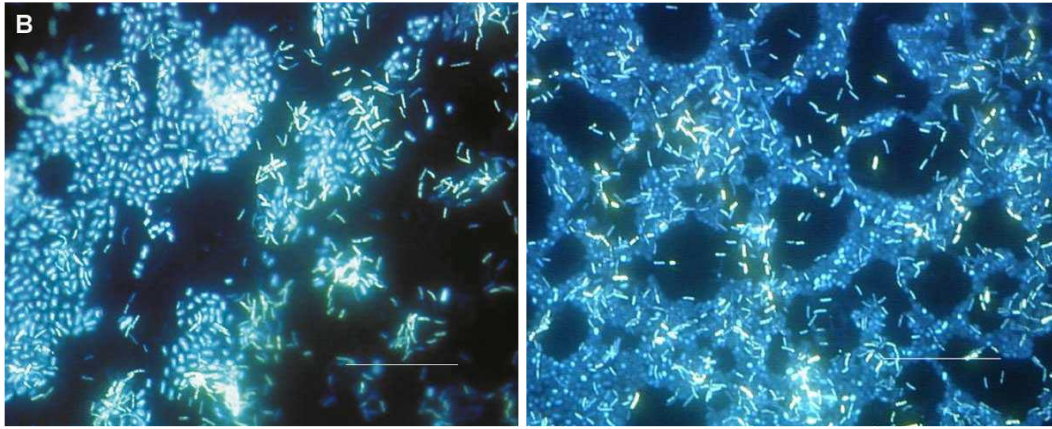
2.1.3.13. DNaz aktivitesi: Bazı bakterilerde bulunan deoksiribonükleaz enziminin *P. aeruginosa* suşlarının bazılarında da bulunduğu gösterilmiştir (9).

2.1.4. Biyofilm oluşumu

Yüzeylerindeki moleküller aracılığı ile birbirlerine tutunan bakteri toplulukları kendi salgıladıkları polisakkarit matriks içerisinde yerleşerek “biyofilm” olarak adlandırılan karmaşık bir yapı oluştururlar. Biyofilmler doğal veya yapay birçok ortamda kendisini oluşturan bakterilere koruyucu dinamik bir mikroçevre oluşturarak bu bakterilerin hayatta kalabilme şansını artırır (45). Biyofilmler olgunlaştıkları zaman antimikrobiyal ajanlara ve konak bağışıklık sistemine karşı etkili bir bariyer görevi görerek oluştukları alanda kalıcı kolonizasyon ve/veya enfeksiyonlara yol açarlar (46,47).

Biyofilm oluşturan bakterilerde hareketin azaldığı, metabolizmanın yavaşladığı, virülans faktörlerinin ekspresyonunun arttığı fenotipik bir farklılaşma görülür. Biyofilmlerin koruyucu yapısı içerisinde bakteriler arası kanallar oluşur. Bu

kanal sistemleri bakterilerin besinlere kolay ulaşmasını ve atıkların ortamdan kolayca uzaklaştırılmasını sağlar (48). Biyofilm içerisindeki bakteriler tarafından salgılanan hücre içi sinyal molekülleri farklı konak özellikleri ve çevresel faktörlere bağlı olarak biyofilmin büyüme ve davranış paternini etkilemektedir. Antimikrobiyal ajanlar ve antiseptiklerin uygulanması sonrası biyofilm içerisinde canlılığını sürdüren hücrelere “kalıcı (persister) hücreler” adı verilir. Bu hücreler kötü çevre koşullarında onları programlı hücre ölümüne taşıyan mekanizmaları durdurarak biyofilm içerisinde repopülasyonu sağlarlar. Bu durum biyofilm eradikasyonunda başarısızlığa neden olur.



Şekil 2.1. Biyofilmin 7. ve 14. günde çelik yüzeydeki görüntüsü. Aradaki siyah alanlar su kanalcıklarına aittir. Matriks içinde yer alan mikroorganizma toplulukları izlenmektedir (36).

2.1.5. “Quorum Sensing” ve virulans faktörlerin üretimi

Dokudaki bakteri sayıları arttıkça organizma “Quorum sensing” (QS) denen bakterilerin birbirleriyle iletişim kurdukları düşünülen bir yapı oluşturacak kritik bir kütleye ulaşır. Kritik bakteriyel kitlelerde, QS yanıtının düşük molekül ağırlıklı araçları, sentezlenip salgılanır. Bakteriyel topluluk arasındaki difüzyon, gen transkripsiyonunu ve virulans faktör üretimini etkiler.

P. aeruginosa için, üç büyük, birbiriyle ilişkili QS sistemi (*las*, *Pseudomonas* kinolon sistemi (PQS) ve *rhl*) bilinmektedir. QS’deki bu moleküler mediyatörler otoindükleyici (AIs) olarak bilinirler, çünkü bakterinin çevreye yanıtını kendileri düzenlerler. *Las* QS sisteminin AI aracı, bir açıl-homoserin lakton olan N-(3-

P. aeruginosa enfeksiyonlarında QS sisteminin önemi ile ilgili sınırlı çalışma vardır. Bakterinin ürettiği ekzotoksin ve hemolizin gibi bazı virulans faktörleri de QS ile düzenlenmektedir. QS sistemlerinin aktivasyonu bakteri sayısı ile ilgilidir. Bu nedenle başlangıç döneminde mikroorganizma sayısı az olduğundan QS aktive olmamaktadır. Bu yüzden virulans faktörleri salınmamaktadır. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda PAO1 suşunun *las* ve *rhl* mutantlarında azalmış virulans gösterdiği yanık yarası (51) , akut (52) ve kronik akciğer enfeksiyonunda (53) gösterilmiştir.

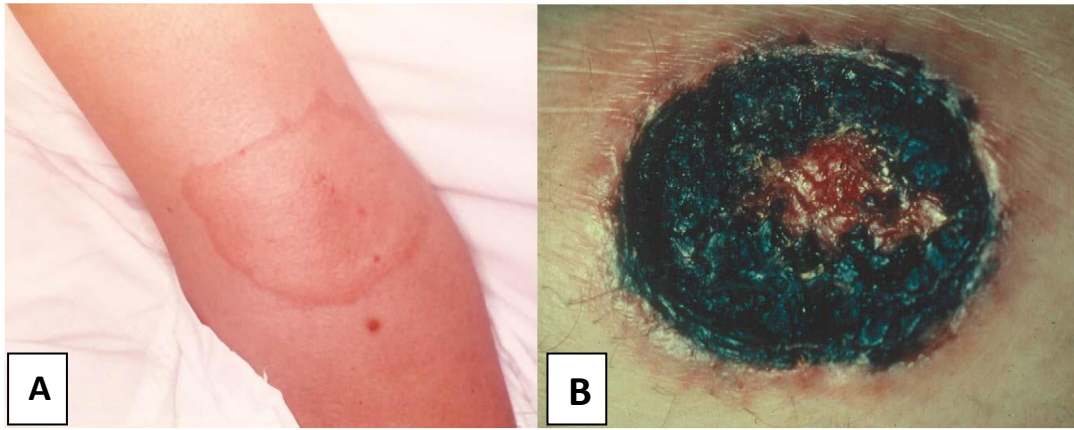
QS ile biyofilm oluşumu arasında yakın ilişki olduğu ile ilgili bir çok çalışma vardır. Yapılan bir çalışmada da quorum sensing yapmayan suşların daha zayıf biyofilm tabakası yaptıkları gösterilmiştir (54). Mikroorganizmalar, üretilen moleküllerin yoğunluğunu ölçerek çevrelerindeki mikroorganizma miktarını belirleyebilmektedirler. Bakteri birçok geni düzenleyerek uyarılara karşı cevap verebilmektedir.

2.1.6. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa tüm vücut bölgelerinde kolonize olabilir ve enfeksiyona yol açabilir.

2.1.6.1. Endokardit: *P. aeruginosa* ilaç bağımlısı olanlarda normal kapakta diğer insanlarda ise prostetik kalp kapağında yerleşerek enfektif endokarditlere yol açarlar. Amerika Birleşik Devletleri'nden bildirilmiş olan *Pseudomonas* endokarditli hastaların %90'ından fazlası ilaç bağımlısıdır (55). Bakterinin kan akımından direkt invazyonla veya eroin ile beraber karıştırılan maddelerin sebep olduğu subendotelyal hasar sonucu endokardiyuma ulaştığı düşünülmektedir. En sık triküspit kapak tutulumu olur. Ayrıca pulmoner aortik veya mitral kapak da tutulabilir. Sol kalp tutulumunda akut semptomlar görülürken sağ kalp tutulumunda ise semptomlar subakut seyreder. *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı gelişen endokarditin patognomonik bir semptomu veya işareti yoktur. Tanı endokarditin klinik bulguları ile birlikte kan kültürlerinde saptanan üreme ile konur. Triküspit kapak endokarditinin tedavisinde yüksek doz aminoglikozid ile birlikte antipseudomonal penisilin başlanmalıdır. Sol kapak endokarditinde ise triküspit endokarditinde ki tedaviye ek olarak erken kapak değişimi gerekebilir (56).

2.1.6.2. Bakteriyemi: *P. aeruginosa* sağığı tehdit eden en ciddi bakteriyemi etkenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda % 50'yi aşan mortalite oranları gösterilmiştir (57). AIDS, diabetes mellitus (DM), hematolojik maligniteler, immunglobulin eksiklikleri, ntropeni, organ nakli, ağıır yanıklar predispozan faktörlerdir. Hastaların kooperasyonu bozuktur. Ateş sarılık ve solunum yetmezliğı görülebilir. Ektima gangrenosum gibi patognomonik deri lezyonları *Pseudomonas aeruginosa* bakteriyemisinde çok önemlidir (şekil 3). Lezyondan Gram boyama ve kültürle etken gösterilebilir. Tedavisinde antipseudomonal beta laktam antibiyotikler ile aminoglikozidler kombine edilebilir.



şekil 2.3. Nötropenik hastada *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağılı ektima gangrenosum A: enfeksiyonun başlangıcından 72 saat sonraki lezyon B: geç lezyon (56).

2.1.6.3. Santral sinir sistemi enfeksiyonları: *P. aeruginosa*'ya bağılı primer santral sinir sistemi enfeksiyonları nadirdir. Hemen hemen her zaman bir cerrahi müdahaleye, kafa travmasına ve bakteriyemiye sekonder gelişir. Diğerk bakteriyel menenjitlerde olduğı gibi ateş, başağrısı ve konfüzyon vardır. Tedavide seçilecek ajanın BOS'a geçişi iyi olmalıdır. Seftazidim kullanılabilir. Durumu kötü olan hastalarda aminoglikozid ile kombine edilebilir.

2.1.6.4. Gz enfeksiyonlar: Bakteriyel keratit, endoftalmit, blefarokonjunktivit, skleral abse ve orbital selllite neden olabilir. Görme kaybı ve görme keskinliğındeki azalma bu enfeksiyonların en sık sonuçlarıdır. Kontakt lens

kullananlar, ağır yanıklar, komadaki hastalar, AIDS'li hastalar risk altındadır. Travmaya sekonder veya hematogen yolla bulaşması hızlı proliferasyona neden olur. *Pseudomonas aeruginosa*'nın elastaz, alkali proteaz ve ekstrasellüler enzimleri yardımıyla ilerleyici ve yıkıcı enfeksiyonlar oluşur. Enfeksiyon 48 saat içinde tüm korneayı kaplayarak perforasyona gidebilir. Ülser tabanından alınan örnekten Gram boyama ve kültür yapılmalıdır. Küçük yüzeysel ülserler için topikal tedavi (aminoglikozid solüsyonu) yeterlidir. Ancak sklera, stroma ve ön kamarayı tehdit eden durumlarda gentamisin veya seftazidim subkonjunktival enjeksiyonla verilebilir (56).

2.1.6.5. Kulak enfeksiyonları: Kulakta görülen *P. aeruginosa* enfeksiyonları hafif yüzücü kulağı enfeksiyonuna neden olabildiği gibi nörolojik sekel bırakan ve hatta ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara da yol açabilir. Yüzücü kulağı özellikle çocuklarda görülen dış kulak kanalının nemli kıvrılmış bölgelerinde oluşan deri enfeksiyonudur. Sekel bırakmaz ama bazı hastalarda kronik kulak akıntısı olabilir. Normal kulakta nadiren bulunur. Yaralanma enflamasyon veya nem varsa oditor kanala yerleşebilir. Yaşlı DM'li hastalarda, AIDS'li hastalarda ve küçük damar hastalığı olanlarda: malign eksternal otit ve nekrotizan otitis eksterna denen kronik ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilir. Bunun yanı sıra otitis media enfeksiyonlarına da yol açar. Tedavi tutulan bölgeye ve enfeksiyonun şiddetine göre değişir. Seftazidim veya siprofloksasin kullanılabilen ajanlardır (56).

2.1.6.6. Üriner sistem enfeksiyonları: *P. aeruginosa* idrar yolu enfeksiyonları genellikle bir taş, stent veya kateter varlığında veya üriner sisteme yönelik yapılan bir cerrahi girişim sonrasında gelişir. Tekrarlayan enfeksiyonu önlemek için foley kateterler ve stentler çıkarılmalıdır. *P. aeruginosa*'ya bağlı üriner sistem enfeksiyonu asendan olabileceği gibi primer bir odaktan bakteriyemi ile de gelişebilir. Klinik bulguları diğer bakterilere bağlı gelişen üriner sistem enfeksiyonları ile aynıdır. Tedavide siprofloksasin, aminoglikozidler veya antipseudomonal beta laktam antibiyotikleri kullanılabılır (56).

2.1.6.7. Solunum sistemi enfeksiyonları: *P.aeruginosa* akut, bakteriyemik veya non-bakteriyemik pnömoniye neden olabilir. üst solunum yollarında kolonize olan bakteri enfeksiyona ilerleyebilir. Ateş, titreme, dispne, öksürük, pürülan balgam,

mental konfüzyon ve siyanoz gibi semptomları vardır. Kistik fibrozis hastalarında da en sık izole edilen etkenlerdendir (56).

2.1.6.8. Diğer *Pseudomonas* enfeksiyonları: *Pseudomonas aeruginosa* farinksten rektuma kadar tüm gastrointestinal sistem de enfeksiyonlara yol açabilir. Yenidoğan ve nötropenik hastalarda nekrotizan enterokolitlere neden olabilir. Kemik ve eklemlerde hematogen veya komşuluk yoluyla enfeksiyonlara sebep olur. Damar içi ilaç bağımlılarında üriner sistem enfeksiyonu sonrası hematogen yolla enfeksiyon oluştururken, travma veya cerrahi girişim sonrası ise komşuluk yoluyla enfeksiyona neden olur. Bütünlüğü bozulmuş deride diffüz veya lokalize deri lezyonları oluşturabilir (56).

2.1.7. *Pseudomonas aeruginosa* tanısı

Tipik koloni morfolojileri, üzümsü kokuları ve pigmentleriyle izole edildikleri besiyerlerinde kolaylıkla tanınabilirler. Kolonileri genellikle düz ve kenarları girintili çıkıntılı yapıdadır. Mukoid koloni varyantları genellikle kistik fibrozisli hastaların balgam örneklerinde tanımlanmaktadır. Enfeksiyon bölgesine göre kabul edilen örnekler; balgam, idrar, püy, BOS ve sürüntü örnekleri olabilmektedir.

Klinik örneklerden izole edebilmek için %5 koyun kanlı agar ve seçici bir besiyeri olan Mc Conkey agar kullanılmaktadır. Oksidaz pozitif, non-fermentatif bir bakteridir, ayrıca 42⁰C’ de üreyebilmesi tanımlamayı kolaylaştırır. Pigment oluşumu Mueller-Hinton agar gibi besiyerlerinde gösterilebilir. King A ve King B gibi özel besiyerleri kullanarak UV ışık altında pigment türü gösterilebilir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan konvansiyonel testlerin yanında tanımlamada otomatize sistemler de kullanılmaktadır.

2.1.8. *P. aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal direnç

P. aeruginosa’nın tehlikeli bir patojen olarak kabul edilmesinin önemli bir sebebi de birçok antibiyotiğe direnç göstermesidir. Sadece kısıtlı sayıda antibiyotığın bakteriye etkisi vardır ama bu güçlü antibiyotiklere karşı dahi artan oranlarda direnç bildirilmektedir. Akılcı olmayan antibiyotik kullanımı antibiyotik tüketimini büyük

oranda artırmaktadır ve direnç gelişimine neden olmaktadır. Hastanede yatan hastaların tedavisinde uygun antibiyotik seçiminde zorluklar yaşansa da birçoğu dirençli hale gelmiş kökenlerle kolonize kistik fibrozis hastalarında gelişen enfeksiyonların tedavisi çok güç bir hal almaktadır.

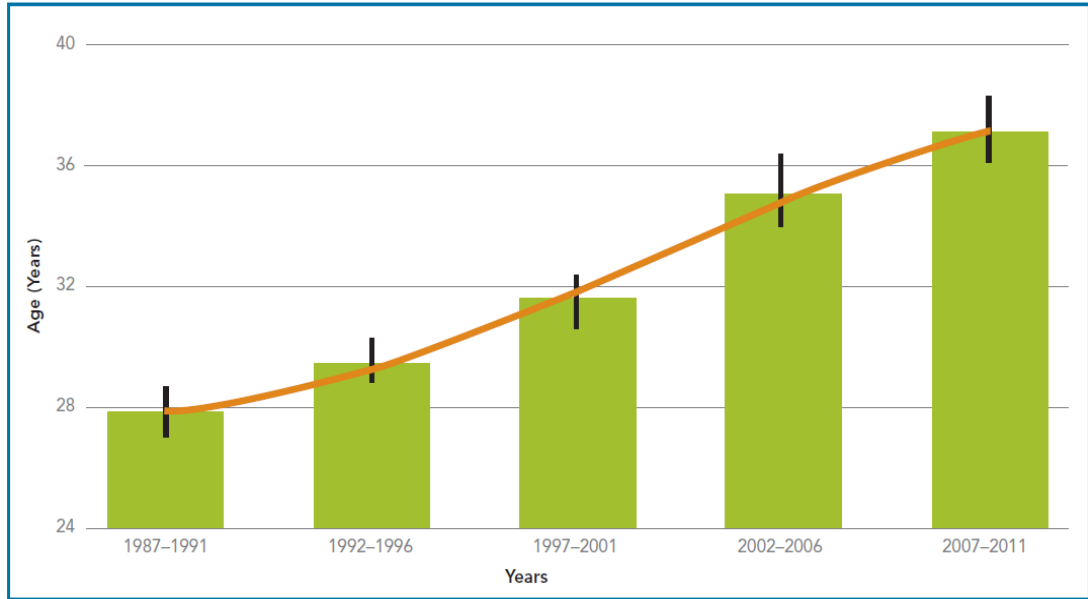
P. aeruginosa içsel ve kazanılmış mekanizmalar ile pek çok antibiyotiğe direnç gösterir. Başlıca iki direnç mekanizması vardır: çeşitli atım pompa sistemleri (5) ve indüklenebilir kromozomal AmpC beta laktamazlar. *P. aeruginosa* içsel direnç ile ampicilin, amoksisilin, amoksisilin – klavulanat, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, sefotaksim ve seftriaksona direnç gösterir (58).

Geniş spektrumlu penisilinler (piperasilin ve tikarsilin), genişlemiş spektrumlu sefalosporinler (seftazidim ve sefepim), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (gentamisin ve tobramisin), karbapenemler (meropenem ve imipenem), florokinolonlar (siprofloksasin) ve kolitsin *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastalarda düşünülebilir. Bu antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç gelişebilir. Bu nedenle bu antibiyotiklere karşı gelişebilecek direncin izlenmesi ve kontrolü önemlidir (59). *P. aeruginosa* 'nın antibiyotik direncinden, ürettiği beta laktamazlar (GSBL enzimleri, AmpC, Oxa, Per, Imp, Vim, Ser gibi), pompa sistemleri, OprD mutasyonu ve aminoglikozid modifiye edici enzimler sorumludur.

2.1.9. Kistik fibrozis

Kistik fibrozis ile ilgili ilk kayıtlara 18.yüzyılın Alman ve İsveç edebiyatında yer alan uyarıda rastlanır. “Alnından öpüldüğünde tuz tadı alınan çocuğun durumu ne acıdır; büyülenmiş olan bu çocuk yakında ölecektir” anlamına gelen sözleri kistik fibrozis ve terle kaybedilen tuz arasındaki bağlantının erken dönemde anlaşıldığını açıkça göstermektedir. Kistik fibrozisin ilk kapsamlı tanımı 1938’de Andersen tarafından yapılmıştır (60). Bin dokuz yüz seksen dokuz yılında CFTR (Kistik fibrozis transmembran regülatör) geninin belirlenmesiyle otozomal resesif genetik bozukluk olan kistik fibrozis (KF) daha net anlaşılmıştır (61). Kistik fibrozis hastalığı, aynı anda solunum sistemi, sindirim sistemi gibi vücudun birden çok sistem ve organını etkileyebilir. Çocuklarda ve erişkinlerde görülebilir. Belirlenen KF hastaların yaklaşık % 45’i yetişkindir. Kistik fibrozis hastaları 1960’lı yıllarda

yaşamlarının ilk yılında kaybedilirken yaşam beklentisi son 4 dekadda oldukça artarak 2009 yılında ortalanca yaşam süresi 36 yaş dolaylarına yükselmiştir. Artan yaşam süreleri sebebiyle yetişkinler için tedavi programları geliştirilmiştir. Beyaz ırka mensup kişilerde en sık görülen (1/2500) otozomal resesif geçişli hastalıktır (62).



Şekil 2.4. KF’li hastaların yıllara göre yaşam süreleri. KF’li hastaların yaşam sürelerinin yıllara göre arttığı görülmektedir (63).

Tüm dünyada görülebilmekle birlikte en sık Kuzey ve Orta Avrupa’da ve Amerika Birleşik Devletleri’nde görülmektedir. Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar KF sıklığının 3000 de 1 olduğunu göstermektedir. Akraba evliliklerinin sıklığı ve ülkemizde kesin tanısı konamadan gastrointestinal sistem ve solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle kaybedilen çocukların oranının yüksek olduğu göz önüne alınırsa, bu oranın daha yüksek olduğu açıktır (64).

Kistik fibroze neden olan gen, hasarlı bir gendir ve bunun kodladığı protein 1989 yılında tanımlanmıştır. “Kistik fibrozis transmembran regülatör protein”i (KFTR) adı verilen proteini kodlayan gen 250 kilobaz uzunluğunda, 7. kromozomun uzun kolunda, q31.2 bölgesinde bulunmaktadır. Bu protein epitel hücrelerinin apikal membranında bulunan bir klor kanalı olarak görev yapmakta ve birçok sitoplazmik düzenleyici alt ünitelerden meydana gelmektedir (65). Binbeşyüzden fazla farklı KF

mutasyon geni tespit edilmiştir. En yaygın mutasyon fenilalanin yokluğunda CFTR proteininin 508. pozisyonunda meydana gelen üç baz çift delesyon mutasyonudur (66).

Kistik fibrozis gen ürünü olan KFTR proteini 1480 aminoasitten ve iki membran motifinden oluşmaktadır. ATP' nin hidrolizi gerçekleşir ve klor geçirgenliği için gerekli olan enerji sağlanır. KFTR proteini bozuk olursa hücreden dışarıya klor çıkışı olmaz, hücre içine sodyum girişi artar. Oluşan sekresyon su ve elektrolitten yoksun hale gelir. Solunum yolu epiteli, pankreas kanal epiteli, vas deferens, safra kanalı epiteli, ince ve kalın bağırsak epitellerindeki KFTR'nin mutant olması hastalığın kliniğini belirlemektedir

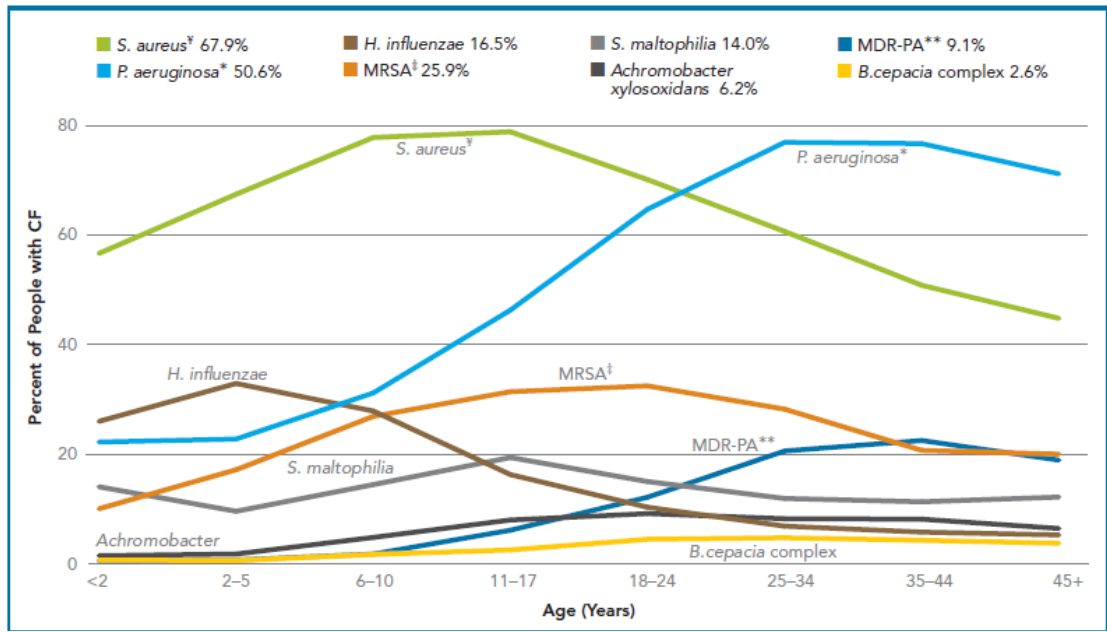
2.1.10. Mikrobiyolojik etkenler

Staphylococcus aureus ve *P. aeruginosa* KF hastalarında pulmoner enfeksiyondan primer sorumlu etyolojik ajanlardır. Hayatın ilk yıllarında *S. aureus* ve *Haemophilus influenzae* ile tekrarlayan enfeksiyonlar görülmektedir. *S. aureus* genellikle yaşamın ilk 2 yılı solunum yollarında kolonize olabilmektedir. Adolesan çağlarda kistik fibrosis hastalarında *S. aureus* daha sık görülmekteyken *yetişkinlerde* *P. aeruginosa* daha siktir.

Çocukluk ya da erken ergenlik döneminde, KF hastaları *P. aeruginosa* ile kronik olarak enfekte olur. *P. aeruginosa* ile kronik enfeksiyon, akciğer fonksiyonlarında daha hızlı düşüş ve kötü sağkalım ile ilişkilidir. Mukoid fenotipteki *P. aeruginosa* bir kere geçirildikten sonra kronik enfeksiyon haline gelir ve tedavisi oldukça güçtür. Mukoid fenotipler antibiyotiklere daha dirençlidirler. Hastaların birçoğu ilk olarak çevre suşları ile enfekte olur. Ancak KF hastaları arasında çapraz enfeksiyon olabildiği gibi ve KF olmayan kişilerden de geçiş olabilmektedir (67). Kistik fibrozis hastalarının solunum yollarından en sık izole edilen patojen *P. aeruginosa*'dır (6).

Kistik fibrozis hastalarının solunum yolu örneklerinden geleneksel kültür yöntemleri ile *H. influenzae*, *Burkholderia cepacia* kompleksi, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus*, *Pandorea* türleri ve *Ralstonia* türleri değişen sıklıkta izole edilmektedir (68,69). Yaşam beklentisi KF

hastalarında artmasına rağmen, *B. cepacia* tedavisi güç bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. *B. cepacia* ile enfekte hastaların sadece %10'u kurtarılabilmektedir (70). *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia* ve *Burkholderia dolosa* türleri KF hastalarında bir hastalık sürecine neden olmaktadır buna "cepacia sendromu" ismi verilmektedir (71). *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* ve *Actinomyces* türleri de kistik fibrozis hastalarında etken olan anaerob bakterilerdir (72).



Şekil 2.5. Kistik fibrozisli hastalarda saptanan patojenlerin yaşa göre değişen saptanma sıklıkları (63).

KF hastalarının solunum yolu örneklerinden çeşitli mantarlar da izole edilmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda en sık izole edilen ajan *Aspergillus fumigatus*'tur ve alerjik bronkopulmoner aspergilloze (ABPA) neden olmaktadır (73). *Aspergillus* enfeksiyonu, akciğer transplantasyonu, trakeobronşiyal anastomoz enfeksiyonları, trakeobronşit ve invaziv pnömoni sonrası nispeten sık görülmektedir. *Aspergillus* türlerini; *Pseudallescheria boydii*/Scedosporium apiospermum kompleks, *Exophiala dermatitidis*, *Paecilomyces* ve *Penicillium* türleri izlemektedir (74,75).

Virüslerle ilgili çalışmalar az sayıdadır ve genellikle çocuk hastalardan izole edilmiştir (76). En sık viral ajanlar solunumsal sinsityal virüs ve parainfluenza

virüstür. Bunun yanısıra *Rhinovirüs* ve *Influenza virüs* de etkenler arasındadır. Viral enfeksiyon tipik pulmoner alevlenmeleri tetikleyebilir.

2.1.11. Kistik fibroziste klinik bulgular

KF klinik belirtileri, visköz salgılar tarafından organların tıkanması sonucu oluşur. Akciğerde, bu durum kronik bakteriyel enfeksiyona yol açar. solunum yollarında hem hipersekresyon hem de sekresyonun temizlenmesindeki yetersizlik nedeniyle bol miktarda mukus birikir ve buna bağlı olarak enfeksiyon gelişir. Kronik süpüratif hava yolu hastalığı KF sahip yetişkinlerin % 98'den daha fazlasında mevcuttur. KF'ye bağlı ölümlerin % 90'ından fazlasını ilerleyici akciğer yetmezliği ile ilgilidir. Kronik öksürük, dispne, düşük seviyede ateş, anoreksiya ve kilo kaybı görülebilir (77).

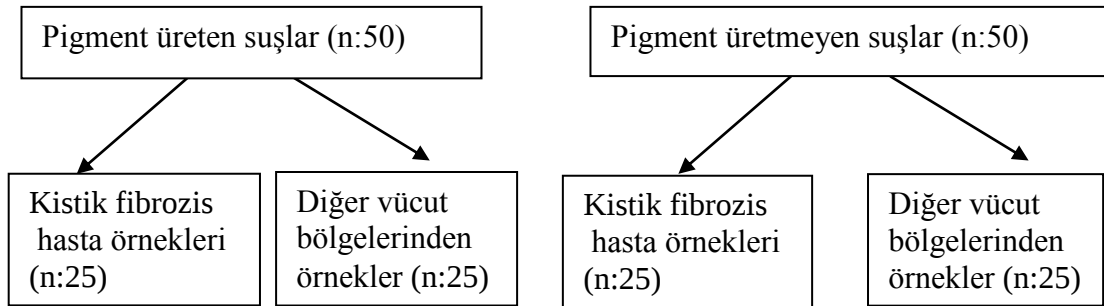
Yetişkin KF hastalarında akciğer enfeksiyonuna bağlı komplikasyonlar sık görülmektedir. Hemoptizi yaygın bir olaydır ve masif hemoptizi her yıl yetişkin KF hastaların yaklaşık % 1'inde oluşur. Hastaların % 4.1'i yaşamları boyunca bir kez masif hemoptizi geçirirler (78). Pnömotoraks, kronik malabsorbsiyon, osteoporoz ve sinüzit görülebilen diğer bulgulardır. KF'li hastaların birçoğunda ilerleyici pankreas yıkımı ve endokrin fonksiyon kaybı olduğu için yaşla beraber diabetes mellitus prevelansı da artar (79).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'nun onayı (20.02.2013 tarihli ve 17388665/285 sayılı) alınmıştır.

3.1. *P. Aeruginosa* Suşları

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanelerinin değişik klinik ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait; kan, trakeal aspirat, idrar, yara, ve kateter örneklerinden Klinik Patoloji Laboratuvarı'na gönderilen 50 adet *P. aeruginosa* suşu çalışma kapsamına alındı. Ayrıca kistik fibrozis tanısı almış hasta örneklerinden izole edilen 50 adet *P. aeruginosa* suşu çalışmaya dahil edildi.



Bakterilerin tanımlama işlemleri “Phoenix” (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bakterilen tanısı koloni morfolojileri, Gram boyama özellikleri, pigment üretimi, oksidaz testi ve üç şekerli demirli besiyerinde verdikleri reaksiyon ile doğrulandı. İzole edilmiş suşlar beyin kalp infüzyon stok besiyerinde -20 °C’da muhafaza edilmiştir. Pigment varlığını saptamak amacıyla King A ve King B besiyerleri kullanılmıştır ve sadece tek tip pigment üreten suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Besiyerleri

3.2.1. Pseudomonas F agar (King B)

- Dehidrate besiyeri (Merck) 35 gr
- Gliserol 10 mlt
- Distile su 1000 ml
- pH 7.3

Besiyeri ile birlikte gliserol 1 lt içerisinde eritildi. Daha sonra otoklavda 121°C’de ve 2 atm basınçta 15 dakika sterilize edilip ve petri kaplarına döküldü.

3.2.2. Pseudomonas P agar (King A)

- Dehidrate besiyeri (Merck) 44 gr
- Gliserol 10 mlt
- Distile su 1000 ml
- pH 7.3

Besiyeri ile birlikte gliserol 1 lt içerisinde eritildi. Daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilip petri kaplarına döküldü.

3.2.3. Kanlı agar

- Kanlı agar bazı (blood agar base) (Difco) 40 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.3

Kanlı agar bazı 1 lt su ile karıştırılarak, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi ve 50° C’ye kadar soğutulduktan sonra %5-10 kadar EDTA’lı (antikoagülan) steril insan kanı ilave edilerek karıştırılıp petri kaplarına döküldü.

3.2.4. “Brain-Heart Infusion” agar (BHI)

- Beyin kalp infüzyon agar 52 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.4

Besiyeri distile su ile karıştırıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilip sıcaklık 50°C’ye düşünce petri kaplarına döküldü.

3.2.5. “Brain-Heart Infusion” (BHI) sıvı besiyeri

- Beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri 37 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.4

Besiyeri distile su ile karıştırıldıktan sonra tüplere dağıtılıp otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi.

3.2.6. “Skim milk” agar

- “Skim milk” (Difco) 100 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 6.3

Besiyeri distile suda karıştırılarak otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi.

3.2.7. DNase Test Agar (Difco)

- Tripton (Bacto) 20,0 gr
- Sodyum klorür 5,0 gr
- Deoksiribonükleik asit 2,0 gr
- Agar 15,0 gr
- Metil yeşili 0,05 gr
- pH 7,3

Hazırlanan besiyeri 121 °C de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50 °C lik su banyosuna konduktan sonra petrilere dağıtıldı.

3.2.8. Mc Conkey agar

- Pepton 17 gr
- Polipepton 3 gr

- Laktoz 10 gr
- Safra tuzları 1.5 gr
- Sodyum klorür 5 gr
- Agar 13.5 gr
- Nötral kırmızısı 0.003 gr (%1'likten 3ml)
- Kristal viyole 0.001 gr (%1'likten 0.1 ml)
- Distile su 1000 ml
- pH 7.1

İlk olarak 900ml saf su içerisinde peptonlar eritildi. Sodyum klorür, safra tuzları ve agar bu karışıma ilave edilip 15-20 dakika bekletildi. Sonra kaynatıldı ve karışıma sıcak saf su eklenerek 1000 ml'ye tamamlandı. Nötral kırmızısı ve kristal viyole eklendi. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50°C'ye kadar soğuyunca petri kaplarına döküldü.

3.2.9. Luria bertani (LB) sıvı besiyeri (Sigma)

- Sodyum klorür 5 gr
- Tripton 10 gr
- Maya özütü 5 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.5

Hazırlanan karışıma % 1 kadar olacak şekilde glukoz ilave edildi. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

3.2.10. Hareket besiyeri

- Sığır özütü 3 gr
- Pepton (Merck) 10 gr
- Sodyum klorür 5 gr
- Agar 4 gr
- Ph: 7.4
- Distile su: 1000 ml

Hazırlanan besiyeri tüplere dağıtıldı. Tüpler otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edildi.

3.2.11. Mueller Hinton Agar

- Mueller Hinton Agar 38 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.3

Karışım distile suda eritilerek 121°C’de 15 dakika steril edildi ve 50°C’ye kadar soğuyunca steril petri kaplarına dağıtıldı.

3.2.12. “Triple sugar iron” agar (üç şekerli demirli agar)

- Polipepton 20 gr
- Laktoz 10 gr
- Sukroz 10 gr
- Dekstroz 1 gr
- Sodyum klorid 5 gr
- Ferrik amonyum sulfat 0.2 gr
- Sodyum tiyosulfat 0.2 gr
- Agar 13 gr
- Fenol kırmızısı 0.025 gr
- Distile su 1000 ml
- pH 7.3

Hazırlanan karışım sıcak su banyosunda eritildi ve tüplere 8-10 ml dağıtıldı.Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi. Daha sonra tüplerde 2-3 cm dik kısım ve üstte yatık kısım olacak şekilde soğutuldu.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Pseudomonas aeruginosa suşlarının aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin, tobramisin), sefalosporinlere (seftazidim, sefepim), florokinolonlara (siprofloksasin, ofloksasin), karbapenemlere (imipenem, meropenem) ve anti-psödomonal penisilinlere (piperasilin) duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre belirlenmiştir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığı Kirby – Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak çalışıldı. Bu amaçla Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid Ltd., Basingstoke,UK) kullanıldı. Bakteri izolatlarının taze kültürlerinden triptik soy buyyona (TSB) (Oxoid Ltd., Basingstoke,UK) 0.5 McFarland bulanıklık olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı ve steril pamuk uçlu eküvyon yardımıyla MHA yüzeyine homojen şekilde yayıldı. 37⁰C ‘de 24 saat (yavaş üreyenler için 36 saat) normal atmosferde inkübe edilen plaklarda oluşan zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü. Sonuçlar; duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak kaydedildi. İstatistiksel olarak değerlendirme yapılırken bazı antibiyotiklere karşı orta duyarlı bulunan suşlarda dirençli kabul edildi.

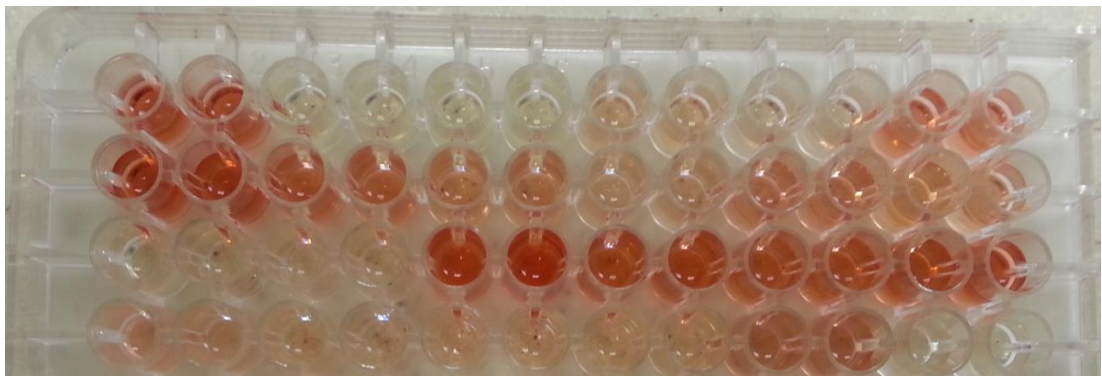
Antibiyotik diskleri:

1. Amikasin (30 mg) (BD)
2. Gentamisin (10 mg) (BD)
3. Tobramisin (10 mg) (BD)
4. Seftazidim (30 mg) (BD)
5. Sefepim (30 mg) (BD)
6. İmipenem (10 mg) (BD)
7. Meropenem (10 mg) (BD)
8. Siprofloksasin (5 mg) (BD)
9. Levofloksasin (5 mg) (BD)
10. Piperasilin (100 mg) (BD)
11. Kolitsin (10 mg) (BD)

3.4. Elastaz Üretiminin Saptanması:

Elastiyolitik aktivitenin araştırılmasında daha önce tanımlanan “Elastin Congo red” (ECR) ölçüm yöntemi uygulandı (80). Tüm klinik suşlar, *P.aeruginosa* PAO1, PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları LBB içinde 37°C’de bir gece inkübe edildi. Yarı nicel olarak elastaz üretiminin saptanması amacıyla, klinik *P. aeruginosa* suşları (n: 100) ve *P. aeruginosa* PAO-1 , PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları için hazırlanan bakteri süspansiyonları soğutmalı santrifüjde çevrilerek, elde edilen süpernatantlardan 0,5 ml, 1 ml 30 mM Tris ve 10 mg elastin kongo kırmızısı (pH: 7,2) içeren tüplere eklendi. Tüm suşlar 37°C’de 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra tüpler 3000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi ve her bir suş için ikişer kuyucuğa 200 ml süpernatant koyularak absorbans değerleri 495 nm’de optik okuyucu ile ölçüldü. Her suş için 2 kuyucuğun absorbans değerlerinin ortalaması alındı (81).

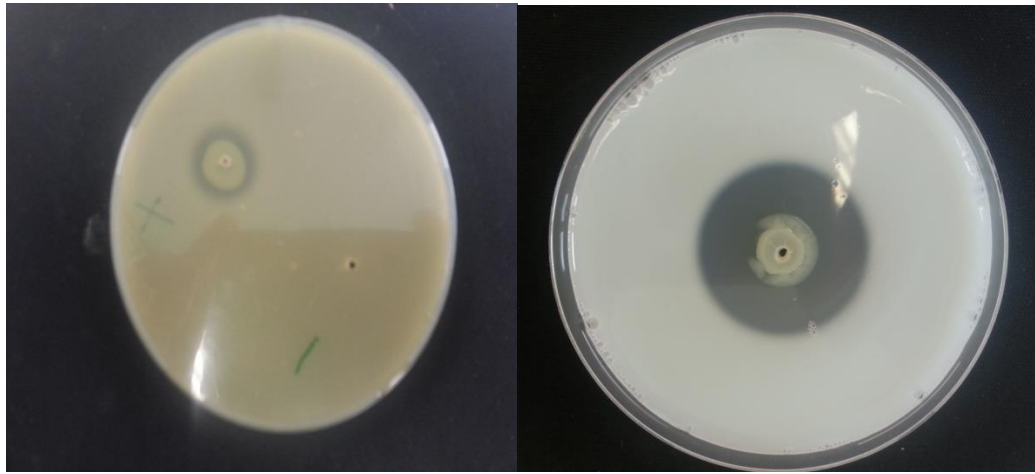
Eşik değerin (cut-off) belirlenebilmesi amacıyla elastaz üretimi negatif olan *P. aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları ile yapılan çalışmaların ortalamalarına 2 standart sapma eklenerek, %95 duyarlılıkla eşik değeri 0,474 olarak belirlendi, 495 nm’de absorbans değeri >0.474 saptanan suşlar elastaz üretimi açısından pozitif olarak değerlendirildi. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO-1 suşu, negatif kontrol olarak steril LB sıvı besiyeri kullanıldı.



Şekil 3.6. Elastaz üretiminin mikropakta saptanması, A1-2: *P. aeruginosa* PAO1 suşu (pozitif kontrol), A3-4,5-6: PAO-JP2 ve PAO-JP3 (negatif kontrolleri), diğer kuyucuklar klinik örnekler

3.5. Alkali Proteaz Üretimini Saptanması

Alkali proteaz aktivitesinin değerlendirilmesi için BHI içinde %3 “skim milk”, %1.5 agar olacak şekilde hazırlanan “skim-milk” agar (SMA) kullanıldı. Klinik örneklerden izole edilen bakteri süpernatantının 20 µl’si SMA’da steril pastör pipeti aracılığı ile hazırlanmış olan kuyucuklar içine kondu. Besiyeri 25°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri konan kuyucukların etrafında şeffaflaşma zonu görülmesi proteaz aktivitesi pozitif olarak yorumlandı (82).

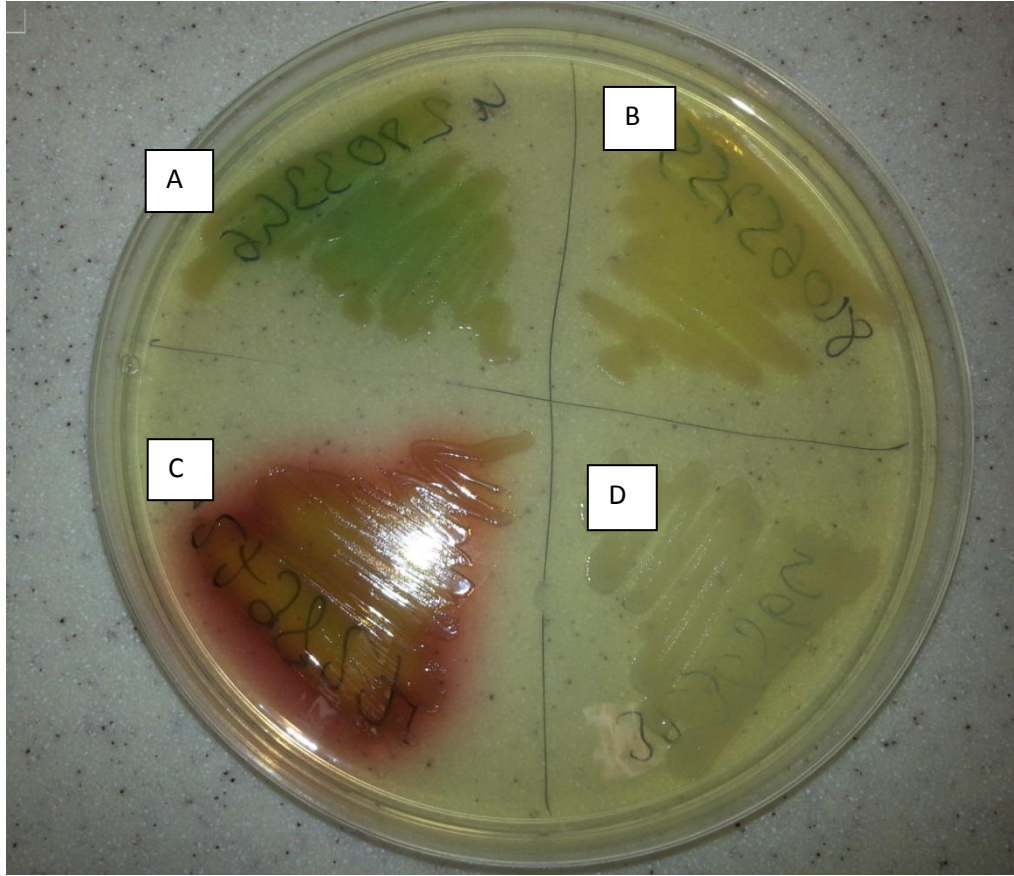


Şekil 3.7. Alkali proteaz üretiminin “skim milk” agar üzerinde saptanması

3.6. Pigment varlığının ve tipinin değerlendirilmesi

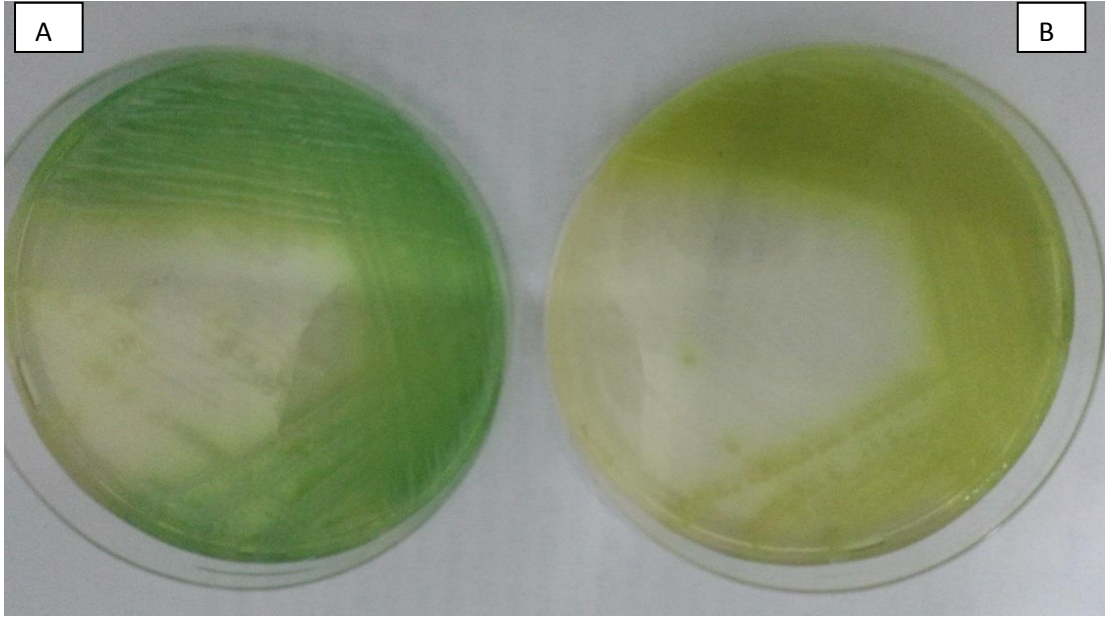
Piyoverdin pigment oluşumu, *Pseudomonas* agar F (King B) besiyeri yüzeyine, *P. aeruginosa* suşlarından ekim yapılarak 18-24 saat inkübasyondan sonra UV ışık altında değerlendirildi. Sarımsı yeşil renkte oluşumlar piyoverdin pigmenti olarak değerlendirildi.

Piyosiyanin pigment oluşumu *Pseudomonas* agar P (King A) besiyeri yüzeyine, *Pseudomonas* suşlarından ekim yapıldı. 18-24 saat inkübasyondan sonra UV ışık altında incelendi. Mavimsi yeşil ya da mavi renkte oluşumlar piyosiyanin pigment olarak değerlendirildi.



Şekil 3.8. Pigment varlığının Mueller Hinton agar üzerinde gösterilmesi

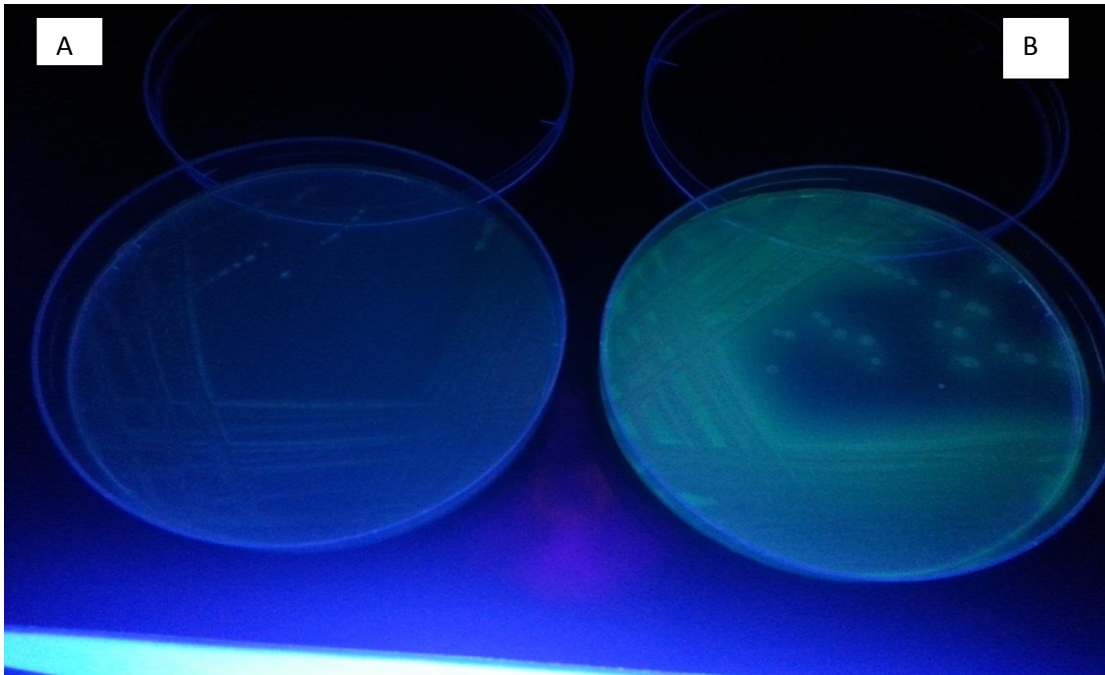
- A-Mavi yeşil pigment
- B- Sarı yeşil pigment
- C- Kırmızı pigment
- D- Pigment üretmeyen suş



Şekil 3.9. King A ve King B agardaki üremelerin günışığındaki görünüşleri.

A: King A agarda mayi-yeşil pigment üreten (piyosiyanin) *P. aeruginosa* kolonileri

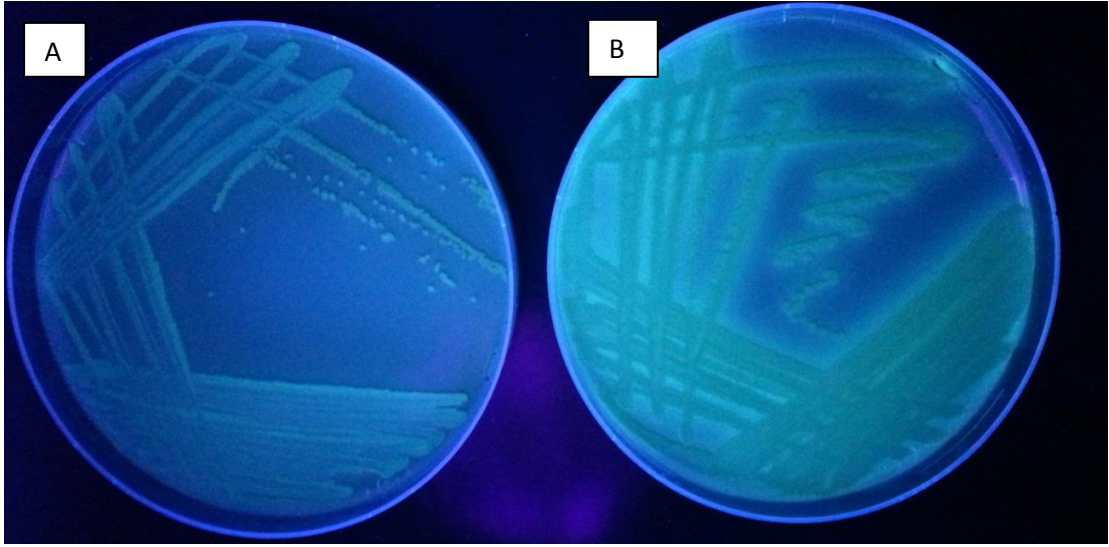
B: King B agarda sarı-yeşil pigment üreten *P. aeruginosa* kolonileri



Şekil 3.10. Piyosiyanin pigment varlığının King A ve King B agar üzerinde floresan mikroskop altında incelenmesi

A- King B agar üzerinde floresan vermeyen koloniler

B- King A agar üzerinde mavi-yeşil renkte (piyosiyanin) floresan veren koloniler



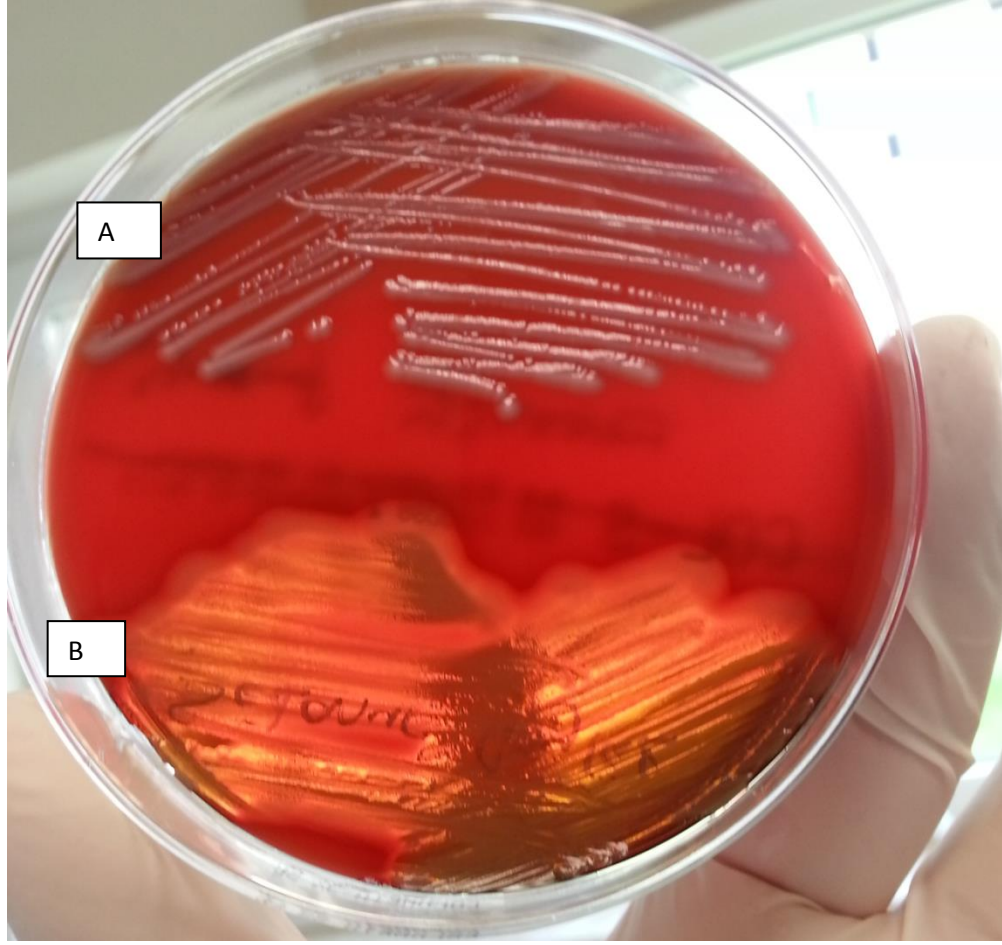
Şekil 3.11. Piyoverdin pigment varlığının King A ve King B agar üzerinde floresan mikroskop altında incelenmesi

A. King A agar üzerinde floresan vermeyen koloniler

B. King B agar üzerinde sarımsı yeşil renkte (piyoverdin) floresan veren koloniler

3.7. Hemoliz testi

Bakterilerin %5 koyun kanlı agara ekimleri yapıldı ve 37 °C de 24 saat inkübasyondan sonra bakterilerin üremeleri ve hemoliz oluşumu belirlendi.



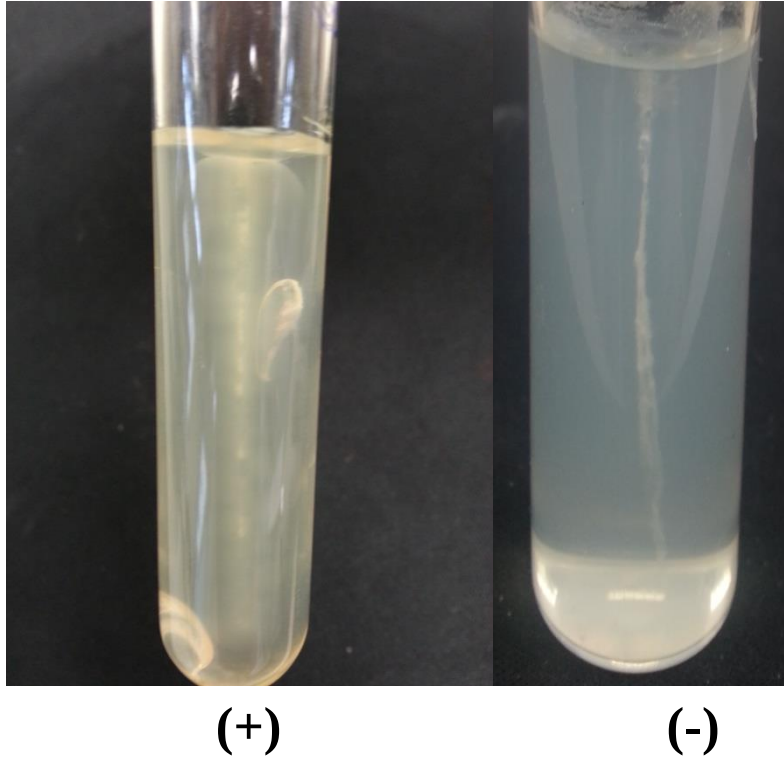
Şekil 3.12. Hemoliz varlığının %5 koyun kanlı agarda gösterilmesi

A- Hemoliz oluşturmeyan *Pseudomonas aeruginosa* kolonileri

B- Beta hemoliz yapan *Pseudomonas aeruginosa* kolonileri

3.8. Hareket testi

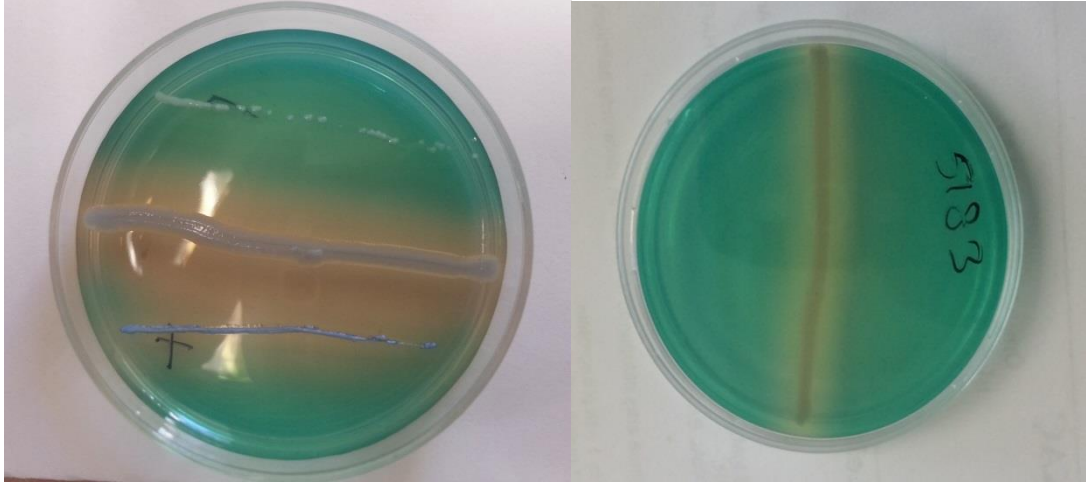
Hareket (Twitching) testi için suşlar, hareket besiyerinin dibine kadar iğne öze ile batırılarak ekildi. Kültürler 37 °C’ de 24-48 saat inkübe edildi. Ekim yapılan alandan çevreye doğru üremeler ve sisli zon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 3.13. Hareket özelliğinin hareket besiyerinde saptanması

3.9. DNaz testi

Kanlı agarda üremiş olan bakteriden steril bir öze yardımıyla alınan koloniler DNaz agar test besiyeri üzerine çizgi şeklinde inoküle edildi. Negatif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ve pozitif kontrol olarak *S. aureus* kullanıldı. Plaklar 18 ila 24 saat boyunca aerobik olarak 37 °C’de inkübe edildi. Bakteri kolonileri etrafında herhangi bir berraklaşma saptanmaması DNaz negatif olarak kabul edildi. Bakterilerin ekim çizgisinin etrafında açık zonlar oluşması ise DNaz pozitif kabul edildi.



Şekil 3.14. DNaz varlığının DNaz agarda gösterilmesi

3.10. Mukoid koloni varlığı

Mukoid koloni oluşturan suşların saptanması amacıyla tüm klinik örneklerin Mueller Hinton ağara ekimleri yapıldı ve 24 saat 37 °C de inkübe edildi.



Şekil 3.15. Kanlı agarda mukoid koloni görünümü

3.11. Virulans faktörlerinin Real-Time PCR ile araştırılması

Luria-bertani sıvı besiyerinde 18-24 saat inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının santrifüjleri yapıldı. Üstteki sıvı kısmı ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne konup fenotipik testlerin uygulanması amacıyla ayrıldı. Tüpün antında kalan kısmı fosfat tamponu ile sulandırılıp moleküler testler için kullanıldı. *P. aeruginosa* suşlarının izolasyonları High püre PCR Template Preparation kiti kullanılarak yapıldı. İzolasyonu yapılan suşlar lightcycler Fast Start DNA Master SYBR Green ve Lightcycler Kapillary (Roche Diagnostics) kullanılarak Real-time PCR uygulaması için hazırlandı. Real-time PCR uygulaması Light cycler Carousel-Based System (Roche Diagnostics) cihazı kullanılarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak PAO1 suşu kullanıldı. Kullanılan primerlerin dizileri Tablo 1 de yer almaktadır.

Primer Dizileri

Tablo 3.1. Çalışmamızda kullanılan primer dizileri

Virulans geni	Primer Dizisi	Tm sıcaklığı °C
ExoTF ExoTR	5' CAATCATCTCAGCAGAACCC 3' 5' TGTCGTAGAGGATCTCCTG 3'	54
ExoUF ExoUR	5' GATTCCATCACAGGCTCG 3' 5' CTAGCAATGGCACTAATCG 3'	62
ExoSF ExoSR	5' ATCCTCAGGCGTACATCC 3' 5' ACGACGGCTATCTCTCCAC 3'	54
ExoYF ExoYR	5' TATCGACGGTCATCGTCAGGT 3' 5' TTGATGCACTCGACCAGCAAG 3'	62
RhlAF RhlAR	5' GCGCGAAAGTCTGTTGGTAT 3' 5' CAGGTGATTGACCTCGAAGC 3'	59
RhlBF RhlBR	5' GAGCGACGAACTGACCTACC 3' 5' GTTGAACCTGGGGTGTACCG 3'	59

3.12. İstatistiksel değerlendirme

Tanımlayıcı istatistik olarak kategorik değişkenler için sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. Kategorik değişkenler için gruplar arası farklılık Pearson Ki kare, Yates düzeltilmeli ki kare veya Fisher kesin ki kare testi ile incelenmiştir. Çalışmada P değeri 0,05'den küçük olduğunda istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Tüm analizler, IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistics 21.0 programından yararlanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda; enfeksiyon etkeni olarak belirtilen klinik örneklerden alınan toplam 100 adet *Pseudomonas aeruginosa* suşu incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) suşu kullanılmıştır. Sayısal değer olarak elde edilen verilerin hepsi pozitif kontrol ile kıyaslanarak normalize edilmiştir. Elastaz ve proteaz testlerinde pozitif kontrolün yanısıra negatif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO-JP2 ve PAO-JP3 suşları kullanılmıştır. Her hastadan sadece tek klinik örnek çalışmaya dahil edilmiştir.

Hastaların 37'si kadın 63'ü ise erkektir. Yaş dağılımlarına bakıldığında ise en küçük hasta 1 en büyük hasta 90 yaşında olup ortalama yaş 28.32 dir. Cinsiyet ile virulans faktörleri arasındaki ilişki incelendiğinde elastaz, proteaz hareket, DNaz ve hemoliz aktivitesi ile cinsiyet arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sadece kadın hastalarda izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında erkek hastalara göre mukoid koloni varlığı daha yüksek bulunmuştur (%30.0 - %9.5). Ayrıca antibiyotik direnci ve cinsiyet arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

P. aeruginosa suşlarının izole edildiği hastaların yaşı ile fenotipik virulans faktörleri arasındaki ilişki çocuklarda (< 18) (n: 45) ve erişkinlerde (≤ 18) (n:55) incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Klinik örneklerden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarından yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda; kolistin direnci saptanmamıştır. Amikasin (%23), seftazidim (%17), siprofloksasin (%21), imipenem (28), meropenem (%22), piperasilin (%23), tobramisin (%19), sefepim (%24), gentamisin (%28) ve levofloksasin direnci (%27) olarak bulunmuştur (Tablo 4.2).

Erişkin hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında seftazidim, siprofloksasin, meropenem, sefepim antibiyotiklerine karşı çocuk hasta izolatlarına göre yüksek bulunan direnç istatistiksel olarak anlamlıdır. İmipenem ve piperasilin direncide erişkin hasta izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha yüksek bulunmuştur. Her iki grupta da kolistin direnci saptanmamıştır.

Tablo 4.2. Çocuk ve erişkin hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnç oranları

Antibiyotik	Çocuk hastalardan izole edilen suşlar (n:45)		Erişkin hastalardan izole edilen suşlar (n:55)		P değeri	Toplam direnç (n:100)	
	Direnç (n)	%	Direnç (n)	%		n	%
Amikasin	10	22.2	13	23.6	1.0	23	23
Seftazidim	3	6.7	14	25.5	0.026	17	17
Siprofloksasin	4	8.9	17	30.9	0.015	21	21
Kolistin	0	0	0	0	1.0	0	0
İmipenem	8	17.8	20	36.4	0.066	28	28
Meropenem	4	8.9	18	32.7	0.009	22	22
Piperasilin	7	15.6	16	29.1	0.173	23	23
Tobramisin	8	17.8	11	20.0	0.980	19	19
Sefepim	4	8.9	20	36.4	0.003	24	24
Gentamisin	11	24.4	17	30.9	0.622	28	28
Levofloksasin	11	24.4	16	29.1	0.769	27	27

Değerlendirmeye alınan örneklerin yarısı (n=50) kistik fibrozis tanısıyla takip edilen hastaların alt solunum yollarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarıdır. Diğer suşların izole edildiği örneklerin dağılımı tablo 4.3 de verilmiştir. Ayrıca örneklerin izole edildiği vücut bölgelerine göre balgam, idrar, kan, yara, konjonktiva ve püy olmak üzere altı grup ele alınarak kendi içinde karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 4.3. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri vücut bölgelerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı

Örneğin alındığı vücut bölgesi	Sayı (n)	Elastaz		Proteaz		Hareket		Hemoliz		DNaz		Mukus	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Balgam (kistik fibröz)	50	42	8	32	18	41	9	34	16	9	41	16	34
İdrar	13	12	1	10	3	12	1	13	0	2	11	0	13
Yara	14	13	1	8	6	13	1	10	4	5	9	0	14
Kan	8	8	0	7	1	8	0	7	1	3	5	1	7
Püy	14	12	2	14	0	14	0	14	0	1	13	0	14
Konjonktiva	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Toplam	100	88	12	72	28	89	11	79	21	20	80	17	83

Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşları pigment özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla King A ve King B besiyerlerine ekildi. Çalışılan 100 klinik örneğin yarısında (n:50) pigment üretimi saptanmadı. Pigment üreten suşların %64'ü piyoverdin, %26'ü piyosiyanın ve %10'u piyorubin olarak bulundu. Pigment özelliklerine göre dağılımı tablo 4.4 te verilmiştir.

Tablo 4.4. Pigment üreten *P. aeruginosa* suşlarının (n: 50) vücut bölgelerine göre pigment türlerinin dağılımı

Pigment	Balgam	İdrar	Yara	Kan	Püy	Konjonktiva	Sayı (n)
Piyoverdin	14	5	3	4	5	1	32
Piyosiyanın	8	2	1	0	2	0	13
Piyorubin	3	0	1	1	0	0	5
Toplam	25	7	5	5	7	1	50

Tablo 4.5. Tüm *P. aeruginosa* suşlarının (n: 100) virulans faktörlerinin değerlendirilmesi

Virulans faktörü	Pozitif örnekler	Negatif örnekler
Elastaz	88	12
Proteaz	72	28
Hemoliz	79	21
DNaz	20	80
Hareket	89	11
Mukus varlığı	17	83
<i>RhlA</i>	91	9
<i>RhlB</i>	88	12
<i>ExoT</i>	14	86
<i>ExoU</i>	2	98
<i>ExoS</i>	69	31
<i>ExoY</i>	88	12

Çalışmada değerlendirilen tüm *P. aeruginosa* suşlarının sahip oldukları fenotipik ve genotipik virulans faktörleri Tablo 4.5 de verilmiştir.

Tablo 4.6. *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı

Virulans faktör	Pigment üreten suşlar (n:50)		Pigment üretmeyen suşlar (n:50)		P değeri
	n	%	n	%	
Elastaz	42	84	46	92	0.356
Proteaz	48	96	24	48	0.000
Hareket	48	96	41	82	0.055
Hemoliz	49	98	30	60	0.000
DNaz	2	4	18	36	0.000
Mukus	9	18	8	16	1.000

Pseudomonas aeruginosa suşlarının pigment üretimlerine göre virulans faktörlerini incelendiğinde, elastaz aktivitesi ve mukus üretimi pigment üreten ve üretmeyen suşlarda benzer bulunmuştur. Proteaz aktivitesi (%96) ve hemoliz varlığı (%98) pigment üreten *P. aeruginosa* izolatlarında pigment üretmeyen izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur. Hareket özelliği de pigment üreten izolatlarda pigment üretmeyen izolatlara kıyasla istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ancak daha yüksek bulunmuştur. DNaz aktivitesi ise pigment üretmeyen izolatlarda pigment üretenlere kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). (Tablo 4.6)

Tablo 4.7. *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Pigment üreten suşlar (n:50)		Pigment üretmeyen suşlar (n:50)		P değeri
	Direnç (n)	%	Direnç (n)	%	
Amikasin	8	16	15	30	0.154
Seftazidim	6	12	11	22	0.287
Siprofloksasin	6	12	15	30	0.050
Kolistin	0	0	0	0	1.000
İmipenem	10	20	18	36	0.119
Meropenem	8	16	14	28	0.227
Piperasilin	9	18	14	28	0.342
Tobramisin	7	14	12	24	0.308
Sefepim	8	16	16	32	0.101
Gentamisin	11	22	17	34	0.265
Levofloksasin	10	20	17	34	0.177

P. aeruginosa suşlarının pigment üretimlerine göre antibiyotik dirençleri karşılaştırıldığında (Tablo 7); tüm izolatlar kolistine duyarlı saptanmıştır. Pigment üretmeyen suşlarda pigment üreten suşlara kıyasla sirofloksasin direnci istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Çalışılan diğer tüm antibiyotiklerde pigment üretmeyen *P. aeruginosa* izolatları pigment üreten izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin derece de daha yüksek direnç saptanmıştır.

Tablo 4.8. *P. aeruginosa* suşlarının pigment türlerine göre fenotipik virulans faktörlerinin dağılımı (n:50)

Virulans faktör	Piyoverdin (n:32)		Piyosiyanin (n:13)		Piyorubin (n:5)	
	N	%	n	%	n	%
Elastaz	29	90.6	11	84.6	5	100
Proteaz	30	93.7	13	100	5	100
Hareket	32	100	13	100	5	100
Hemoliz	32	100	13	100	4	80
DNaz	1	3.1	0	0	1	20
Mukus	6	18.7	1	7.6	2	40

Çalışma suşlarının pigment türlerine göre virulans faktörleri incelendiğinde piyoverdin, piyosiyanin ve piyorubinin virulans faktörleri arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Tüm gruplarda hareket özellikleri pozitif saptanmıştır (%100). Elastaz, proteaz, hareket ve hemoliz aktivitesi tüm gruplarda yüksek oranlarda pozitif bulunmuştur. Piyorubin pigmenti üreten tüm suşlarda elastaz, proteaz ve hareket özelliği pozitif bulunmuştur (%100). DNaz aktivitesi ise sadece iki suшта pozitif bulunmuştur (Tablo 4.8).

Tablo 4.9. Pigment türüne göre antibiyotik direnç oranları (n:50)

Antibiyotik	Piyoverdin (n:32)		Piyosiyanin (n:13)		Piyorubin (n:5)	
	n	%	n	%	n	%
Amikasin	3	9.4	4	30.8	1	20
Seftazidim	5	15.6	1	7.7	0	0
Siprofloksasin	4	12.5	2	15.4	0	0
Kolistin	0	0	0	0	0	0
İmipenem	7	21.9	3	23.1	0	0
Meropenem	7	21.9	1	7.7	0	0
Piperasilin	8	25	1	7.7	0	0
Tobramisin	5	15.6	2	15.4	0	0
Sefepim	6	18.8	2	15.4	0	0
Gentamisin	6	18.8	3	23.1	1	20
Levofloksasin	7	21.9	3	23.1	0	0

Pigment türüne göre antibiyotik direnç oranları incelendiğinde; piyorubin üreten 5 suştan kistik fibrozis hastasından izole edilen sadece bir suшта amikasin ve gentamisin direnci saptanmıştır. Çalışılan diğer tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.10. Kistik fibrozis hastalarından ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerinin karşılaştırılması

Virulans faktör	Kistik fibrozis hastalarının balgam örneklerinden izole edilen suşlar (n:50)		Diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlar (n:50)		P değeri
	n	%	n	%	
Elastaz	42	84	46	92	0.356
Proteaz	32	64	40	80	0.119
Hareket	41	82	48	96	0.055
Hemoliz	34	68	45	90	0.014
DNaz	9	18	11	22	0.803
Mukus	16	32	1	2	0.000

Çalışmamıza dahil edilen suşların yarısı (n:50) kistik fibrozis hastalarının balgam örneklerinden öteki yarısı ise (n:50) diğer vücut bölgelerinden gönderilen klinik örneklerden izole edilmiştir. Her iki grubun virulans faktörleri karşılaştırıldığında mukus üretiminin kistik fibrozis hastalarında çok daha fazla olduğu saptanmıştır. Hemoliz varlığı ise kistik fibrozis’li hasta örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında düşük bulunmuştur bu da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.014$). Diğer virulans faktörleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 10).

Tablo 4.11. Kistik fibrozis hastalarından ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranlarının karşılaştırılması

Antibiyotik	Kistik fibrozis hastalarının balgam örneklerinden izole edilen suşlar (n:50)		Diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlar (n:50)		P değeri
	Direnç (n)	%	Direnç (n)	%	
Amikasin	16	32	7	14	0.057
Seftazidim	2	4	15	30	0.001
Siprofloksasin	9	18	12	24	0.623
Kolistin	0	0	0	0	1.000
İmipenem	9	18	19	38	0.045
Meropenem	6	12	16	32	0.030
Piperasilin	8	16	15	30	0.154
Tobramisin	9	18	10	20	1.000
Sefepim	8	16	16	32	0.101
Gentamisin	14	28	14	28	1.000
Levofloksasin	15	30	12	24	0.652

Kistik fibrozis hastalarının balgam örneklerinden ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşların antibiyotik dirençleri karşılaştırıldığında; seftazidim, imipenem ve meropenem direncinin diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlara göre yüksek bulunmuştur ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). Her iki grupta da kolistin direnci mevcut değildir (Tablo 4.11).

Tablo 4.12. *P. aeruginosa* suşlarında mukoid koloni varlığı ve virulans faktörlerinin karşılaştırılması

Virulans faktör	Mukoid suşlar (n:17)		Mukoid olmayan suşlar (n:83)	
	n	%	n	%
Elastaz	15	88.2	73	88.0
Proteaz	10	58.8	62	74.7
Hareket	14	82.4	75	90.3
Hemoliz	13	76.5	66	83.5
DNaz	0	0	20	24.1

Çalışma suşlarının mukoid olan ve mukoid olmayanların virulans faktörleri karşılaştırıldığında elastaz her iki grupta da benzer bulunmuştur. Proteaz, hareket ve hemoliz aktivitesi mukoid olmayan suşlarda mukoid suşlara göre daha yüksek bulunmuştur. Mukoid suşların hiçbirinde DNaz üretimi saptanamamıştır. DNaz üretimi olan 20 suşun tamamı mukoid olmayan grupta saptanmıştır. Mukoid koloni oluşturan suşların pigment özellikleri incelendiğinde 17 suşun 8 tanesinin pigmentsiz, 6 tanesinin piyoverdin, 2 tanesinin piyorubin ve 1 tanesinin piyosiyanin oluşturduğu saptanmıştır. Antibiyotik dirençleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.13. *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı

Virulans faktör	Pigment üreten suşlar (n:50)		Pigment üretmeyen suşlar (n:50)		P değeri
	N	%	n	%	
<i>RhlA</i>	46	92	45	90	1.000
<i>RhlB</i>	49	98	39	78	0.006
<i>ExoT</i>	10	20	4	8	0.150
<i>ExoU</i>	1	2	1	2	1.000
<i>ExoS</i>	40	80	29	58	0.031
<i>ExoY</i>	50	100	38	76	0.001

Pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörleri incelendiğinde; pigment üreten suşların *rhlB*, *exoS* ve *exoY* virulans gen bölgelerine pigment üretimi olmayan suşlara göre daha fazladır bu da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). *ExoT* gen bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yine pigment üretimi olan suşlarda daha fazla saptanmıştır. *ExoU* varlığı ise her iki grupta sadece 1 adet saptanmıştır (Tablo 4.13).

Kistik fibrozis hastalarından izole edilen suşlar ve diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlar arasında genotipik virulans faktörleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

Pseudomonas aeruginosa suşlarının izole edildiği hastaların yaşı ile genotipik virulans faktörleri arasındaki ilişki çocuklarda (< 18) (n: 45) ve erişkinlerde (≤ 18) (n:55) incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 4.14. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri vücut bölgelerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı

Örneğin alındığı vücut bölgesi	Sayı (n)	<i>RhlA</i>		<i>RhlB</i>		<i>ExoT</i>		<i>ExoU</i>		<i>ExoS</i>		<i>ExoY</i>	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Balgam (kistik fibrozis)	50	45	5	46	4	11	39	1	49	31	19	46	4
İdrar	13	11	2	10	3	1	12	0	13	9	4	10	3
Yara	14	12	2	10	4	1	13	0	14	10	4	12	2
Kan	8	8	0	7	1	1	7	1	7	7	1	7	1
Püy	14	14	0	14	0	0	14	0	14	11	3	12	2
Konjonktiva	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0
Toplam	100	88	12	72	28	89	11	79	21	20	80	17	83

Klinik örneklerin izole edildiği vücut bölgelerine göre balgam, idrar, kan, yara, konjonktiva ve püy olmak üzere altı grup ele alınarak genotipik virulans faktörlerinin varlığı açısından incelenmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.15. *P. aeruginosa* suşlarının pigment türlerine göre genotipik virulans faktörlerinin dağılımı (n:50)

Virulans faktör	Piyoverdin (n:32)		Piyosiyanin (n:13)		Piyorubin (n:5)	
	N	%	n	%	n	%
<i>RhlA</i>	30	93.8	11	84.6	5	100
<i>RhlB</i>	31	96.9	13	100	5	100
<i>ExoT</i>	5	15.6	3	23.1	2	40
<i>ExoU</i>	1	3.1	0	0	0	0
<i>ExoS</i>	24	75	11	84.6	5	100
<i>ExoY</i>	32	100	13	100	5	100

ExoY tüm pigment gruplarında pozitif bulunmuştur. *ExoU* ise sadece bir adet piyoverdin pigmenti üreten suşta pozitif saptanmıştır. Piyorubin üreten suşlar incelendiğinde tüm suşların *rhlA*, *rhlB*, *exoS*, *exoY* virulans genlerine sahip oldukları görülmüştür. Bu suşlar detaylı incelendiğinde antibiyotiklerin hemen hepsine duyarlı oldukları saptanmıştır (bir örnekte sadece amikasin ve gentamisin direnci mevcuttur).

Fenotipik ve genotipik virulans faktörleri kendi aralarında karşılaştırıldığında hareketli suşlarda *rhlB* pozitifliği daha yüksek bulunmuştur (82/89) (p:0.003). *RhlA* pozitifliği ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hareketli suşlarda daha yüksek bulunmuştur (83/89) (Tablo 4.15).

ExoS pozitifliği hareket özelliği pozitif olan ve hemoliz varlığı gösteren suşlarda istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.003, p:0.001).

Hemoliz varlığı gösteren suşlarda ise *ExoS* varlığı yüksek bulunmuştur (p:0.007).

Proteaz aktivitesi olan suşlarda ise *RhlB*, *ExoT*, *ExoS* ve *ExoY* pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; p:0.000, p:0.009, p:0.020, p:0.031)

Genotipik virulans faktörleriyle fenotipik virulans faktörleri olan DNaz, elastaz ve hemoliz özellikleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa son yıllarda yükselen insidansı, ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli artan antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkenidir. Doğada yaygın olan bu mikroorganizmalar, fırsatçı patojenlerdir. Genellikle sağlıklı kişilerde hastalık oluşturmamasına rağmen bağışık yanıtın yetersiz olduğu durumlarda salgıladığı çeşitli virulans faktörlerinin etkisi ile hayatı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Özellikle kistik fibrozis, kanser, yanık, immünsüpresif ve travmatik yarası olan hastalarda mortalite ve morbiditesi yüksek, ciddi enfeksiyonlar oluşturmaktadır.

Çalışmamızda kadın hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında erkek hastalara göre mukoid koloni varlığı istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Sanjay ve ark yaptığı çalışmada östrojen ile *P. aeruginosa*'nın mukoid formu arasındaki ilişki icelenmiş ve östrojen türevleri olan östradiol ve östriolün *P. aeruginosa*'nın mukoid forma geçmesini çeşitli mutasyonlarla indüklediği gösterilmiştir (83).

P. aeruginosa suşlarının antibiyotik direnci incelendiğinde kolisitin direnci saptanmamakla birlikte diğer antibiyotiklerin direnci %17 ile %28 arasında bulunmuştur. En yüksek direnç imipenem ve gentamisin antibiyotiklerine karşı (%28) bulunmuş olup, seftazidim direnci ise sadece %17 bulunmuştur. Finlayson ve ark yaptığı çalışmada imipenem direnci saptanmamış seftazidim direnci ise düşük bulunmuştur (4). Tunçoğlu ve ark yaptığı çalışmada en düşük direnç amikasinde (%5.6) saptanmıştır (84). Bizim çalışmamızda ise amikasin direnci %23 olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda ise amikasin direnci % 2-34 arasında değişmektedir (85-87).

Çalışmamızda siprofloksasin direnci % 21 olarak bulunmuştur. Ülkemizden bildirilen çeşitli çalışmalarda bu oran % 7-46.6 arasında değişmektedir (84-87). Kirby ve ark.'nın yapmış oldukları çok merkezli çalışmada siprofloksasin direncinin Kuzey Amerika'da % 26, Latin Amerika'da % 49 ve Avrupa'da % 27 olduğu bildirmiştir (88). En yüksek siprofloksasin direnç oranı % 80.3 olarak Bulgaristan'dan bildirilmiştir (89). Çalışmamızda seftazidim direnci % 17, sefepim

direnci % 24, piperasilin direnci % 23 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda seftazidim direnci % 15.2-62 (84,86,87,90) , sefepim direnci % 21-34 (87,90) , piperasilin direnci % 18-33 (84,87) olarak bildirilmiştir. İmipenem ve meropenem direnci sırasıyla %28 ve %22 bulunmuştur.

Erişkin hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında direnç oranları çocuk hasta suşlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum yaşla beraber antibiyotik kullanımındaki artış ve buna bağlı bakterinin geliştirdiği direnç mekanizmalarıyla açıklanabilir.

Tunçoğlu ve ark yaptığı çalışmada impenem (%7.8) ve meropenem (%9.5) diranci düşük oranlarda saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise imipenem ve meropenem direnci sırasıyla %28 ve %22 bulunmuştur. Dünder ve ark yaptığı çalışmada ise hastanelerinde yaygın karbapenem kullanımına bağlı bu oranlar imipenem (%21) ve meropenem (%22) olarak bizim sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur.

Hücrelerarası iletişim *P. aeruginosa*'nın konakçı savunmasına karşı koymasında önemli rol oynamaktadır. Bakteri sayıca az iken sessiz kalarak konakçı savunma sistemlerini uyaracak özelliklerini gizlemekte, yeterli bakteri yoğunluğuna erişildiğinde ilgili genleri aktive ederek çeşitli virulans faktörlerini üretmeye başlamaktadır (91). “Quorum sensing” yoluyla tüm bakteri popülasyonunun bir koordinasyon içinde davranması sağlanmaktadır.

Çeşitli çalışmalarla virulans faktörleri ile *P. aeruginosa*'nın izole edildiği vücut bölgeleri arasında ki ilişki incelenmiş ve *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patogenezi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Woods ve ark. farklı klinik örneklerden (yanık bölgesi, yara, idrar, kan, KF hastası balgamı, akut pnömonili hasta balgam örneği) izole edilmiş *P. aeruginosa* kökenlerinin virülans faktörü üretimi açısından farklılıklarını araştırmışlardır. KF hastalarının balgamlarından izole edilen suşlarda proteaz varlığı (%40) diğer klinik örneklerde (%90) göre oldukça düşük olduğunu belirlemişlerdir (71). Bizim çalışmamızda ise balgam örneklerindeki proteaz pozitifliği % 64 diğer vücut bölgelerinde ise %80 olarak bulunmuştur. Kan izolatlarında saptanan yüksek toplam proteaz, fosfolipaz C ve ekzotoksin A seviyeleri, bu faktörlerin bakteriyemiden sorumlu faktörler olabileceği lehinde

yorumlanmıştır. Kan izolatlarının (n:8) tamamının elastaz üretimi olan hareketli suşlar olduğu saptanmıştır.

Alkali proteaz akut akciğer enfeksiyonlarının erken döneminde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin eritilmesinden ve enfeksiyonun ilerlemesinden sorumludur. Ayrıca alkali proteazın elastaz gibi silyalı solunum yolu epiteli üzerine yıkıcı özelliği olduğu gösterilmiştir (92). Alkali proteaz enzimi karaciğer, kornea ve deride nekroz oluşturur. “Ecthyma gangrenosum” adı verilen deri lezyonlarının oluşumunda da proteazlar rol oynar (Şekil.3). Proteazlar doku harabiyeti oluşturdukları için aynı zamanda bakterinin dokular arasında yayılımını kolaylaştırır.

Çıragil ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının elastaz, proteaz ve alginat özellikleri çalışılmıştır. Çıragil ve ark. Alkali proteaz varlığını KF hasta izolatlarında %52, KF dışı hasta izolatlarında %61 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise kistik fibrozis’li hasta balgamlarında proteaz pozitifliği %64, diğer vücut bölgelerinden izole edilen izolatlarda ise %80 bulunmuştur. Elastaz üretiminde vücut bölgelerine göre istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır (93). Bizim çalışmamızda da vücut bölgeleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanamamış olup izolatların çoğu elastaz pozitif (%88) saptanmıştır.

Çalışmamızda bulunan konjoktivadan izole edilen *P. aeruginosa* suşu elastaz, proteaz, hareket ve hemoliz gibi virulans faktörlerine sahipti ancak DNaz aktivitesi yoktu. Esterellas ve ark yaptığı çalışmada göz örneklerinde alkali proteaz varlığı saptanmıştır (94). Başka bir çalışmada da gözden alınan bir örnekten *P.aeruginosa*’nın virulans faktörleri çalışılmış bizim sonuçlarımıza benzer şekilde piyoverdin pigmenti varlığı saptanmış ancak DNaz aktivitesi gösterilememiştir (4).

Klinik örneklerde pigment varlığını araştıran bir çalışmada pigmentli 100 izolat incelenmiş ve %35’inde piyosiyenin %63’ünde ise piyoverdin üretimi saptanmıştır (95). Pigment varlığını araştıran bir başka çalışmada ise 57 izolatın 47’si (%82.5) pigment üreten izolat olarak bulunmuş ve çoğunluğu piyoverdin (%78.9) üreten izolat olduğu gösterilmiştir (4). Bizim çalışmamızda ise pigmentli 50 izolatın 32’sinin (%64) piyoverdin, 13’ünün (%26) piyosiyenin, 5’inin (%10) ise piyorubin ürettiği bulunmuştur.

Piyosiyanin *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan mavi yeşil renkli pigment olup memeli hücrelerini ve bakterileri öldürebilen redoks-aktif fenazin bileşiğidir. *Pseudomonas* türleri arasında sadece *P. aeruginosa* piyosiyanin üretmektedir. *P. aeruginosa* ile enfekte kistik fibrozis'li hastaların balgam örneklerinde piyosiyanin üretimi yaygın olarak görülebilmektedir. Bizim çalışmamızda da pigment üreten 25 izolatın 8'inin piyosiyanin olduğu saptandı. *P. aeruginosa* tarafından üretilen birçok virulans faktörünün yanında piyosiyaninin tespitinde yaşana zorluklar nedeniyle piyosiyaninin çoğul hücrel fonksiyonları ile ilişkisi in vitro olarak yapılan çalışmalarla gösterilmesine rağmen klinik olarak enfeksiyonlardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır (96). Piyosiyaninle ilgili yapılan çalışmalarda solunum yollarındaki epitelyal hücrelerde siliyal fonksiyonları inhibe ettiği gösterilmiştir (97,98).

Finlayson ve ark yaptığı çalışmada pigmentli *P. aeruginosa* suşlarının pigmentsiz suşlara göre daha yüksek proteaz, elastaz, DNaz, hareket ve lipaz aktivitesi bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise elastaz aktivitesi ve mukus üretimi pigment üreten ve üretmeyen suşlarda benzer bulunmuştur. Proteaz aktivitesi (%96) ve hemoliz varlığı (%98) ise pigment üreten *P. aeruginosa* izolatlarında pigment üretmeyen izolatlara göre ($p \leq 0.05$) daha yüksek bulunmuştur. Hareket özelliği de pigment üreten izolatlarda pigment üretmeyen izolatlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. DNaz aktivitesi ise tam tersi bir şekilde pigment üretmeyen izolatlarda pigment üretenlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Finlayson ve ark DNaz aktivitesini pigmentsiz suşlarda daha az bulmaları bizim çalışmamıza oranla daha az sayıda pigmentsiz *P. aeruginosa* suşu (n:10) ile çalışmaları ile açıklanabilir (4).

Amitani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kronik bronşiyal enfeksiyonlu hastalarda *P.aeruginosa*'nın ürettiği elastazın mukosiliyer temizlenmenin gecikmesine yol açtığını göstermişlerdir (99). Bizim çalışmamızda da kistik fibrozisli hastaların balgamlarından izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında %84 elastaz pozitifliği saptanmıştır. *Pseudomonas*'ların kistik fibrozis hastalarının alt solunum yollarında zararsız kolonizasyon yapmadıkları görülmektedir. Ancak *P. aeruginosa*'nın patojen olmasının ardındaki mekanizmalar net değildir. Bu virulans faktörlerinin bilinmesi kistik fibrozisli hastaların yaşam kalitesine katkı sağlayabilecek tedavilere de katkı sağlayabilir.

Yapılan bazı çalışmalarda idrar örneklerinde piyosiyanın ve biyofilm üretimi yara ve alt solunum yolları örneklerine göre daha fazla bulunmuştur (100,101). Bizim çalışmamızda ise piyosiyanın üretimi açısından fark bulunamamıştır. Bu durum çaıştığımız idrar izolatının azlığına bağlanabilir (n:7).

Elastaz üretiminin *P. aeruginosa* akciğer enfeksiyonları patogenezindeki önemi açıkca ortaya konmuş olup solunum yolu örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının %73-95 oranında bu enzimi ürettiği gösterilmiştir (93,102,103). Yapılan bir çalışmada kronik akciğer hastalığı olan hastalardan izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında %93 oranında proteaz ürettiklerini açıklamışlar ve hasta serumlarında elastaz ve alkali proteaza karşı antikor bulunması enfeksiyonun oluşumunda, bu enzimlerin oynadığı rolün önemini göstermiştir (104). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda ise elastaz üretimi %88, alkali proteaz üretimi %72 bulunmuştur. Klinik ve çevre örneklerinden yapılan bir araştırmada klinik örneklerde ki elastaz üretimi %78,84 proteaz üretimi %71.15, doğadan elde edilen örneklerde ise elastaz %74.5 proteaz %56.8 bulunmuştur (95). Klinik örneklerde daha yüksek enzim aktivitesi saptanmıştır. Klinik örneklerden izole edilen başka bir çalışmada da incelenen *P. aeruginosa* izolatlarının %63.3'ünde proteaz varlığı gösterilmiştir (105).

P. aeruginosa ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve artan antibiyotik direnç oranlarıyla tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle bakterinin patogenezinde önemli rol oynayan QS sisteminin ve virulans faktörlerinin daha iyi anlaşılmasının yeni bir tedavi stratejisine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı olarak QS inhibisyonunun bakteri hücresinde virulans genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virulansının azaltılmasının enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen veriler; günümüzde bazı suşları çoğul antibiyotik dirençli ve hatta pan-rezistan olan *P.aeruginosa* suşlarının neden olduğu, (özellikle persistan ve kronik olmak üzere) enfeksiyonların tedavisindeki yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır.

Bakterinin ürettiği enzimler veya çoklu ilaç pompaları sayesinde doğal olarak birçok antibiyotiğe doğal direnç göstermesi ve mutasyonlar yardımıyla birçok tedavi

seçeneğine karşı hızla direnç kazanması sebebiyle antibiyotiklere direnç varlığı da *P. aeruginosa* için virulans faktörler arasında değerlendirilmektedir (100). Bu durum tedavide ciddi zorluklara neden olmaktadır.

P. aeruginosa suşlarının amikasin (30 mg), gentamisin (10 mg), tobramisin (10 mg), seftazidim (30 mg), sefepim (30 mg), imipenem (10 mg), meropenem (10 mg), siprofloksasin (5 mg), levofloksasin (5 mg), piperasilin (100 mg), kolitsin (10 mg) duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre belirlenmiştir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılığı Kirby – Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak çalışılmıştır.

Çalışılan tüm *P. aeruginosa* suşları kolistine duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışma suşlarımızda virulans faktör üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki incelendiğinde elastaz üretimi ile antibiyotik direnci arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Proteaz üretimi ile antibiyotik direnci karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte alkali proteaz üreten kökenlerin bu enzimi üretmeyen suşlara göre amikasine, seftazidime, siprofloksasine, piperasiline, tobramisine, sefepime, gentamisine ve levofloksasine daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. İmipenem ve meropenem direnci ve proteaz üretimi arasında fark saptanamamıştır. Karatuna ve ark yaptığı çalışmada elastaz üreten suşların piperasilin ve seftazidime, alkali proteaz üreten suşların ise tobramisin, piperasilin, sefepim, imipenem ve siprofloksasine daha duyarlı oldukları saptanmıştır (103).

Hareket varlığı ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelenmiş ve anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışılan suşlarda beta hemoliz varlığı ve antibiyotik direnci incelendiğinde; hemoliz yapan suşların (%82.3) hemoliz yapmayan suşlara (%57.1) göre amikasin duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla birlikte beta hemoliz yapan suşlarda hemoliz yapmayanlara oranla siprofloksasin (%82.3 - %66.7), piperasilin (%79.7 - %66.7), tobramisin (%83.5 - %71.4), sefepim (%79.7 - %61.9) duyarlılıkları daha yüksek bulunmuştur.

DNaz varlığı ve çalışılan antibiyotiklerin direnci arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. *P. aeruginosa* suşlarındaki mukoid koloni varlığı ve antibiyotik direnci karşılaştırıldığında tüm mukoid suşların (n:17) seftazidime ve kolistine

duyarlı oldukları saptanmıştır. Amikasin (n:16) % 94.1, siprofloksasin (n:16) % 94.1, imipenem (n:15) %88.2, meropenem (n:16) % 94.1, piperasilin (n:14) %82.4, tobramisin (n:15) %88.2, sefepim (n:16) % 94.1, gentamisin (n:13) %76.5, levofloksasin (n:9) % 52.9 duyarlı olarak bulunmuştur. En yüksek direnç oranı levofloksasinde saptanmıştır (%47.1).

Mukoid olan ve mukoid olmayan grupların antibiyotik dirençleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Manno ve ark. kistik fibrozis hastalarında antimikrobiyal direnç araştırdıkları çalışmalarında mukoid formdaki *P. aeruginosa* suşlarının mukoid olmayan suşlara göre imipenem, amikasin, tobramisin, netilmisin ve siprofloksasine daha dirençli olduğunu saptamışlardır (106). Çalışmamızda az sayıda mukoid suş (n:17) bulunması sebebiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmamış olabiliriz.

Pigment varlığı ve virulans ilişkili genler arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada en sık *exoS* (%51), *rhIA* (%37) ve *rhIB* (%46) genleri saptanmıştır. *ExoY* gen bölgesi hariç diğer gen bölgeleri pigment üreten grupta pigment üretmeyen gruba göre daha yüksek bulunmuştur. *ExoU* gen bölgesi hiçbir suшта saptanamamıştır (4). Bizim çalışmamızda ise; pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörleri incelendiğinde; pigment üreten suşların *rhIB*, *exoS* ve *exoY* virulans gen bölgelerine pigment üretimi olmayan suşlara göre daha fazla sahip oldukları görülmüştür. *ExoT* gen bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte pigment üretimi olan suşlarda daha fazla saptanmıştır. Her iki gruptan birer adet olmak üzere 2 suшта *ExoU* gen bölgesi saptanmıştır.

Çalışma suşlarının pigment türlerine göre virulans faktörleri incelendiğinde piyoverdin, piyosiyenin ve piyorubinin virulans faktörleri arasında istatistiksel bir fark saptanamamıştır. Piyorubin pigmenti üreten tüm suşlarda (n:5) elastaz, proteaz ve hareket özelliği gibi fenotipik virulans faktörler ve *rhIA*, *rhIB*, *exoS*, *exoY* gibi genotipik virulans faktörleri pozitif bulunmuştur. Bu hasta suşları incelendiğinde sadece bir kistik fibrozis hastasından izole edilen suшта amikasin ve gentamisin direnci saptandı. Çalışılan diğer tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları saptanmıştır.

ExoY'nin sitozolik cAMP'yi artırarak pulmoner vasküler hücrelerde hücrelerarası boşluk oluşumunun artmasına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına

neden olur. *ExoY* virulans gen bölgesi; pigmentli suşların hepsinde tespit edilmiştir. Finlayson ve ark. yaptığı çalışmada *exoY* gen bölgesi %19.29 oranında tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu oran %88 olarak bulunmuştur. Bu durum bizim çalışmamızda suşların yarısının kistik fibrozis gibi kronik pulmoner hastalıklarla seyreden hastalık grubundan alınmasıyla açıklanabilir.

ExoU güçlü bir sitotoksindir ve çeşitli hedef hücreleri parçalar. *ExoU*, daha çok göz enfeksiyonları ve akut pnömonilerden izole edilir ve son derece ölümcül suşlar için bir belirteçtir. Çalışmamızda sadece 2 adet *exoU* geni saptanmıştır. Bu durum çalışma grubumuzda sadece bir göz enfeksiyonu (konjonktivit) bulunması ve kistik fibrozis gibi kronik enfeksiyonlardan izole edilen suşlarla çalışılması ile açıklanabilir. İlginç bir şekilde, kistik fibrozis hastalarında da nadiren *exoU* gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda 50 kistik fibrozis hastasından birinde *exoU* gen bölgesi saptanmıştır.

ExoS kronik akciğer enfeksiyonlarına, yanık ve yaralara sebep olan ve bakterinin yayılmasına yardımcı olan önemli bir faktördür. Çalışmamızda *exoS* gen bölgesi %69 oranında saptanmıştır. Bu oran çalışma grubumuzun kistik fibrozis gibi kronik akciğer enfeksiyonu olan hastalardan (%50) ve yara enfeksiyonlarından izole edilen suşlardan (%14) yüksek oranda çalışılması ile açıklanabilir.

P.aeruginosa enfeksiyonlarından sorumlu suşların pigment üretimleri ile virulans faktörleri arasındaki ilişki ile ilgili yeterince çalışma ortaya konmamıştır. Ayrıca pigmentli olan *P. aeruginosa* suşları ile pigment üretmeyen suşlar arasındaki ve kistik fibrozis gibi sık enfekte olan hasta grubuyla diğer vücut bölgelerinden izole edilen suşlar arasındaki virulans faktörleri arasındaki farklar da yeterince çalışılmamıştır. Bu çalışmada kistik fibrozis hastalarından izole ettiğimiz balgam örnekleriyle, diğer vücut bölgelerinden izole ettiğimiz pigment üreten ve pigment üretmeyen *P.aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerini fenotipik ve genotipik olarak incelenmiştir.

Pigment üreten klinik suşların hem fenotipik hemde genotipik virulans faktörlerine pigment üretmeyen suşlara kıyasla daha çok sahip oldukları görülmüştür. Pigment üreten ve virulans faktörler yönünden daha zengin olan bu suşların antibiyotik direnç oranları ise daha düşük bulunmuştur. Bu durum genetik

adaptasyon (“genetic fitness”) ile açıklanabilir. Bakterilerin antibiyotiklere daha duyarlı olabilmek için virulans genlerinden fedakarlık edip antibiyotik direnç genleri ile donanımlı oldukları düşünülmektedir. Çünkü bakteri kazanacağı her ekstra genetik bilgi için bir başka genetik bilgiden vazgeçmek zorunda kalacaktır. Pigment varlığını değerlendirmek suşun virulansı ve antibiyotik direnci hakkında fikir sahibi olunması açısından iyi bir başlangıç olabilmektedir. Bu araştırmanın verilerinin, çok daha büyük hasta sayıları ile desteklenmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

- 1- Klinik örneklerden elde edilen *P. aeruginosa* suşlarından (n:100) yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda; kolistin direnci saptanmamıştır. Amikasin (%23), seftazidim (%17), siprofloksasin (%21), imipenem (28), meropenem (%22), piperasilin (%23), tobramisin (%19), sefepim (%24), gentamisin (%28) ve levofloksasin direnci (%27) olarak bulunmuştur.
- 2- Tüm *P. aeruginosa* suşlarının (n:100) virulans faktörleri değerlendirildiğinde; elastaz (%88), proteaz (%72), hemoliz (%79), DNaz (%20), hareket (%89), mukus varlığı (%17), *rhlA* (%91), *rhlB* (%88), *exoT* (%14), *exoU* (%2), *exoS* (%69), *exoY* (%88) oranında pozitif saptanmıştır.
- 3- *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre fenotipik virulans faktörlerini incelendiğinde, elastaz aktivitesi ve mukus üretimi pigment üreten ve üretmeyen suşlarda benzer bulunmuştur. Proteaz aktivitesi (%96) ve hemoliz varlığı (%98) pigment üreten *P. aeruginosa* izolatlarında pigment üretmeyen izolatlara göre ($p \leq 0.05$) daha yüksek bulunmuştur. Hareket özelliği de pigment üreten izolatlarda pigment üretmeyen izolatlara kıyasla istatistiksel açıdan olmasa da daha yüksek bulunmuştur. DNaz aktivitesi ise pigment üretmeyen izolatlarda pigment üretenlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0.05$).
- 4- Pigment üretimlerine göre genotipik virulans faktörleri incelendiğinde; pigment üreten suşların *rhlB*, *exoS* ve *exoY* virulans gen bölgelerine pigment üretimi olmayan suşlara göre daha fazla sahip oldukları görülmüştür ($p \leq 0.05$). *ExoT* gen bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı olmamla birlikte yine pigment üretimi olan suşlarda daha fazla saptanmıştır.
- 5- *P. aeruginosa* suşlarının pigment üretimlerine göre antibiyotik dirençleri karşılaştırıldığında; pigment üretmeyen suşlarda pigment üreten suşlara kıyasla siprofloksasin direnci daha yüksek bulundu ($p \leq 0.05$). Çalışılan diğer antibiyotiklerde pigment üretmeyen *P. aeruginosa* izolatlarında pigment üreten izolatlara göre daha yüksek direnç oranları saptandı.

- 6- Çalışma suşlarının pigment türlerine göre virulans faktörleri incelendiğinde piyoverdin, piyosiyanin ve piyorubinin virulans faktörleri arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Speert, D.P., Campbell, M.E., Davidson, A.G., Wong, L.T. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 167 (1), 226-229.
2. Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, 4 (4), 551-560.
3. Demir, M., Cevahir, N., Kaleli, I., Yildirim, U., Sahin, R., Tepeli, E.C. (2008) Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 42 (2), 197-208.
4. Finlayson, E.A., Brown, P.D. (2011) Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, 60 (1), 24-32.
5. Livermore, D.M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34 (5), 634-640.
6. Govan, J.R., Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 60 (3), 539-574.
7. Linker, A., Jones, R.S. (1966) A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *J Biol Chem*, 241 (16), 3845-3851.
8. Burke, V., Robinson, J.O., Richardson, C.J., Bundell, C.S. (1991) Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Pathology*, 23 (2), 145-148.
9. Mahenthiralingam, E., Campbell, M.E., Speert, D.P. (1994) Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 62 (2), 596-605.
10. Hancock, R.E., Speert, D.P. (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*, 3 (4), 247-255.
11. Murray, P.R. (2007). Tıbbi Mikrobiyoloji (B. şener, Çev.). Ankara: Atlas Kitapçılık 734-748.
12. Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., Saier, M.H. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology-Sgm*, 149, 3051-3072.

13. Palleroni, N.J. (2003) Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology-Sgm*, 149, 1-7.
14. Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Pattemore, P.K., Epton, M., Laing, R., Pearson, J. Chambers S.T. (2010) 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Bmc Pulmonary Medicine*, 10.
15. Aylin Şen, A.K.H. (2006) Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4 (2), 2-13.
16. Meyer, J.M. (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174 (3), 135-142.
17. Liu, G.Y.,Nizet, V. (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17 (9), 406-413.
18. Remington, J.S.,Schimpff, S.C. (1981) Please Dont Eat the Salads. *New England Journal of Medicine*, 304 (7), 433-435.
19. Shannon, K.P.,French, G.L. (2004) Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (5), 818-825.
20. Speert, D.P., Campbell, M.E., Henry, D.A., Milner, R., Taha, F., Gravelle, A. A. Davidson A.G., Wong L.T., Mahenthiralingam E. (2002) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (7), 988-993.
21. Driscoll, J.A., Brody, S.L.,Kollef, M.H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67 (3), 351-368.
22. Woods, D.E. (2004) Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*, 12 (10), 437-439.
23. Karatuna, O.Y., A. (2008) *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 1 (38), 42-51.
24. Smedley, J.G., Jewell, E., Roguskie, J., Horzempa, J., Syboldt, A., Stolz, D.B. Castric P. (2005) Influence of pilin glycosylation on *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilus function. *Infect Immun*, 73 (12), 7922-7931.
25. Jain, S.,Ohman, D.E. (2005) Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 73 (10), 6429-6436.
26. Lagournintzis, G., Christofidou, M., Ditnitracopoulos, G.,Paliogianni, F. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of

tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect Immun*, 71 (8), 4614-4622.

27. Alcorn, J.F., Wright, J.R. (2004) Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (29), 30871-30879.
28. Wienerkronish, J.P., Sakuma, T., Kudoh, I., Pittet, J.F., Frank, D., Dobbs, L. . Vasil M.L., Matthay M.A. (1993) Alveolar Epithelial Injury and Pleural Empyema in Acute *Pseudomonas-Aeruginosa* Pneumonia in Anesthetized Rabbits. *Journal of Applied Physiology*, 75 (4), 1661-1669.
29. Hamood, A.N., Griswold, J., Colmer, J. (1996) Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 64 (8), 3154-3160.
30. Hobden, J.A. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. *DNA and Cell Biology*, 21 (5-6), 391-396.
31. Kipnis, E., Guery, B.P., Tournoy, A., Leroy, X., Robriquet, L., Fialdes, P. P. Nevriere R., Fourier F. (2004) Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock*, 21 (5), 444-451.
32. Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., Thomashow, L.S. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 183 (21), 6454-6465.
33. Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., Britigan, B.E. (1998) *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*, 66 (12), 5777-5784.
34. Lau, G.W., Ran, H.M., Kong, F.S., Hassett, D.J., Mavrodi, D. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*, 72 (7), 4275-4278.
35. Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., Holder, I.A. (1996) Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 64 (2), 518-523.
36. Wick, M.J., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. (1990) Analysis of the Structure-Function Relationship of *Pseudomonas-Aeruginosa* Exotoxin-A. *Mol Microbiol*, 4 (4), 527-535.
37. Hauser, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (9), 654-665.
38. Nicas, T.I., Iglewski, B.H. (1985) The Contribution of Exoproducts to Virulence of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Can J Microbiol*, 31 (4), 387-392.

39. Shaver, C.M., Hauser, A.R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*, 72 (12), 6969-6977.
40. Mitov, I., Strateva, T., Markova, B. (2010) Prevalence of Virulence Genes among Bulgarian Nosocomial and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (3), 588-595.
41. Bradbury, R.S., Roddam, L.F., Merritt, A., Reid, D.W., Champion, A.C. (2010) Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (8), 881-890.
42. Schulert, G.S., Feltman, H., Rabin, S.D.P., Martin, C.G., Battle, S.E., Rello, J. Hauser A.R. (2003) Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 188 (11), 1695-1706.
43. Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H.R., VandeWaa, J., Stevens, T. (2004) Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circulation Research*, 95 (2), 196-203.
44. Toutain, C.M., Zegans, M.E., O'Toole, G.A. (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 187 (2), 771-777.
45. Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, 9 (5), 222-227.
46. Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 66 (2), 86-92.
47. Edwards, R., Harding, K.G. (2004) Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17 (2), 91-96.
48. Harrison-Balestra, C., Cazzaniga, A.L., Davis, S.C., Mertz, P.M. (2003) A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surgery*, 29 (6), 631-635.
49. Gambello, M.J., Iglewski, B.H. (1991) Cloning and Characterization of the *Pseudomonas-Aeruginosa* Lasr Gene, a Transcriptional Activator of Elastase Expression. *J Bacteriol*, 173 (9), 3000-3009.
50. Gera, C., Srivastava, S. (2006) Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Current Science*, 90 (5), 666-676.

51. Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., Hamood, A.N. (1999) Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun*, 67 (11), 5854-5862.
52. Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H., Prince, A. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun*, 68 (7), 4331-4334.
53. Wu, H., Song, Z.J., Givskov, M., Doring, G., Worlitzsch, D., Mathee, K., Rygaard J., Hoiby N. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhII quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology-Sgm*, 147, 1105-1113.
54. Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A. Hamood A.N. (2004) Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 53 (9), 841-853.
55. Balke, B., Hoy, L., Weissbrodt, H., Haussler, S. (2004) Comparison of the Micronaut Merlin automated broth microtiter system with the standard agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23 (10), 765-771.
56. Pier, G., Ramphal, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*, (7th edition bs., c. 2). Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2835-2860.
57. Gallagher, P.G., Watanakunakorn, C. (1989) *Pseudomonas* Bacteremia in a Community Teaching Hospital, 1980-1984. *Reviews of Infectious Diseases*, 11 (6), 846-852.
58. Livermore, D.M. (1995) Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (4), 557-&.
59. Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M., Samore, M.H. (1999) Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 43 (6), 1379-1382.
60. DH., A. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*, 56, 344-399.
61. Riordan JR, R.J., Kerem B-T, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245 (1066).
62. Collins, F.S. (1992) Cystic-Fibrosis - Molecular-Biology and Therapeutic Implications. *Science*, 256 (5058), 774-779.

63. Bethesta. (2011). Cystic Fibrosis Foundation: Patient Registry Annual Data Report (Rapor No: 2011).
64. Kiper, N., Yalçın, E. (2003) Kistik Fibrozis. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 12 (5), 131-133.
65. Stern, R.C. (1997) Current concepts - The diagnosis of cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 336 (7), 487-491.
66. Welsh MJ, R.B., Accurso FJ, et al. (2001). Cystic fibrosis (c. 8th ed.). New York: McGraw-Hill.
67. McCallum, S.J., Corkill, J., Gallagher, M., Ledson, M.J., Hart, C.A.,Walshaw, M.J. (2001) Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P aeruginosa*. *Lancet*, 358 (9281), 558-560.
68. Bittar, F.,Rolain, J.M. (2010) Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (7), 809-820.
69. Atkinson, R.M., LiPuma, J.J., Rosenbluth, D.B.,Dunne, W.M. (2006) Chronic colonization with *Pandora* apista in cystic fibrosis patients determined by repetitive-element-sequence PCR. *J Clin Microbiol*, 44 (3), 833-836.
70. Saiman, L.,Siegel, J. (2003) Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control*, 31 (3), S6-S62.
71. Kalish, L.A., Waltz, D.A., Dovey, M., Potter-Bynoe, G., McAdam, A.J., LiPuma, J.J. Gerard J., Goldmann D. (2006) Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 173 (4), 421-425.
72. Jewes, L.A.,Spencer, R.C. (1990) The Incidence of Anaerobes in the Sputum of Patients with Cystic-Fibrosis. *J Med Microbiol*, 31 (4), 271-274.
73. Bakare, N., Rickerts, V., Bargon, J.,Just-Nubling, G. (2003) Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 46 (1-2), 19-23.
74. Cimon, B., Carrere, J., Vinatier, J.F., Chazalatte, J.P., Chabasse, D.,Bouchara, J.P. (2000) Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19 (1), 53-56.
75. Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F. Bouchara J.P. (2009) Occurrence and relevance of filamentous fungi in

- respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Medical Mycology*, 47 (4), 387-397.
76. Armstrong, D., Grimwood, K., Carlin, J.B., Carzino, R., Hull, J., Olinsky, A. Phelan P.D. (1998) Severe viral respiratory infections in infants with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 26 (6), 371-379.
 77. Davis, P.B., Drumm, M.,Konstan, M.W. (1996) Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 154 (5), 1229-1256.
 78. Flume, P.A., Yankaskas, J.R., Ebeling, M., Hulsey, T.,Clark, L.L. (2005) Massive hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest*, 128 (2), 729-738.
 79. Jensen, P., Johansen, H.K., Carmi, P., Hoiby, N.,Cohen, I.R. (2001) Autoantibodies to pancreatic hsp60 precede the development of glucose intolerance in patients with cystic fibrosis. *Journal of Autoimmunity*, 17 (2), 165-172.
 80. Petermann, S.R., Doetkott, C.,Rust, L. (2001) Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8 (3), 632-636.
 81. Rust, L., Messing, C.R.,Iglewski, B.H. (1994) Elastase Assays. *Bacterial Pathogenesis, Pt A*, 235, 554-562.
 82. Burke, V., Robinson, J.O., Richardson, C.J.L.,Bundell, C.S. (1991) Longitudinal-Studies of Virulence Factors of *Pseudomonas-Aeruginosa* in Cystic-Fibrosis. *Pathology*, 23 (2), 145-148.
 83. Chotirmall, S.H., Smith, S.G., Gunaratnam, C., Cosgrove, S., Dimitrov, B.D., O'Neill, S.J. S.J. Harvey B.J., Greene C.M., McElvaney N.G. (2012) Effect of Estrogen on *Pseudomonas Mucoidy* and Exacerbations in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 366 (21), 1978-1986.
 84. Tunçoğlu, E., Yenişehirli, G., Bulut, Y. (2009) Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnç. *Ankem derg*, 23 (2), 54-58.
 85. Kalem, F., Gündem, S.N., Feyzioğlu, B., Arslan, U., Tuncer, İ. (2008) Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*, 22 (3), 123-126.
 86. Kireççi, E., Sevinç, İ. (2008) Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 22 (4), 209-212.
 87. DüNDAR, D., Tamer, G. (2009) Çeşitli klinik örneklerden izole edilen edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. *ANKEM Derg*, 23 (1), 17-21.

88. Kirby, J.T., Mutnick, A.H., Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Pfaller, M.A., Grp, S.P. (2002) Geographic variations in garenoxacin (BMS284756) activity tested against pathogens associated with skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43 (4), 303-309.
89. Strateva, T., Ouzounova-Raykova, V., Markova, B., Todorova, A., Marteva-Proevska, Y., Mitov, I. (2007) Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Journal of Medical Microbiology*, 56 (7), 956-963.
90. Özkalay, N., Ağuş, N., Cengiz, A., Taneri, N. (2006) *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılığındaki değişim. *ANKEM Derg*, 20 (3), 159-163.
91. Wu, L.C., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E. Patel N., Musch M.W., Chang E.B., Fu Y.X., Jacobs M.A, Nishimura M.I., Hancock R.E., Turner J.R., Alverdy J.C. (2005) Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 309 (5735), 774-777.
92. Hingley, S.T., Hastie, A.T., Kueppers, F., Higgins, M.L. (1986) Disruption of Respiratory Cilia by Proteases Including Those of *Pseudomonas-Aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 54 (2), 379-385.
93. Çıragil, P., Söyletir, G. (2004) Çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aljinat elastaz ve alkali proteaz üretimleri. *Mikrobiyol Bült*, 38, 341-347.
94. Estrellas, P.S., Alionte, L.G., Hobden, J.A. (2000) A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Contact Lens-Induced Acute Red Eye (CLARE) is protease-deficient. *Current Eye Research*, 20 (3), 157-165.
95. Çelik, B. (2009). Doğadan ve klinik örneklerden izole edilen *pseudomonas* bakterilerinin değişik fenotipik özelliklerinin farklı yöntemlerle araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
96. Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H.M., Kong, F.S. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10 (12), 599-606.
97. Kanthakumar, K., Cundell, D.R., Johnson, M., Wills, P.J., Taylor, G.W., Cole, P.J. Wilson R. (1994) Effect of Salmeterol on Human Nasal Epithelial-Cell Ciliary Beating - Inhibition of the Ciliotoxin, Pyocyanin. *British Journal of Pharmacology*, 112 (2), 493-498.
98. Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N., Kobayashi, T., Imada, C., Okuma, H. Watanebe E. (2004) Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors & Bioelectronics*, 19 (10), 1237-1244.

99. Amitani, R., Wilson, R., Rutman, A., Read, R., Ward, C., Burnett, D. Stockley R.A., Cole P.J. (1991) Effects of Human Neutrophil Elastase and Pseudomonas-Aeruginosa Proteinases on Human Respiratory Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 4 (1), 26-32.
100. Schaber, J.A., Carty, N.L., McDonald, N.A., Graham, E.D., Cheluvappa, R., Griswold, J.A. Hamood A.N. (2004) Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (9), 841-853.
101. Önal, S. (2005). değişik klinik örneklerden izole edilen pseudomonas aeruginosa suşlarında virulans faktörleri ve bu faktörlerin sentezlenmesinde rol oynayan bakteriyel iletişim "Quorum sensing" sistemindeki sinyal moleküllerinin hastalık patogeneziindeki rolü.Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
102. Hedberg, M., Miller, J.K.,Tompkins, V.N. (1969) Elastase Activity of Pseudomonas Aeruginosa Isolates from Hospital Patients. *American Journal of Clinical Pathology*, 52 (5), 631-&.
103. Karatuna, O. (2008). Solunum sistemi enfeksiyonlarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi.Umanlık Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
104. Doring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Hoiby, N.,Hofmann, A. (1983) Proteases of Pseudomonas-Aeruginosa in Patients with Cystic-Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 147 (4), 744-750.
105. Yılmaz, Z. (2012). Klinik örneklerden izole edilen pseudomonas aeruginosa suşlarında çeşitli antibiyotiklerin "quorum sensing"e ve virulans faktörleri üretimine inhibitör etkisinin belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
106. Manno, G., Cruciani, M., Romano, L., Scapolan, S., Mentasti, M., Lorini, R. Minicucci L. (2005) Antimicrobial use and Pseudomonas aeruginosa susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 (3), 193-197.