



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HAYVANLAR VE ÇEVRELERİNDEN
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

İnci Ülkü ÇELİKEL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. K. SERDAR DİKER**

2011-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAYVANLAR VE ÇEVRELERİNDEN
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

İnci Ülkü ÇELİKEL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. K. SERDAR DİKER**

2011-ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	
1.1. Tarihçe ve Taksonomi	1
1.2. <i>S.maltophilia</i> 'nın Genel Özellikleri	4
1.3. <i>S.maltophilia</i> 'nın Antijenik Özellikleri	11
1.4. <i>S.maltophilia</i> 'nın Virulens Faktörleri	12
1.5. <i>S.maltophilia</i> 'nın Genetik Özellikleri	13
1.6. <i>S.maltophilia</i> 'nın Bulunduğu Habitat	15
1.7. Hayvanlarda <i>S.maltophilia</i>	18
1.8. İnsanlarda <i>S.maltophilia</i>	20
1.9. <i>S.maltophilia</i> 'nın Antimikrobiyal Maddelere Direnci	22
1.10. <i>S.maltophilia</i> 'nın İzolasyonu ve Laboratuvar Tanısı	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM	
2.1. Gereç	28
2.1.1. Standart Suş	28
2.1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> İzolasyonu İçin Toplanan Örnekler	28
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Boyalar	29
2.1.4. Diğer Besiyerleri ve Kimyasallar	31
2.1.5. PCR'da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	31
2.1.6. PCR'da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler	32
2.2. Yöntem	33
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	33
2.2.1.1. Fenotipik Testler	33
2.2.2. Virülens Özelliklerinin Belirlenmesi	35
2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	37
2.2.4. Moleküler Tanı	37
2.2.4.1 Kültürden PCR	38
2.2.4.1.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)	38
2.2.4.1.2. Amplifikasyon İşlemi	38
2.2.4.1.3. Elektroforez	39
2.2.4.1.4. Örneklerin Görüntülenmesi	39
2.2.4.2. Deteksiyon limitinin Saptanması	40
2.2.4.3. Klinik Örneklerden PCR	40
2.2.4.3.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)	40
2.2.4.3.2. Spesifite ve Sensitivite Belirlenmesi	42
3. BULGULAR	
3.1 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	43
3.2 Moleküler Tanı	52

4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
Özet	63
Summary	65
Kaynaklar	67
Özgeçmiş	87

ÖNSÖZ

Stenotrophomonas maltophilia doğal koşullara dayanıklı ve genellikle doğada yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Hava, su, toprak, bitki ve özellikle bitki köklerinde bu bakteriye rastlanır. Son yıllarda hastane kaynaklı infeksiyonlardan yüksek oranda izole edilmesi, bu bakterinin önemini ve üzerinde yapılan çalışmaları arttırmıştır. Günümüze kadar *S.maltophilia* ile ilgili insan hekimliğinde birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen veteriner hekimliğinde araştırmalar yetersiz kalmıştır. Bu çalışmada insanlarla en çok temasta bulunan hayvanlardan kedi, köpek, at, sığır, koyun ve çevrelerinde *S.maltophilia* varlığının saptanması amaçlandı. Ayrıca izole edilen suşların patojeniteleri ve virülens faktörleri de araştırıldı.

Bu orijinal konunun seçilmesinde ve tez çalışmam sırasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. K. Serdar DİKER başta olmak üzere, tez izleme komitemde bulunan Sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR ve Doç. Dr. Taner KARAOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Hakan YARDIMCI, Prof. Dr. Ömer Memduh ESENDAL, Prof. Dr. Mehmet AKAN, Dr. Kaan MÜŞTAK'a, moleküler çalışmalarında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma, örnek toplamamda yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Nihat İRENCİN ve Veteriner Hekim Sedat BEDİR'e, doktora süresince sabrını ve desteğini esirgemeyen canım annem, babam, eşim Veteriner Hekim Ahmet Özgür ÇELİKEL ve ablalarım Ufuk ve Ümit EVREN'e teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AP-PCR	PCR with arbitrary primers
bp	base pair (baz çifti)
CFU	Colony Forming Unit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
g	gram
GC	Guanin+Cytosine
HF	Host factor (konakçı faktörü)
kDa	kilodalton
KOAH	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
LPS	lipopolisakkarid
lt	Litre
MDBK	Madin-Darby bovine kidney
mg	miligram
MIC	Minimal inhibitor concentration
ml	Mililitre
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribo Nükleik asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
RT/PCR	Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction
VIA	Vankomisin, Imipenem ve Amfoterisin B
VIC	Vankomisin, Imipenem ve Siklohezimid
VIN	Vankomisin, Imipenem ve Nistatin
XMSM	<i>Xanthomonas maltophilia</i> Selective Medium
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
RAPD-PCR	Random Amplification of Polymorphic DNA

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Nutrient broth’da üreyen <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> hücreleri	5
Şekil 1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC13637 suşu Leifson flagella boyama	5
Şekil 3.1. <i>S.maltophilia</i> ’nın VIA agardaki görüntüsü	44
Şekil 3.2. <i>S.maltophilia</i> ’nın Nutrient agardaki görüntüsü	44
Şekil 3.3. <i>S.maltophilia</i> ’nın MacConkey agardaki görüntüsü	45
Şekil 3.4. DNase pozitif <i>S.maltophila</i> suşları	45
Şekil 3.5. Pozitif kazein hidrolizi testi sonucu	46
Şekil 3.6. <i>S.maltophilia</i> ’nın Tween 80 hidrolizi	47
Şekil 3.7. Fosfolipaz C sentezinin görüntülenmesi	47
Şekil 3.8. <i>S.maltophilia</i> ’nın Kanlı agardaki hemolizine örnek	47
Şekil 3.9. At izolatlarından yapılan PCR sonuçları	52
Şekil 3.10. <i>S.maltophilia</i> primerlerinin deteksiyon limiti	52

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. <i>S.maltophilia</i> 'nın biyokimyasal ve diğer özellikleri	10
Çizelge 1.2. <i>S.maltophilia</i> 'nın nozokomiyal kaynakları	21
Çizelge 1.3. <i>S.maltophilia</i> 'nın üremesinde gereksinimleri	26
Çizelge.2.1. Toplanan örneklerin kaynak ve sayıları	29
Çizelge.2.2. Kullanılan primerlerin ilgili gen bölgeleri ve baz dizilimleri	32
Çizelge 2.3. PCR yönteminde kullanılan mix miktarları	38
Çizelge 2.4. PCR yönteminde kullanılan amplifikasyon koşulları	39
Çizelge 2.5. Teşhisinde kullanılan PCR yönteminin spesifikite ve sensitivitesinin belirlenmesinde kullanılan örnek çizelge	42
Çizelge 3.1. Sığır, koyun ve at örneklerinden elde edilen <i>S.maltophilia</i> izolasyon oranları	43
Çizelge 3.2. İdentifiye edilen <i>S.maltophila</i> suşlarına ait virülens Özellikleri	46
Çizelge 3.3. <i>S.maltophilia</i> virülens özelliklerinden Fosfolipaz C ve sitotoksite oranlarının örneklenen bölge ve hayvan türlerine göre karşılaştırılması	48
Çizelge 3.4. <i>S. maltophilia</i> suşlarının sitotoksik etki dereceleri	49
Çizelge 3.5. <i>S.maltophilia</i> izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık test sonuçları	50
Çizelge 3.6. Solunum sistemi infeksiyonu tanısı konan 5 sığırdan izole edilen <i>S.maltophilia</i> virülens özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları	51
Çizelge 3.7. Konvansiyonel yöntem ve PCR bulgularının karşılaştırmalı sonuçları	53
Çizelge 3.8. Konvansiyonel yöntem ve PCR bulgularının örneklenen bölge ve hayvan türüne göre karşılaştırması	53
Çizelge 3.9. PCR yönteminin spesifikite ve sensitivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan altın standart test sonuçları	54

I. GİRİŞ

1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Bergey's Manual'in sistematik bakteriyolojik sınıflandırmasına göre *Stenotrophomonas maltophilia*, Bacteria aleminin, Protobacteria bölümü, Gammaprotobacteria sınıfı, Xanthomonadales takımı, Xanthomonadaceae ailesi, *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde yer alır. Şimdiye kadar bu familya içinde belirlenen genuslar sırasıyla *Xanthomonas*, *Frateriia*, *Luteimonas*, *Lysobacter*, *Nevskia*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Schineria*, *Stenotrophomonas*, *Thermomonas* ve *Xylella*'dır (Saddler ve Bradbury, 2005).

Ulrich ve Needham tarafından 1953 yılında, *Alcaligenes faecalis* olarak tanımlanan suşlar, Hugh ve Ryschenkow (1961) tarafından *P.maltophilia* olarak yeniden tanımlanmıştır. İlk olarak 1958 yılında Hugh tarafından oral karsinomali bir hastadan alınan orofarengeal svap örneğinden izole edilmiş ve *Pseudomonas maltophilia* olarak isimlendirilmiştir (Hugh ve Leifson, 1963). Bunun ardından standart suş, ATCC 13637, Hugh 810-2, NCIB 9203, NCTC 10257, NRC 729 gibi çeşitli kodlar ile kabul edilmiştir. Yine Hugh ve Ryschenkow, 1943 yılında J. L. Edwards'ın pleural sıvıdan izole ettiği "*Bacterium bookeri*" isimli bakteriyi daha sonra *P.maltophilia* olarak yeniden adlandırmışlardır (Hugh ve Leifson, 1963). Japonya'daki pirinç tarlalarından izole edilen *Pseudomonas melanogena*, Komagata (1961) tarafından, önce *Pseudomonas alcaligenes* olarak tanımlanırken, daha sonra *Pseudomonas maltophilia* olarak kabul edilmiştir (Komagata ve ark., 1974). İlerleyen yıllarda DNA-rRNA hibridizasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle *Pseudomonas* genusu içinde 5 adet rRNA homolog grubun varlığı ortaya çıkmış ve *P.maltophilia* ATCC 13637 suşuna ait rRNA sistronlarının, *Xanthomonas*'ın üç suşu ile büyük benzerliği bulunduğu görülmüştür (Palleroni ve ark., 1973).

Bu bilgileri kullanarak, Swings ve ark. (1983), yaptıkları çalışmalar sonucu *P.maltophilia*'nın *Xanthomonas* genusunda, *X.maltophilia* olarak yeniden sınıflandırılmasını önermişlerdir. Bu tezlerini desteklemek için; G+C içeriği *P.maltophilia*'da %63–67.5, *Xanthomonas*'da %63–70 olması; enzimleri karşılaştırıldığında NADP-bağlı dehidrogenazların bulunmaması; her ikisinde de benzer tip ubikinonların bulunması (hem *P.maltophilia* hem de *Xanthomonas spp.* sekiz izopren birimi bulunan ubikinonlara sahipken diğer tüm *Pseudomonas* suşlarındaki ubikinonlarda dokuz birim vardır) ve hücresel yağ asit kompozisyonlarının benzerlik göstermesi gibi unsurları öne sürmüşlerdir. Ayrıca bunları takip eden “tam hücre protein modelleri” üzerine yapılan analizler de (Van Zyl ve Steyn, 1990), bu öneriyi desteklemiştir. Dış membran esterez’in izoelektrik odaklanma çalışmalarından (Debette ve Prensier, 1989) elde edilen ek bulgular da, *P.belle* ve *P.hibiscicola*'nın, *X.maltophilia* sinonimleri olduğunu teyit etmiştir (Singer ve ark., 1994; Van den Mooter ve Swings, 1990). Tüm bunlara rağmen, *P.maltophilia*'nın *X.maltophilia* olarak yeniden sınıflandırma teklifi evrensel bir kabul görmemiş (Palleroni, 1984) ve bu bakterinin *Xanthomonas* genusundaki taksonomik yeri çözümlenemediği yıllarca tartışma konusu olmuştur (Bradbury, 1984).

Bunun tartışma konusu olmasının nedenlerinden birisi Swings ve ark. (1983), tarafından ortaya konan bulguların, daha sonra yaptıkları çalışmaların bulgularıyla çelişkili olmasıdır. *Pseudomonas* genusuyla ilgili yapılan geniş kapsamlı DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları sırasında, eşdeğer deneysel koşulların sağlanmasına ve aynı *X.campestris* suşunun referans rRNA olarak kullanılmasına rağmen, Swings ve ark.'nın (1983), önerilerinde kullandıkları 27 *Xanthomonas* suşunun DNA'sında farklı erime sıcaklıkları kaydedilmiştir (De Vos ve De Ley, 1983). Swings ve ark. (1983), *Xanthomonas* genusu'nun erime sıcaklığının 78.8–81.5°C aralığında olduğunu ve bunun *X.maltophilia*'nın erime sıcaklığı olan 76.5–78°C aralığına yaklaşık olduğunu savunmuşlardır. Ancak daha sonra De Vos ve De Ley (1983), *Xanthomonas* genusu'nun erime sıcaklığının 80.0–81.5°C aralığında olduğunu ve bunun *X.maltophilia*'nın erime sıcaklığına, savunulduğu gibi yakın olmadığını bildirilmiştir. Buna ek olarak, poliamin (Yang ve ark., 1993a) ve yağ asidi (Yang ve

ark., 1993b) analizleriyle, *X.maltophilia*'nın *Xanthomonas* genusundaki diğer türlerden çok farklı bir profile sahip olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca Oyiazu ve Komagata (1983), sekiz isoprenli ubikinonların rRNA Grup III'de yer alan *P.avenae* ve *P.palleroni* gibi diğer bazı pseudomonadlarda da mevcut olduğunu, dolayısıyla bunların varlığının *X.maltophilia* ve *Xanthomonas* genusunun diğer üyelerine has bir durum olmadığını belirtmişlerdir. Bu bulgular ve yanında destekleyici başka kanıtlarla birlikte *X.maltophilia*'nın taksonomik yerinin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Van Zyl ve Steyn, 1992). Taksonomik değişiklik talebi, *Xanthomonas*'a spesifik 16S rDNA dizisinin kullanıldığı PCR (Polymerase Chain Reaction) çalışmalarıyla da desteklenmiştir (Maes, 1993). Maes (1993), çalışmalarındaki verilere göre, Xanthomonad'ların bir PCR fragmenti 480 bp iken *X.maltophilia* suşlarında ek PCR fragmentlerinin bulunmasıyla bu bakterinin *Xanthomonas* genusunda yer alamayacağı sonucuna varmıştır.

Bu bakterinin sınıflandırmadaki yerinin uzun yıllar süren tartışması sonunda, 1993 yılında Palleroni ve Bradbury tarafından *Stenotrophomonas* adlı yeni bir genus oluşturulması ve *S.maltophilia*'nın bu genusun tek üyesi olması önerilmiştir (Ste.no.tro.pho.mo'nas. stenus, dar; trophus, beslenen; monas, tek hücreli canlı; *Stenotrophomonas*, kısıtlı madde ile beslenen tek hücreli canlı). Nesme ve ark. (1995), PCR'la amplifiye edilmiş 16S rRNA genlerinin restriksiyon haritalamasını kullanarak *S.maltophilia* ve *Xanthomonas* genusundaki diğer türler arasındaki farklılıkları doğrulamıştır.

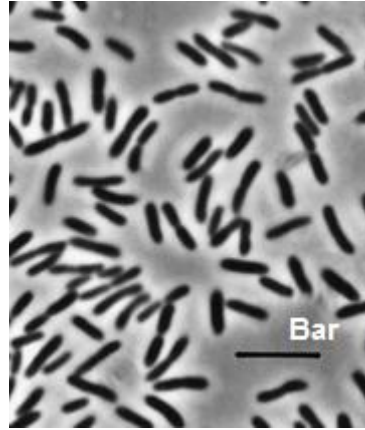
Günümüzde *Stenotrophomonas* genusunda *S.maltophilia* ile birlikte onaylanmış veya onay bekleyen 8 tür bilinmektedir. Bunlar; *Stenotrophomonas africana* (Drancourt ve ark., 1997), *Stenotrophomonas nitritireducens* (Finkmann ve ark., 2000), *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp.nov. (Assih ve ark., 2002), *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov. (Wolf ve ark., 2002), *Stenotrophomonas koreensis* sp.nov. (Yang ve ark., 2006), *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. (Ramos ve ark., 2010), *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov. (Lee ve ark., 2010), *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov. (Kim ve ark., 2010).

1.2. *S.maltophilia*'nın Genel Özellikleri

Stenotrophomonas maltophilia, nonfermentatif Gram negatif bakteriler arasında yer almaktadır. Mikroskopta tekli veya ikili olarak görülen, 0.5–1.5 µm uzunluğunda ince düz ya da kıvrık çomak şekillidir (Şekil 1). Spor ve kapsül oluşturmaz. *S.maltophilia* hareketli olup iki veya daha fazla polar flagellaya sahiptir (Şekil 2). Bir flagellin molekülünün ağırlığı 33 kDa'dır. Birçok *Pseudomonas* türünde bulunan polar, fimbria benzeri yapılar bu bakteride de gözlenmiştir (Fuerst ve Hayward, 1969). Bu organel konak hücreye ve katı yüzeylere tutunmada önemlidir. Ayrıca fimbrialar etkenin katı yüzeylerde seğirme hareketi yapmasında da etkili olabilmektedir (Henrichsen, 1975).

Diğer tüm Gram negatif bakterilerde olduğu gibi *S.maltophilia*'nın hücre duvarı da sitoplasmik membran, peptidoglikan tabakası ve dış membran olmak üzere üç katmandan oluşur. İç ve dış membranlar protein ve fosfolipidlerden oluşmuştur, dış membranda ayrıca lipopolisakkaridler bulunur. Bunlar, lipid A'nın kovalent bağlı olduğu heteropolisakkarid bölümlerinden meydana gelmiştir (Palleroni, 2005). Lipid A'nın bu aileye bağlı çeşitli cinslerdeki suşların belkemiği olduğu, 6-glukozamin bağlı disakkaridleri taşıyan iki fosfat grubu, bir ester bağıyla birlikte bir glikosidik bağlarla birleştirilmiş B-1' kapsamıyla gösterilmiştir (Hase ve Rietschel, 1976). Hidroksi yağ asitleri LPS temeline ester ve amid bağlarıyla eklenmiştir. Moss ve ark. (1972), *S.maltophilia*'da hücresel yağ asidi kompozisyonlarını araştırmış ve nispeten yüksek miktarlarda (toplamın %26'sında) dallanmış 15 karbonlu yağ asidi zinciri (13-methyltetradecanoic asit) tespit etmişlerdir. Wilkinson ve ark. (1983) daha sonraki yıllarda yaptıkları çalışmada, *S.maltophilia*'nın hücre duvarındaki başlıca yağ asitlerinin 9-metildekanoik asit, 2-hidroksi-9-metildekanoik asit, 3-hidroksi-9-metildekanoik asit (her biri ester bağlarıyla bağlı), 3-hidroksidodekanoik asit ve 3-hidroksi-11-metildekanoik asit (ikisi çoğunlukla amid bağlı) olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında fosforlanmış çekirdek oligosakkaritlerinden monosakkarit bileşenlerinin çekirdek oligosakkaritin, D-glukoz, D-mannoz, D-galaktozamin (*N*-asetilatl değil), D-galakturnik asit, 2-amino-2-deoksiglikoz ve 3-deoksioktulosonik asit (aldoheptoz hariç) kalıntıları içerdiğini ve lipid A'nın, *N*-yağ

asili ve *O*-yağ asili bileşenleriyle fosforilat glukozamin kalıntılarından temel aldığını tespit etmişlerdir (Wilkinson ve ark., 1983). *S.maltophilia* EDTA ile muameleye dirençliyken, *P.aeruginosa* ve *Pseudomonas* cinsindeki diğer türler kısmen duyarlı bulunmuştur. Bunun nedeni bu türlerin dış membranlarındaki metal iyonları, proteinler, lipopolisakkaritler ve lipidler gibi bileşenlerin metal iyon bağlayıcı ile ayrılmasıdır (Wilkinson,1970; Wilkinson ve ark., 1973).



Şekil 1.1. Nutrient broth'da üreyen *Stenotrophomonas maltophilia* hücreleri. (ATCC 13637 suşu). Faz kontrast. Bar = 5 µm. (Palleroni, 2005)



Şekil 1.2. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC13637 suşu. Leifson flagella boyama. Bar = 5 µm. (Palleroni, 2005)

S.maltophilia zorunlu aerobdur. Optimal üreme sıcaklığı 35°C olup 4°C'nin altında ve 41°C'nin üzerinde üreme olmaz. Katı besiyerinde meydana gelen ilk koloniler pürüzsüz, parlak ve S tiplidir. Genellikle oluşturduğu kolonilerin rengi beyaz ile soluk sarı arasındadır. Sarı koloni rengi, karoten gibi pigmentlerden veya xanthomonadinlerden ziyade flavinlerden kaynaklanabilir. *S.maltophilia* açık sarı hücrel bir pigment üretir. Koloni rengine bu pigment de neden olabilir. Bu pigment suda çözünabilir ancak karotenoid pigmentler için kullanılan organik çözücülerle

elde edilemez (Stainer ve ark., 1966; Palleroni ve Bradbury, 1993). Bu pigmentin özellikleri tam olarak belirlenemese de xantomonadin (*Xanthomonas*'a özgü bir pigment) veya benzer bir bileşen olmadığı düşünülmektedir (Starr ve ark.,1977).

S.maltophilia'nın bazı suşları kanlı agarda kahverengi görünümlü renk değişikliği oluşturur ki bu "*Pseudomonas melanogena*" ismi verilmesinin sebebidir (Lizuka ve Komagata, 1963; Komagata ve ark., 1974). Bu renk değişikliğinin nedeninin suda çözünen melaninden kaynaklanmadığı, ekstraselüler ürünler arasındaki sekonder kimyasal reaksiyonlara bağlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca suşlar 42°C'de inkübe edildiğinde veya yüksek tirozin içerikli besiyerine ekildiğinde daha da yoğun hale geldiği gözlenmiştir. Koloni rengi besiyeri içine dağılmaz. Çoğu suş kanlı agarda açıktan koyu griye değişen renklerde koloniler oluşturur. Nord ve ark. (1975), test ettikleri 31 suşun 11'inde beta-hemoliz tespit etmişlerse de, bakteri genel olarak beta-hemolitik sayılmaz, ancak kanlı agarda birbirine yakın üremelerin çevresinde yeşilimsi renk değişimi gözlenebilir (Denton ve Kerr, 1998). Kanlı agarda üreme sonrası güçlü bir amonyak kokusu oluşur (Hugh ve Gilardi, 1980). Sıvı besiyerinde homojen bulanıklık yapar. Margesin ve Schinner (1991), bakterinin yüksek rakımdan izole edilen bir suşunun 10°C'de üreyebildiğini belirtmişlerdir. Birçok *Stenotrophomonas* suşu kimyasal olarak tanımlanmış besiyerinde üreyebilmek için metiyonin ve sistine gereksinim duyar (Iizuka ve Komagata, 1964b). Ancak Ikemoto ve ark. (1980), metiyonine ihtiyaç duymayan *S.maltophilia* suşları olduğunu ve bunların farklı bir *Stenotrophomonas* türünü temsil edebileceğini bildirmişlerdir. Bu hipotezden yola çıkarak bu türe ait iki biovar tanımlamışlar ve ilerleyen çalışmalarda muhtemelen bunlardan birinin (biotip II.) *Stenotrophomonas* generisi içinde bağımsız bir tür statüsünü hak edeceğini savunmuşlardır.

Stenotrophomonas maltophilia kemoorganotropik bir bakteridir. Fruktöz metabolizması fosfotransferaz sisteme fosfoenol piruvat katılımı ile ilgilidir (Sawyer ve ark.,1977). Tipik olarak *S.maltophilia* disakkaridleri (maltoz, selobiyoz ve laktoz) tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır (Hugh ve Ryschenkow, 1961; Stainer ve ark., 1966). Diğer pseudomandlar bu substratları nadiren kullanırlar. *S.maltophilia*'nın üremek için laktozu kullanabilme özelliği, diğer aerobik

pseudomonadlarda oldukça nadir karşılaşılan bir özelliktir. Ancak bu disakkaridte üremenin çok zayıf olması, hücrelerin galaktozu karbon kaynağı olarak kullanamamalarından kaynaklanabilir (Palleroni, 2005). *Stenotrophomonas* türleri nitrata indiriyor olsalar da, *S.maltophilia* bunu üremede azot kaynağı olarak kullanmaz. Bu özellikle, genusdaki diğer aerobik *Stenotrophomonas* gruplarından ayrılır (Stainer ve ark., 1966). Bir çeşit biyoplastik olan poly-b-hydroxybutyrate granüllerini stok materyali olarak biriktirmezler (Denton ve Kerr, 1998).

S.maltophilia beslenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, beslenme özellikleri açısından *Pseudomonas* genus'unun diğer aerobik pseudomonad türleri kadar çok yönlü olmadığı saptanmıştır (Stainer ve ark., 1966). Zaten bu sınırlı beslenme kapasitesi, yeni cins isim (*Stenotrophomonas*) önerisinin temelini oluşturmuştur (Palleroni ve Bradbury, 1993). *S.maltophilia* suşları sitokrom c eksikliği ile bağlantılı olarak negatif oksidaz reaksiyonu verirler (Stainer ve ark., 1966). Jelatinaz ve katalaz pozitifdir. Güçlü lipolitik aktivitesi Tween 80'i hidrolize etmesiyle belirlenmiştir (Palleroni, 2005). Bu güçlü lipolitik aktivitenin bir kısmı dış membranındaki esteraz varlığından kaynaklanır. Esteraz, esterlerin üreme amaçlı substrat olarak kullanımında rol oynayabilir (Debette ve Prensier, 1989). Birçok suşun membrana bağlı non-spesifik esterazları poliakrilamid jel elektroforez ve isoelektrik odaklanma ile analiz edilmiş, ve bu gözlemler ile suşların seçilmiş fenotipik özellikleri arasındaki ilişki, Van Den Mooter ve Swings (1990) tarafından da belirtildiği gibi *Pseudomonas beteli* ve *P.hibiscicola* gibi adlandırılan türlerin *S.maltophilia*'nın sinonimleri olarak düşünülmesi fikrini desteklemiştir (Singer ve ark., 1994).

Tirozin'in biyosentezinde hem *Pseudomonas*, hem de *Stenotrophomonas* suşlarının NAD'a bağlı prefenat aktiviteleri vardır; bu aktivite *Stenotrophomonas*'da geri-bildirim (feedback) inhibisyonuna karşı hassas iken *Pseudomonas*'da değildir. *Pseudomonas* da ayrıca NAD'a bağlı arogenat dehidrogenaz (*Stenotrophomonas* da olmayan bir enzim) vardır (Byng ve ark., 1980). Fenilalanin sentezindeki, prefenat ve arogenat dehidrataz aktivitelerini düzenleyici yapılarla ilgili çalışmalar, *Pseudomonas*'ın floresan türleriyle *Stenotrophomonas*'ın aynı grupta yer almasını tavsiye etmektedir (Whitaker ve ark., 1981b). *S.maltophilia*, metabolik açıdan

kısmen inaktiftir (Stanier ve ark., 1966), ancak aminoglikozidlerden streptomisin (Fenton ve ark., 1973), RDX (Binks ve ark., 1995), kokain (Britt ve ark., 1992), akrilik (Kawai, 1993), naftoik asit (Phale ve ark., 1995) gibi çeşitli alışılmadık maddeleri metabolize edebilmektedir. Bakteri suşlarının biyo-parçalayıcı (biodegradative) ajan olarak potansiyel kullanım alanları konusunda araştırmalar sürmektedir. *S.maltophilia*'nın biyokimyasal aktivitesi ile ilgili literatürlerde birçok enzimin izolasyonu ve özellikleri ile ilgili çeşitli bildiriler bulunmaktadır. Proteaz (Debette, 1991; Margesin ve Schinner, 1991; Singer ve Debette, 1993), peptidaz (Stevens ve ark. 1990; Suga ve ark., 1995; Kabashima ve ark., 1996) kokain esteraz (Britt ve ark., 1992a), primer ve aromatik alkollerde çok düşük aktivitesi olan ikincil alkol dehidrogenaz (Britt ve ark., 1992b), deoksiribonükleaz (Sally ve Winder, 1991) ve önemli bakteriyel toksinlerde bulunan bir aksiyon mekanizması olan ADP ribosilasyonu ile ilgili enzimler (Edmonds ve ark., 1989) bunlar arasında sayılabilir. *S.maltophilia*'nın peptidil peptidaz aktivitesi, test edilen 24 farklı bakteriyel suşun arasında en aktif olanıdır (Stevens ve ark., 1990). Bazı suşlar da nitrat redüktaz enzimi tanımlanmıştır (Woodward ve ark., 1990; Ketchum ve Payne, 1992). *S.maltophilia*'nın 23 suşu ile ilgili bir çalışmada membrana bağlı metil viologen nitrat redüktaz ve çözünebilir molibdopterin tarif edilmiştir (Woodward ve ark., 1990). Bu çalışmalar doğrultusunda nitratın, organizmalar semiaerobik şartlarda ürerken, elektron çanağı görevi gördüğü söylenebilir. Bir *S.maltophilia* suşu tarafından toluen ve ksilen kullanımı ile ilgili bir çalışmada görülmüştür ki, ortamda nitrat olduğunda bu aromatik sübstratlar düşük oksijen ve anoksik şartlarda suş tarafından kullanılmaktadır (Su ve Kafkewitz, 1994).

S.maltophilia suşlarında beslenme bazlı ayırıştırma için bir mikro yöntem tanımlanmıştır (Freney ve ark., 1983). Stainer ve ark. (1966), tarafından daha önce yapılan bir çalışmada 23 *S.maltophilia* suşu yoğun biçimde beslenme bazlı ayırıştırmaya tabi tutulmuştur. Basit alkoller, polialkoller veya glikoller, aromatik bileşikler, aminler, çeşitli nitrojen bileşikler veya parafin hidrokarbonları, suşların büyük bir bölümü tarafından hiç kullanılmamıştır. Test edilen 145 substrattan sadece 23'ü suşların tümünün veya çoğunluğunun üremesini desteklemiştir. Ancak daha sonra farklı doğal ortamlardan izole edilenler, sulfonik-aromatik bileşikler, herbisit

Dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) (Yang ve ark., 1994; Wang ve ark., 1997), toluen ve ksilen'leri (Su ve Kafkewitz, 1994), benzoat (Liu ve ark. 1996) veya kitin'i (Andreeva ve ark., 1996; Wiwat ve ark., 1996) ayrıştırabilen *S.maltophilia* suşlarının tanımlanmasını sağlamışlardır (Lee ve Clark, 1993).

S.maltophilia, kerosen ve ham petrol ile zenginleştirilmiş, Japonya'nın petrol bölgesinden alınan topraktan izole edilmiştir. İzolatlar başlangıçta hidrokarbonları kullanmakla birlikte, laboratuvar ortamındaki subkültürden sonra bu özelliklerini hızla kaybetmişlerdir (Iizuka ve Komagata, 1964b). Bu özelliklerin bazıları *Stenotrophomonas* türlerini, biyoteknoloji alanında ve çevre kirliliğinin biyolojik iyileştirmesine yönelik uygulamalarda ilgi çekici kılmaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki oportunist insan patojeni olarak bilinen organizmalar, geniş çaplı biyoteknolojik projelerde çok sıkı kontrol altında tutularak kullanılmalıdır (Palleroni, 2005).

S.maltophilia, *Xanthomonas* türleri ile sahip olduğu ortak yağ asitleri dışında, yapısında C17:0 siklopropan yağ asidi ve ubikinon Q8'e sahip olmasıyla karakterizedir. En önemli poliaminleri spermidin ve cadaverindir. *S. maltophilia*'ya ait yağ asidi profilinin özgünlüğü, bakterinin identifikasyonunda önemlidir (Palleroni, 2005). Weckesser ve ark. (1974) *S.maltophilia*'ya ait LPS de ki 3-O-methyl-L-xylose olarak adlandırılan pentoz yan ürününün, tamamen alakasız *Rhodopseudomonas viridis* türünde de bulunduğunu tespit etmişlerdir.

S.maltophilia'nın bazı biyokimyasal özellikleri ve mikrobiyolojik reaksiyonları Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. *S.maltophilia*'nın biyokimyasal ve diğer özellikleri (Denton ve Kerr, 1998)*

Test	Reaksiyon
Indofenol oksidaz	-
Katalaz	+
Üreme 5°C 18°C 37°C	- + +
Hareketlilik 18°C 37°C	+ V
İndol Lizin dekarboksilaz Ornitin dekarboksilaz Metil kırmızısı Voges-Proskauer Hidrojen sülfid Nitrati nitrite indirgeme Sitrata Fenilalanin deaminaz β-Galaktosidaz	- + - - - - v v - v
Hidroliz Eskulin Jelatin Tween 80 DNA Nişasta Üre	+ + + + - -
Üreme için karbon kaynakları Adonitol Arabinoz B-hidroksibütirat Selobiyoz Dulcitol Glukoz Fruktoz Galaktoz Mannitol Mannoz Ramnoz Salisin Sorbitol Trehaloz	- - - v - + v v - v - - - -

* (+), suşların %85'inden fazlası için pozitif; (v), suşların %16-85'i arası için pozitif; (-), suşların %15'inden azı için pozitif anlamına gelmektedir.

S.maltophilia oksidaz negatif, lizin ve DNase pozitif olma özelliği ile diğer pseudomonadlardan ayrılır. Bununla birlikte polimiksin B ve colistine olan duyarlılığı ile de bu ikisine dirençli olup lizin pozitif, DNase negatif olan *B.cepacia*'dan ayrılır.

1.3. *S.maltophilia*'nın Antijenik Özellikleri

S.maltophilia'ya ait somatik O ve flagellar H antijenleri tanımlanmıştır (Hugh ve Ryschenkow, 1961). Toplam 31 O antijeni saptanmış ve yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *S. maltophilia* tiplendirilmesinde kullanılmıştır (Schable ve ark., 1992). Bu antijenlerden, O3 dahil, en sık rastlanan serotipi temsil eden yedisinin yapısı saptanmıştır (Neal ve Wilkinson, 1982; Wilkinson ve ark., 1983; Winn ve ark., 1996). Bu antijenlerin tekrarlanan birimleri kollara ayrılmış olup üç ila beş sakkarit içerir. Bu sakkaridler içinde 6-deoxy-L-talose, 3-acetamido-3,6-dideoxy-D-galactose, ve 4-acetamido-4,6-dideoxy-D-mannose gibi nispeten daha nadir karşılaşılan kısımlar da bulunmaktadır. Neal ve Wilkinson (1982), yüksek ramnoz, düşük 2-keto-3-deoksioktanat varlığı ve heptozların bulunmadığını bildirmişlerdir. O-spesifik polisakkariti, 3-O-metil-L-ksiloz (bazen sadece ksiloz) ve ana zincirde üç ramnopiranosil kalıntısı içeren tetrasakkarit kollarına sahiptir (Neal ve Wilkinson, 1982). *S.maltophilia* O antijenleri ile *Brucella* spp. arasında çapraz reaksiyonlar bildirilmiştir (Corbel ve ark., 1984). *Renibacterium salmoninarum* ile çapraz reaksiyona da rastlanmış olup (Brown ve ark., 1995), Orrison ve ark. (1983), *Legionella pneumophila* ile *S.maltophilia* arasında karşılıklı olmayan bir çapraz aktivite gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bakterinin virülens faktörlerine göre, fare, tavşan ve insan spermatozoalarını aglütine edebilme özelliğine sahiptir (Bell, 1968). *S.maltophilia*'dan 30 kDa'luk immunoglobulin bağlanan protein izole edilmiş ve kısmen tanımlanmıştır (Grover ve Odell, 1992). Bu protein IgG'nin çeşitli alt sınıflarına ve IgA'ya, Fc bölgesinden bağlanır. *S.maltophilia* suşlarının serotiplendirilmesinde sabit ısıli çeşitli O antijenleri bildirilmiştir (Schable ve ark., 1989; Winn ve Wilkinson, 1996; 1997). Oliveira-Garcia ve ark. (2002), *S.maltophilia*'ya ait flagella iplikçiklerinin 38-kDa'lık altbirimlerden oluştuğunu ve

Serratia marcescens (78.6%), *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* (71.4%), ve *Pseudomonas aeruginosa* (57.2%) flagellini ile büyük oranda benzerlik gösterdiğini N-terminal amino asit sekans analizleriyle saptamışlardır.

1.4. *S.maltophilia*'nın Virulens Faktörleri

S.maltophilia'nın virulens özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, DNase, RNase, fibrinolisin, lipazlar, hyaluronidaz, proteaz ve elastaz gibi bazı ekstraselüler enzimlerin bu bakteri tarafından sentezlendiği belirtilmiştir (Boethling 1975, Nord ve ark. 1975, Arella ve Sylvestre 1979, O'Brien ve Davis 1982, Bottone ve ark. 1986). Daha sonra Bottone ve ark. (1994a) bu enzimlerin *S.maltophilia* ile ilişkili infeksiyon patojenezinde rol oynayabileceklerini savunmuşlardır. Ancak bakterinin kolonizasyonu ile infeksiyonunun ayırt edilememesi, *S.maltophilia*'nın sınırlı patojenitesi olduğu inancını desteklemektedir. Bakteriyle ilgili infeksiyon vakaları ile ölüm gibi istenmeyen klinik sonuçlar arasında bağlantı olmaması, bu görüşü güçlendirmiş olabilir. Örneğin, bakteri infeksiyonu veya kolonizasyonundan etkilenmiş 106 yoğun bakım hastasını inceleyen Villarino ve ark. (1992) hiç bir hastanın ölümünü doğrudan *S.maltophilia*'ya bağlayamamıştır. Gardner ve ark. (1970), *S.maltophilia*'nın genellikle diğer patojenlerle sinerji sonucu klinik infeksiyona yol açabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan deneysel infeksiyonla, *S. maltophilia*'nın farelere intravenöz uygulandığında dahi ciddi sepsise yol açmayacağı hipotezini desteklemiştir. *S.maltophilia* kültür ekstraktlarının bazı zehirlenmelerle ilişkisi olsa da, *E. coli* suşlarının benzer virülens faktörlerine göre çok daha düşük düzeydedir (Denton ve Kerr, 1998). Klinik örneklerden *S.maltophilia* izolasyonu, infeksiyonun bu bakteriden kaynaklandığını göstermese de, hastane ortamının kontaminasyonu sonucu immun sistemi yetersiz hastaların bu bakteriye maruz kalmalarıyla prognozun kötüleştiği bildirilmiştir. Son zamanlarda gösterilen bir virülens faktörü alkalik serin proteazdır (StmPr1 proteaz). Bu enzim insan serum ve proteinlerini degrade eder. En önemli özelliği pan proteaz inhibitörlerine (alfa 1-antitripsin ve alfa 2-makroglobulin gibi) dirençli olmasıdır. Bir diğer patojenite faktörü sentetik materyale yapışabilme yeteneğidir. Bu yeteneği ile biyofilm oluşturur. Böylece konak immün defansı ve farklı antimikrobiyal ajanlara karşı doğal

olarak korunur. İnfeksiyon oluşumundaki predispoze faktörler (Dignani ve ark. 2003):

- Şiddetli hastalıklar, ciddi operasyonlar
- Ağır immun supresyon (inatçı nütropeni vakaları gibi)
- Akciğerin hasara uğradığı durumlar (akciğerlerde yara ezilme, kistik fibrozis, kronik obstruktif akciğer hastalığı-KOAH gibi)
- Hastanede yatış süresinin uzun olması, ağır antibiyotik tedavisi (özellikle karbapenem, geniş spektrumlu sefalosporinler)
- Kontamine çevresel maruziyet

1.5. *S.maltophilia*'nın Genetik Özellikleri

Stenotrophomonas maltophilia oldukça yüksek miktarda genetik çeşitliliğe sahiptir. Tek bir hastaneden izole edilen suşların dahi genetik çeşitliliği olduğu belirtilmiştir (Berg ve ark., 1999; Valdezate ve ark., 2004; Gülmez ve Hasçelik, 2005). Gen bankasında *Stenotrophomonas*'a ait çok sayıda gen analizi bulunmaktadır. 3 *Stenotrophomonas* suşunun tüm genom sekans analizi yapılmıştır:

Stenotrophomonas maltophilia R551-3 kromozomunun (Genbank no: CP001111) sirküler yapıdaki tüm genomu 4.573.969 nükleotidden oluşmuş ve GC oranı %66'dır. Genomun %89'u protein kodlayan 4134 gen içermektedir. Bu dizi 4039 adet proteini kodlamaktadır. Tüm genomda 5 adet pseudogen bulunmaktadır.

Stenotrophomonas maltophilia K279a kromozomunun (Genbank no: AM743169) sirküler yapıdaki tüm genomu 4.851.126 nükleotidden oluşmuş ve GC oranı %66'dır. Genomun %88'i protein kodlayan 4514 gen içermektedir. Bu dizi 4386 adet proteini kodlamaktadır. Tüm genomda 42 adet pseudogen bulunmaktadır.

Stenotrophomonas sp. SKA14 kromozomunun (Genbank no: ACDV000000000) tüm genomu 4.990.006 nükleotidden oluşmuş ve GC oranı %66'dır. Genomun %86'sı protein kodlayan 4586 gen içermektedir. Bu dizi 4469 adet proteini kodlamaktadır. Bu genomda pseudogen bulunmamaktadır.

S.maltophilia'ya ait L1 β -lactamase'ı kodlayan gen (*blaS*), Dufrensne ve ark. (1988), tarafından *E.coli*'de klonlanmış ve eksprese edilmiş, Walsh ve ark. (1994) tarafından sekanslanmıştır. Daha sonra aynı grup L2 β -lactamase dizisini yayınlamışlardır (Walsh ve ark. 1996). Alkan hidroxilase'ı kodlayan *alkA* ve rubredoxin redüktaz'ı kodlayan *alkB* genlerinin dizileri de saptanmıştır (Lee ve ark., 1996).

Pease ve ark., (1989) bakteriyi karbenisilin ve polivinil piroolidon içeren bir besiyerine pasajlamış ve çeşitli gelişim aşamalarında hücre duvarı noksanlığının oluştuğunu elektron mikroskopta görüntülemişlerdir. Daha sonra bakterinin normal formuna geri dönüşünün başlamasını plazmidlere bağlamışlardır. *S.maltophilia* ile yapılan başka bir çalışmada tespit edilen 18 suşundan beşinde plazmid bulunduğu gözlenmiş (Shen ve ark., 1992), ancak daha ileri düzeyde analiz yapılamamıştır. Avison ve ark., (2002), çalıştıkları 10 *S.maltophilia* izolatının hepsinde L1 ve L2 β -laktamaz genleri içeren plazmid varlığını bildirmişlerdir.

Stenotrophomonas maltophilia plazmid pSM76, NC_010464 konumunda, sirküler yapıdadır, 2.927 bp büyüklüğündedir, 4 protein içermektedir ve proje numarası 29133'dür.

Stenotrophomonas maltophilia plazmid pSH1, NC_010429 konumunda, sirküler yapıdadır, 6.867 bp büyüklüğündedir, 7 protein içermektedir ve proje numarası 29131'dir.

Faj nükleik asitinin replikasyonu için gerekli bazı faktörler Gram negatif bakterilerin bazı gruplarında evrim sürecinde korunmuş olabilir. Cinsiyet-spesifik tek iplikli RNA kolifaj QB'nin in vitro replikasyonu için gerekli elementlerden biri de hekzamer olarak *E.coli*'de bulunur. QB RNA, ısıya dirençli RNA bağlanma proteini olan host faktör (HF-konakçı faktörü)'dür. Aralarında *S.maltophilia*'nın da bulunduğu bir takım aerobik *Pseudomonas* türlerinin ekstraktlarında, HF antiserumu ile çapraz reaksiyon gösterebilen bir bileşik tespit edilmiştir. rRNA benzerliği olan grup I ve grup V'in (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*) hücre ekstraktları tedavi sonrası HF aktivitesine sahiptir (Du Bow ve Ryan, 1977). Garcia ve ark. (2008) atık su kaynaklarından *S.maltophilia*'yı infekte eden 22 faj izole etmişlerdir.

Gen bankasında *Stenotrophomonas* 'ı infekte eden 2 tane faj vardır.

Stenotrophomonas Faj S1 (Genbank no: EU849489) genomu 40.287 nükleotidden oluşmuştur ve GC oranı %63'dır. Genomun %95'i protein kodlayan 48 gen içermektedir. Bu dizi 48 adet proteini kodlamaktadır.

Stenotrophomonas Faj phiSMA9 (Genbank no: AM040673) genomu 6.907 nükleotidden oluşmuştur ve GC oranı %62'dır. Genomun %70'i protein kodlayan 7 gen içermektedir. Bu dizi 7 adet proteini kodlamaktadır.

1.6. *S.maltophilia*'nın Bulunduğu Habitat

S.maltophilia kemoorganotropik (organik maddeleri aerobik veya anaerobik şekilde ayrıştırarak gerekli enerjiyi sağlayan) bir bakteridir. Doğada su, toprak ve özellikle bitki köklerinde yaygın olarak bulunur. *S.maltophilia* bir çok farklı çevrede ve Antarktika (Vazquez ve ark., 1995) dahil farklı coğrafi bölgelerde bulunabilir; hastane içinde ve dışındaki ekolojik boşluklara yerleşebilir. Nehir, kuyu, hiperotrofik göl, şişe suyu, kanalizasyon gibi farklı su kaynaklarından izole edilmiş olup (Hugh ve Leifson 1963; Hugh ve Gilardi 1980; Guerzoni ve ark. 1994; Papapetropolou ve ark. 1994a; Nakatsu ve ark. 1995), şişe suyunun organoleptik özelliklerinin değişmesine sebep olabilir (Papapetropolou ve ark. 1994b). Bakteri donmuş balık (Hugh ve Ryschenkow, 1961), süt (Juffs, 1973), kanatlı yumurtaları (Zhong, 1990) ve kuzu karkası (Sierra ve ark., 1995) gibi gıda kaynakları içinde bulunmuştur. Laboratuvar ortamında organizma, kontamine hücre kültürlerinden izole edilmiştir (Stanier ve ark., 1966) ve Sephadex kolonunu kontamine eden *S.maltophilia* izolatının %1 sodyum azid'i tolere edebildiği bildirilmiştir (Borowicz ve ark., 1995).

S.maltophilia'nın ev ortamında bulunma olasılığı, hastane ortamının tersine pek ilgi çekmemiştir. Mortensen ve ark. (1995) kistik fibrozis hastaları ile kontrol numunesi olarak alınan ailelerin ev ortamında pseudomonadların varlığını araştırmışlar ve 407 kültürde 4 adet gibi oldukça düşük bir oranda *S.maltophilia* bulmuşlardır. Ancak bu araştırmalarda bakteri için selektif besiyeri kullanılmamıştır. Bu önemli bir noktadır; zira çevresel örneklerden ve diğer kontamine materyalden

S.maltophilia izole edilmesinin selektif besiyeri kullanılarak artırılabilirliği bildirilmiştir (Juhnke ve Des Jardin,1989; Bollet ve ark.,1995; Kerr ve ark.,1996).

S.maltophilia'nın kuru ortamda canlı kalabilmesi ile ilgili bilgiler nispeten az olmakla birlikte Rosenthal (1974), bakterinin lavabo tıkaçları gibi ıslak ortamlarda sıklıkla bulunabilmesine rağmen hastane zemini gibi kuru ortamlarda nadiren bulunduğunu bildirmiştir. Bu bilgi, *S.maltophilia*'yı çeşitli nazokomiyal su örneklerinden izole eden ancak bakterinin, solunum tedavi ekipmanlarının kuru yüzeylerinde oldukça nadir izole edilebildiğini belirten Moffet ve Williams (1967)'ın bulgularıyla da örtüşmektedir. Hirai (1991), *S.maltophilia*'nın tek klinik suşunun, pamuk tiftiği ve cam plaka üzerine inoküle edildiğinde üreyebilme becerisini araştırmıştır. Pamuk tiftiği üzerinde 7 saatlik inkübasyon sonunda canlı bakteri saptanamamış olup cam plaka üzerinde ise aynı süre sonunda canlı bakteri saptanmış, ancak canlı kalan miktar ilk ekilen miktarın %1'inden az bulunmuştur. Cam plaka üzerinde üreme için *D* değeri (ilk ekim miktarının %90 azalması için gereken süre) 2.4 saattir. Bovine serum albumin gibi proteinlerin varlığı, diğer Gram negatif bakterilerin çoğalmasını artırsa da, bu durum *S. maltophilia*'da gözlenmemiştir.

S.maltophilia pek çok toprak çeşidinde (Fenton ve ark. 1973; DeBette ve Blondeau 1977; Bollet ve ark. 1995; Suga ve ark. 1995) ve farklı bitki rizosfer ortamlarında da bulunmuştur. Bulunduğu bitki rizosfer ortamları arasında çimen, şeker kamışı ve palmye (Juhnke ve Des Jardin 1989), buğday (Juhnke ve ark. 1987), muz, pamuk, fasulye, tütün (Hugh ve Gilardi 1980), çeltik tarlası (Komagata ve ark. 1974), narenciyeler (Abussaud ve Mahawreh 1994), orkide (Wilkinson ve ark. 1994), zambak (Belcour ve ark. 1993) ve depolanmış kereste (Dutkiewicz ve ark. 1992) sayılabilir. *S.maltophilia* lahana, kolza, hardal, mısır ve pancar gibi bazı hasat bitkilerinin rizosferinde diğer pseudomonadlara göre daha sıklıkta gözlenmiştir. Bu bitkilerden bazılarının proteini yüksek azot içeriklidir ve *S.maltophilia*, metiyonin gibi S-içerikli amino asitlere ihtiyaç duymaktadır. Iizuka ve Komagata (1964a), Japonya'daki petrol alanlarından elde edilen çeşitli sıvılardan ve materyalden *S.maltophilia* izole etmeyi başarmışlardır. *S.maltophilia* lif kabağı süngerinde de ürer (Bottone ve ark. 1994b).

S.maltophilia'nın rizosfer ortamında ve tarımsal zararlılara karşı biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyel kullanım alanı araştırılmıştır (Kwok ve ark. 1987; Lambert ve ark. 1987; Hebbbar ve ark. 1991; Sikorowski ve ark. 1992; Berg ve Balling 1994; Elad ve ark. 1994; Mazzola ve ark. 1995). Bu çalışmalar sonucunda, *S.maltophilia*'nın birçok fitopatojenik mantar türünün üremesini engellediği görülmüştür. Örnek olarak, bakterinin kolza yağı tohumunun rizosferinde bitki patojenik mantar üremesine müdahale ettiği bildirilmiştir (Berg ve ark., 1996). Kobayashi ve ark. (1995) tarafından, *S.maltophilia* kitinolitik suşlarının, çimenlerdeki çeşitli biyolojik kontroller için kullanılabileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak, Kerr (1996) tarafından yapılan çalışmada, *S.maltophilia*'nın *Candida* spp. ve *Aspergillus fumigatus* gibi insan patojeni mantarlarının üremesini de engellediği bildirilmiştir. Bu çalışmada inhibisyonun, bakterinin kitinolitik aktivitesinden ziyade pirolnitrin üretimine bağlı olduğu savunulmuştur. Ayrıca *S.maltophilia*'nın, saprofitik, insan ve fitopatojenik mantarlara karşı antifungal aktivite gösteren ve makrosiklik bir laktam ajanı olan maltofilini ürettiği belirtilmiştir (Jakobi ve ark., 1996). Minkwitz ve Berg (2001), klinik ve çevresel *S.maltophilia* izolatlarının antifungal aktivitelerini karşılaştırmışlar ve çevresel suşların çoğunun *C.albicans* ve *V.dahliae*'ye karşı antifungal aktivitelerinin klinik suşlardan daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

1.7. Hayvanlarda *S.maltophilia*

Hayvan kaynaklı *S.maltophilia* hakkındaki literatürler insan kaynaklı olanlara göre çok daha azdır. Çünkü hayvanlarda nadiren önemli bir patojen olarak bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2003). Önceki yıllarda *S.maltophilia* veteriner hekimliğinde genellikle primer patojen olarak değerlendirilmese de, günümüzde doğal çevrede bulunması ve antibiyotiklere dirençli olması sonucu neden olduğu sekonder veya primer infeksiyonlarla önem kazanmıştır. *S.maltophilia*, çiğ süt, donmuş balık, tavşan dışkısı (Hugh ve Ryschenkow, 1961), kertenkele, kurbağa (Hugh ve Gilardi, 1980) ve laboratuvar hayvanlarının mide-bağırsak kanalından (Fritz ve ark., 1996; Toledo-Pereyra ve ark., 1974) izole edilmiştir.

Johnson ve ark. (2003), Umman keçilerinde ortaya çıkan lenfadenitis olgularının *S.maltophilia* ile ilişkisini incelemişler. Çeşitli lenf nodüllerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin çoğunun *S.maltophilia* olduğunu saptamışlardır. Muir ve ark. (2007), köpeklerde diz ekleminde meydana gelen artiritis olgularında, sinoviada çevresel bakterilerin bulunmasının hastalığın oluşumunda rolü olduğunu saptamışlardır. Aldıkları sinovial biyopsilerde en çok rastlanan organizmalardan birinin *S.maltophilia* olduğunu belirtmişlerdir. Yine Muir ve ark. (2010)'nın daha sonra yaptıkları çalışmada, artritisten etkilenen köpeklerde bakteriyel genetik maddenin bulunmasında mevsimsel değişimin etkilerini incelemişlerdir. Bu araştırmalarında *S.maltophilia* için PCR yöntemini kullanmışlar ve önceki çalışmalarına paralel sonuçlar almışlardır. Albini ve ark. (2009), 2005'den 2007'ye kadar 100'den fazla at, köpek ve kediden toplanan farklı sayılardaki trakeobronşiyal yıkantı, bronkoalveoler lavaj, nazal svab ve infektif yaradan az sayıda da olsa *S.maltophilia* izole etmişlerdir. PCR ile daha fazla sayıda pozitiflik saptamışlardır. Winther ve ark. (2010), kronik öksürüğü olan 7 ata uygulanan endoskopik muayene ile alt trakeal bölgeden toplanan mukopurulent eksudattan *S.maltophilia* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bielanski ve ark. (2003), sıvı nitrojen tanklarında saklanan sperma ve embriyo örneklerindeki mikrobiyal kontaminasyonda en çok identifiye edilen bakterinin *S.maltophilia* olduğunu saptamışlardır. Ayrıca invitro olarak *S.maltophilia*'nın fertilizasyonu ve embriyonik gelişimi baskıladığını belirlemişlerdir. Althouse ve Lu (2005), inceledikleri 250 domuz spermasında bulunan bakteri kontaminasyonunda *S.maltophilia*'nın en yüksek saptanan ikinci bakteri olduğunu bildirmişlerdir.

Martinez ve ark. (2006), farklı organlarındaki yangılardan dolayı tekrarlayan sepsis ataklarından ölen bir Hint yılanının akciğer ve dalağından izole edilen *S.maltophilia*'nın vakaya sekonder olarak katıldığını belirtmişlerdir. Hejnar ve ark. (2007), yılanların oral florasında *S.maltophilia* varlığını tespit etmişlerdir. Draper ve ark. (1981), infeksiyöz stomatitisi olan yılanların ağız boşluğu ve kloakalarından izole edilen Gram negatif bakterilerden birinin de *S.maltophilia* olduğunu belirtmişlerdir. Harris ve Rogers (2001), septisemi olan bir timsahta *S.maltophilia*'nın infeksiyona sekonder olarak katıldığını belirtmişlerdir.

Ben-Gigirey ve ark. (2002), beyaz ton balığında (*Thunnus alalunga*) dot-blot hibridizasyon yöntemiyle *S.maltophilia* tespit etmişlerdir. Romanenko ve ark. (2008), Pasifik denizinde omurgasız hayvanlarda *Pseudomonas* benzeri bakterilerin biyoçeşitliliğini araştırırken sünger ve denizkestanesi gibi deniz canlılarından altı adet *Stenotrophomonas* suşu izole etmişlerdir. Bunların 4 tanesinin *S.maltophilia*, iki tanesinin de *S.rhizophila* olduğunu bildirmişlerdir. Standart tekniklerle izolasyonu zor olabilen, serbest yaşayan amiplerden *Acanthamoeba*'nın bakterisiz saf kültürde (aksenik) üretilmesi ile bilinen tek bir bakteri kültüründe (monoksenik) üretilmesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, canlı *S.maltophilia* içeren kültürde iyi gelişim gösterdiği belirtilmiştir (Penland ve Wilhelmus, 1997). Ayrıca Lysenko ve Weiser (1974), *Neoaplectana carpocapsae* nematodunda *S.maltophilia* varlığını bildirmiştir.

Saiman ve ark. (2001), kistik fibrozis akciğer hastalığına sekonder olarak katılan ve prognozu kötüleştiren *S.maltophilia* ve diğer birkaç bakteri üzerinde, bakterisidal aktivitesi olan endojen katesilidin peptidlerinin etkisini araştırmışlar ve bu peptidleri, insan, tavşan, fare, rat ve koyunlardan elde etmişlerdir. *S.maltophilia* üzerinde tüm peptitlerin, en çok da tavşan ve koyundan elde edilenlerin etkidiğini saptamışlardır. Ayrıca koyun yününde (London ve ark., 1984; MacDiarmid ve Burrell, 1993) ve tarla sincaplarında (Cloud-Hansen ve ark., 2007) *S.maltophilia* bulunduğunu belirten çalışmalar da vardır.

1.8. İnsanlarda *S.maltophilia*

S.maltophilia'nın en büyük önemi, insan sağlığını, fırsatçı bir patojen olarak olumsuz etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Hastalıkların direkt etkeni olabildiği gibi insanlarda çeşitli patolojik durumları şiddetlendiren sekonder infeksiyonlara da neden olabilmektedir. Bu nedenle en çok nozokomiyal bir patojen olarak ortaya çıkar. Nozokomiyal kaynaklar Çizelge 1.2'de gösterilmiştir. Özellikle immun sistemi baskılanmış yoğun bakım ünitesinde yatan, uzun süre hastanede tedavi gören ve yüksek oranda antibiyotik kullanılan, kistik fibrozis ve kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOA) gibi akciğerin hasara uğradığı hastalarda önemli klinik tablolara neden olmaktadır (Dignani ve ark., 2003). İzole ve identifiye edilen olgulara

örnekler; Kistik fibrozis (Gladman ve ark., 1992; Denton ve Kerr, 2002), kanser (Khardori ve ark., 1991), meningitis (Papadakis ve ark., 1997; Yemişen ve ark., 2008; Nguyen ve Muder, 1994), endokarditis (Rodero ve ark., 1996), peritonitis (Machuca ve ark., 2005), deri ve yumuşak doku infeksiyonları (Teo ve ark., 2006), septik bursitis (Papadakis ve ark., 1996), idrar yolu infeksiyonları (Vartivarian ve ark., 1996), bakteriyemi (Senol ve ark., 2002; Micozzi ve ark., 2000), cerrahi işlem sonrası ortaya çıkan endoftalmitis (Chaudhry ve ark., 2000) ve pneumonilerdir (Aisenberg ve ark., 2007). Selektif besiyeri kullanan Von Graevenitz ve Bucher, (1983), ayakta tedavi gören diyare hastaları veya onların çevresindeki kişilerde fekal taşıma oranının %10.9 (128 örnekten 14'ü) olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 1.2. *S.maltophilia*'nın nozokomiyal kaynakları

Kaynaklar	Referanslar
Kan numune tüpleri	Fisher ve ark., 1981; Semel ve ark., 1978
Merkezi damar/arter basınç monitörleri	Fisher ve ark., 1981
Kontakt lens bakım sistemleri	Bottone ve ark., 1992; Donzis ve ark., 1987; Midelfart ve ark., 1996
Deionize su sebili	Wishart ve Riley, 1976
Diyaliz makinesi	Flaherty ve ark., 1993; Van Holder ve ark., 1992
Dezenfektan solüsyonlar	Wishart ve Riley, 1976
Sağlık personelinin elleri	Van Couwenberghe ve Cohen, 1994; Villarino ve ark., 1992
Hidroterapi havuzları	Pedersen ve ark., 1970
Nebulizör (sprey püskürtücü) ve solunum tedavi ekipmanı	Moffet ve Williams, 1967, Denton ve ark., 2003
Nekroskopi numuneleri	Pedersen ve ark., 1970
Oksijen analizörleri	Klick ve Du Moulin, 1978
Oksijen nemlendirici su rezervuarı	Cameron ve ark., 1986
Tıraş fırçaları	Oie ve Kamiya, 1992.
Duş başlıkları, lavabo tıkaçları ve musluklar	Khardori ve ark., 1991; Rosenthal, 1974; Talon ve ark., 1994
Aspiratör (ventilator) devresi	Malecka-Griggs ve Reinhardt, 1983; Visser ve ark., 1992

Alt gastrointestinal kanal dışındaki taşıyıcı bölgeler konusunda çok az sistematik çalışma yapılmıştır. Sağlık çalışanlarının ellerinden *S.maltophilia* izole edilmiştir (Van Couwenberghe ve ark., 1995). Rosenthal (1974) 200 örnekten alınan boğaz yıkantısından *S.maltophilia* izole edememiş ancak başka bir çalışmada sağlıklı yetişkinlerin orofarengeal svablarından izole edilebilmiştir (Hugh ve Gilardi, 1980). Meningoensefalit tablosu gözlenen bir HIV hastasında *S.africana* suşu izole edilmiştir (Drancourt ve ark.,1997). Calza ve ark. (2003), yaptıkları 10 yıllık bir çalışmada HIV hastalarında *S.maltophilia* görülme sıklığını ve hastalığa etkisini araştırmışlar ve pnemoni, üriner sistem infeksiyonu, farengitis, lenfadenitis ve karaciğerde apse olgularından sonra bakteriyemi gözlemlemişlerdir. Etkeni, kandan, bronşyoalveoler yıkantı, idrar, farengeal svab, lenf nodülü biyopsisi ve karaciğer apse drenajından izole etmişlerdir.

1.9. *S.maltophilia*'nın Antimikrobiyal Maddelere Direnci

S.maltophilia'nın dirençli olduğu bilinen gruplar, β -laktamlar, karbapenemler ve aminoglikozidlerdir. Beta-Laktamaz üretiminin yol açtığı direnç; bakterinin ürettiği birçok enzim arasından en önemlileri L1 ve L2 betalaktamaz enzimleridir. *S.maltophilia* tarafından üretilen β -laktamazın varlığı ilk kez, bakterinin 20 klinik suşunda altı farklı enzimin varlığını tanımlayan Cullman ve Dick (1990) tarafından ortaya atılmıştır. L1 çinko bağımlı bir metalloenzimdir. Monobaktamlar hariç beta-laktam sınıfı antibiyotiklerin tümünü (karbapenemler dahil) hidrolize eder. Klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı değildir. L2 serin beta-laktamaz bir sefalosporinazdır. Aztreonamı hidrolize eder. Beta-laktamaz inhibitörlerine, özellikle de klavulanat'a karşı duyarlıdır. Her ikisinin de ekspresyonu kromozomal genler tarafından kodlanır ve indüklenir (Dignani ve ark., 2003). Penisilinlerin ve sefalosporinlerin bakteriyel hücre duvarından zayıf difüzyonunun, bu bileşiklere direnci yükselttiği belirtilmiştir (Cullmann, 1991). Aminoglikozid dirençliliğinin, aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler, dış membrandaki değişikliklerden kaynaklanan ısıya bağlı direnç, efluks-aracılı mekanizma (efluks pompa sistemi) veya hedef değişikliğinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir

(Nicodemo ve Paez, 2007). *S.maltophilia*'nın kinolonlara olan direnci, dış membranındaki değişimlerden kaynaklanmaktadır (Dignani ve ark., 2003). Sulfametoksazol-trimetoprim (SXT) direnci halen ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Barbolla ve ark. (2004), SXT MIC değerini attıran ve üç klonda bulunan *sulI* genine değinmişlerdir. Bu gen plazmid aracılı dirençten sorumludur. Yazarlara göre elde edilen bulgular, sınıf I integronların yaygınlığının artması yanında birçok enfeksiyonun tedavisinde SXT kullanımının kısıtlanabileceğini de göstermektedir. Tüm bunların yanında bakterinin oluşturduğu ve canlı ve cansız yüzeylere tutunmasına yarayan biyofilm, tam olarak bir direnç mekanizması sayılmamaktadır. Ancak bakterinin sentezlediği bu ekstraselüler tabaka ya da glikokaliks konakçı savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal ajanlara karşı önemli bir faktördür (Nicodemo ve Paez, 2007). Nazokomiyal *S.maltophilia* suşlarından, alıcı *E.coli*, *P.mirabilis* ve *P.aeruginosa* suşlarına, aktarılabilir sefalosporin ve aztreonam direnci gözlenmiştir (Hupkova ve ark., 1995). Kelly ve ark. (1995), 5.6-kb plazmid taşıyan klinik *S.maltophilia* suşunda aktarılabilir penisilin ve sefazolin direnci gözlemlemişlerdir. *S.maltophilia*'dan *P.aeruginosa*'ya antibiyotik dirençliliğinin taşınması ile ilgili bir bildiride hastane çevresinde bu iki türün en yaygın gözlenen oportunistik patojenler olması itibarıyla muhtelif tehlikeye dikkat çekilmiştir (Babalova ve ark., 1995). *S.maltophilia* ile yapılan laboratuvar çalışmaları R plazmid genlerinde kodlanan çoklu ilaç direncinin (amikasin ve sefalosporin dahil) diğer türlere aktarılmasının mümkün olabileceğini göstermiştir (Krcmery ve ark., 1985). Gram pozitif kökenli antibiyotik ve ağır metal direnç genleri *Staphylococcus aureus*'da saptanmasının yanında klinik orijinli bir *S.maltophilia* suşunda da saptanmıştır (Alonso ve ark., 2000). *S.maltophilia* enfeksiyonlarında sağaltım amacıyla en çok sulfametoksazol-trimetoprim kullanılır. Ne var ki Türkiye'de ve dünyada yapılmış bir çok araştırmada nosokomial izolatlarda bu antibiyotiğe karşı direnç gözlemlenmiştir (Valdezate ve ark., 2001; Al-Jasser, 2006; Dülger ve ark., 2006).

Bakterinin direnç mekanizmaları birçok araştırmacı tarafından moleküler olarak da incelenmiştir. Alonso ve ark. (2000), efluks pompa sistemini kodlayan *SmeDEF* genini tanımlamış ve klonlamışlardır. Daha sonra Alonso ve Martinez (2001), ekspresyonunun antibiyotik direnciyle bağlantılı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Lambert ve ark. (1999), tarafından tanımlanan kromozomal *aac(6')-Iz* geni aracılığı ile sentezlenen aminoglikozid asetiltransferaz enziminin, Li ve ark. (2003), amikasin, netilmisin, sisomisin ve tobramisine karşı direnci arttırdığını belirlemişlerdir. Yine aminoglikozid direncinin belirlenmesinde rol oynayan *Aph(3')-IIc* Okazaki ve Avison (2007), tarafından araştırılmıştır. Shimizu ve ark. (2008), *S.maltophilia*'nın kinolon direncinden sorumlu bir gen taşıdığını saptamışlar ve bu yeni geni *Smqnr* olarak tanımlamışlardır.

1.10. *S.maltophilia*'nın İzolasyonu ve Laboratuvar Tanısı

Çok çeşitli materyalden izole edilebilen *S.maltophilia* suşlarının görülme sıklığı hastane ve klinik laboratuvarlarda *P.aeruginosa*'dan sonra gelir (Hugh ve Gilardi, 1980). Türlerin beslenme spektrumu çok dar olduğundan, özellikle *S.maltophilia* suşları tarafından kullanılan C (karbon) kaynaklarına bağlı etkin zenginleştirme yöntemleri geliştirmek mümkün değildir. Maltoz, laktoz ve sellobiyoz gibi bazı C kaynakları *S.maltophilia* suşları tarafından kullanılırken diğer aerobik pseudomonad türleri tarafından kullanılmaz. Ancak doğal numunelerde bulunan birçok başka organizma bu substratları kullanabildiği için *S.maltophilia* zenginleştirmesinde yanlış sonuçlar ortaya çıkarabilir. Pek çok suşun metiyonin ve diğer aminoasitler gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duyması nedeniyle direkt izolasyon Trypticase Soya Agar ve Brain Heart Infusion Agar gibi kompleks besiyerlerinde sağlanabilir (Palleroni, 2005). Juhnke ve Des Jardin (1989), *S.maltophilia*'yı diğer *Pseudomonas* türlerinden ayıracak bir selektif besiyeri geliştirmişlerdir. XMSM (*Xanthomonas maltophilia* Selective Medium) adı verilen bu besiyerinde, temel girdiler yanında sikloheksimid (100 µg/ml), nistatin (50 µg/ml), sephaleksin (50 µg/ml), basitrasin (25 µg/ml), penisilin G (25 µg/ml), novobiyosin (10 µg/ml), neomisin sülfat (30 µg/ml) ve tobramisindir (1 µg/ml) bulunmaktadır. Bollet ve ark. (1995), bu besiyerinin zor hazırlanmasına rağmen çok seçici olmadığını belirterek, *S.maltophilia*'nın doğal imipenemaz üretme özelliğine dayanan bir yöntem kullanmıştır. Bu yöntemde, katı besiyerine yayma yoluyla yapılan ekimden sonra 10 µg imipenem diski yerleştirmişler ve disklerin çevresindeki inhibisyon alanında

gözlenen küçük kolonilerin *S.maltophilia* olduğunu saptamışlardır. Kerr ve ark. (1996), *S.maltophilia* için diğer bir selektif diferansiyel besiyeri geliştirmişlerdir. Bu besiyeri, indikatör sistem olarak kullanılan mannitol-bromtimol mavisine selektif ajan olarak eklenmiş vankomisin, imipenem ve amfoterisin B (VIA agar) içermektedir. Bunu XMSM ile karşılaştırmışlar ve VIA agarın *S.maltophilia* üzerinde daha az inhibitör etkisi olduğunu ve XMSM'den daha selektif olduğunu saptamışlardır. VIA agarda vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* üreyebileceğini ancak mannitol fermentasyonundan dolayı *S.maltophilia*'dan kolayca ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları denemelerde amfoterisin B yerine nistatin (VIN agar) ve siklohekzimid (VIC agar) de kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Gladman ve ark. (1992), kistik fibrozis'de hastaların kışeplerinden *S.maltophilia* izolasyonu için imipenem içeren kanlı agar kullanmışlar ve *S.maltophilia* prevalansının %8'den %16'ya yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Ancak bu çalışma daha sonra selektif ve non selektif besiyerleriyle karşılaştırılmamıştır (Denton ve ark., 2000). Bu araştırmacılar kistik fibrozis hastalarından alınan kışe örneklerini kullanarak selektif besiyeri olan VIA'nın sensitivitesini, imipenem diski konulan Bacitrasin Chocolate Agar ile karşılaştırmışlardır. VIA agarın sensitivitesinin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Qureshi ve ark. (2005), salata yapımında kullanılan sebzelerdeki bakteri prevalansını incelemişlerdir. Selektif besiyeri olarak VIA agar kullanmışlar. İmipenem dirençli çevresel bakterilerden *Janthinobacterium lividum* veya vankomisin dirençli *Enterococcus faecium*'un VIA'da üreyebileceğini ancak besiyerinin içerdiği indikatör sistem olan mannitol/bromtimol mavisinden dolayı *S.maltophilia*'nın ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada *S.maltophilia*, 18 salata örneğinin 14'ünden kültüre edilmiştir. Foster ve ark. (2008a), *S.maltophilia* izolasyonunda kullanılan selektif diferansiyel besiyerini modifiye ederek değerlendirmişlerdir. Besiyerini Kerr ve ark. (1996)'nın geliştirdiği gibi hazırlamışlar ancak imipenem yerine yarı konsantrasyonunda meropenem eklemişlerdir. Birçok bakterinin bu besiyerinde üremesini test etmişler ve sadece *R.pickettii*'nin VIA'da iyi üreme gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu bakterinin *S.maltophilia*'dan oksidaz testiyle kolayca ayırt edilebileceğini de belirtmişlerdir. *S.maltophilia* zorunlu aerob bir bakteridir. İn vitro olarak 37°C'de tipik koloni formasyonu oluştursa da optimum

üreme sıcaklığı 30-35°C'dir. Bu nedenle yukarıda bahsedilen selektif besiyeri çalışmalarıyla bakteri ile ilgili identifikasyon testleri, enzim analizleri ve MIC değerlerinin incelenmesi gibi araştırmaların çoğu hem 30°C hem de 37°C'lerde yapılmıştır. Bakterinin izolasyonu için ilk olarak selektif besiyeri seçilmesi genel besiyerlerinin kullanımına göre zaman kazandırıcıdır. Konvansiyonel olarak identifikasyonda kullanılabilecek testler Çizelge 1.3'de gösterilmiştir. Konvansiyonel yöntemi hızlandırıcı API veya VITEK gibi ticari biyokimyasal sistemler kullanılabilir.

Çizelge 1.3. *S.maltophilia*'nın üremesinde gereksinimleri (Palleroni, 2005)

Özellikler	Tipik fenotip
Metiyonin ihtiyacı	+
Oksidaz reaksiyonu	-
Nitratin azot kaynağı olarak kullanımı	-
Laktozda üreme	+
Maltozda üreme	+
L-Aspartatta üreme	-
β -Hidroksibutiratta üreme	-
Glutaratta üreme	-
Gliserolde üreme	-
Sellobiyozda üreme	+

Moleküler olarak örneklerden *S.maltophilia*'nın direkt teşhisi için, Whitby ve ark. (2000), 23S rRNA genini kullanarak SS-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Daha sonra Foster ve ark. (2008b), bu yöntemle *Stenotrophomonas* ve *Xanthomonas* türlerinde kros reaksiyonu araştırmışlardır.

Bunun dışında, *S.maltophilia*'nın tiplendirilmesi amacıyla RAPD-PCR, ERIC-PCR, PCR, BOX-PCR, AP-PCR, PFGE ve AFLP yöntemleri kullanılmıştır (Van Couwenberghe ve ark., 1995; Berg ve ark., 1999; Hauben ve ark., 1999; Gülmez ve Haşcelik, 2005; Nazik ve ark., 2007). Ayrıca Da Silva Filho ve ark. (2004), kistik fibrozis hastalarının kraşe ve orofarengeal örneklerinden *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* kompleks ve *S. maltophilia* identifikasyonu için multipleks PCR, direkt PCR ve kültür yöntemlerini karşılaştırarak kullanmışlardır. Son yıllarda *S.maltophilia* ile ilgili sekans çalışmaları da yapılmıştır (Zbinden ve ark., 2007; Kaiser ve ark., 2009).

Şimdiye kadar Türkiye'de hayvanlarda *S.maltophilia* varlığı incelenmemiştir. Bu tez çalışmasında, sığır, koyun ve atların üst solunum yollarında ve bulundukları çevrede *S.maltophilia* varlığının, konvansiyonel ve moleküler tekniklerle saptanması, ayrıca izole edilen suşların virülens faktörlerinden proteaz sentezi, tween 80 hidrolizi, fosfolipaz C üretimi, hemolitik aktivitesi, flagella varlığı ve hücre kültüründeki sitotoksik özelliği yanında antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen verilerle birlikte bu çalışma, Türkiye'de veteriner hekimliği alanında saptanan *S.maltophilia* hakkında temel bilgiler sağlaması açısından önemlidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Standart Suş

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

2.1.2. *Stenotrophomonas maltophilia* İzolasyonu İçin Toplanan Örnekler

Bu çalışmada *S.maltophilia* izolasyonu için sığır ve koyunların burun ve tırnak araları ile atların burunlarından alınan svab örnekleri toplandı. Burun örnekleri biyolojik, tırnak arası örnekleri de çevresel örnek olarak değerlendirildi. Sığır ve koyun örnekleri Ankara ilinin Çubuk, Kazan, Kızılcahamam ve Yozgat ilinin Sorgun ilçelerinden toplandı. Sığır burun ve tırnak arası örnekleri, Çubuk, Kazan ve Kızılcahamam'dan 18'er, Sorgun merkez ve 15 farklı köyünden (Eymir, Tatlı, Bahadın, Doğanlı, Karakız, Külhüyük, Sarı Hamzalı, Belencumafakılı, Mirahor, Moğallı, Mahmatlı, Gökiniş, Dişli, Esenli, Gelingüllü) 37'şer tane olmak üzere toplamda 182; koyun burun ve tırnak arası örnekleri, Kızılcahamam, Kazan ve Sorgun'dan 20'şer tane olmak üzere toplamda 120 adet toplandı. Eskişehir'in Mahmutiye ilçesinde bulunan at yetiştiricilerinden 60 adet at burun örneği toplandı. Bu örneklerin içinde klinik olarak solunum sistemi infeksiyonu gösteren 5 sığırın klinik hikâyeleri ve antibiyogram sonuçları ayrıca değerlendirildi.

Toplanan örneklerin kaynakları ve sayıları Çizelge 2.1'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Örnekler toplanırken numune alım kurallarına dikkat edildi. Svablar içinde 1ml steril FTS bulunan steril tüplere konularak buz kalıplarına sarılı şekilde soğuk zincirde laboratuvara getirildi.

Çizelge.2.1. Toplanan örneklerin kaynak ve sayıları

Orijin	Sığır		Koyun		At
	Burun	Tırnak	Burun	Tırnak	Burun
Sorgun Merkez	9	9	5	5	-
Sorgun Köyleri	28	28	15	15	-
Kazan	18	18	20	20	-
Kızılcahamam	18	18	20	20	-
Çubuk	18	18	-	-	-
Mahmudiye	-	-	-	-	60
Toplam	91	91	60	60	60

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar ve Boyalar**VIA Agar****(Vankomisin, İmipenem*, Amfoterisin B)**

Besiyeri Bileşeni	g/lt
Mannitol Agar (MAST ID)	40,06g
Vankomisin	5mg
İmipenem	32mg
Amfoterisin B	2,5mg

*İmipenem yerine 16mg/lt Meropenem kullanılabilir.

VIN Agar**(Vankomisin, İmipenem*, Nistatin)**

Besiyeri Bileşeni	g/lt
Mannitol Agar (MAST ID)	40,06g
Vankomisin	5mg
İmipenem	32mg
Nistatin	24mg

*İmipenem yerine 16mg/lt Meropenem kullanılabilir.

Mannitol Agar (MAST ID) Besiyeri Bileşeni (g/lt)

Pepton	10 g (Merck 1.07212)
D(-)-Mannitol	10 g (Merck 105983)
Bromtimol mavisi	0.06 g (Merck 103026)
Bacto-Agar	20 g (Difco 0140-01 / 214010)

Kodako Flagella Boyama Solüsyonları

Solüsyon I: 10ml %5 fenol, 2gr tannik asit, 10ml doymuş alüminyum potasyum sülfat 12-hidrat bir kapta karıştırılarak oda sıcaklığında saklandı.

Solüsyon II: Etanolde doymuş kristal viyole hazırlandı (12gr/100ml) ve oda sıcaklığında saklandı. Boyama yapılana kadar bu iki solüsyon karıştırılmadan saklandı.

2.1.4. Diğer Besiyerleri ve Kimyasallar

Bakteri izolatlarının identifikasyonunda kullanılan testlerin gerçekleştirilmesi amacıyla MacConkey Agar (Oxoid, CM0007), Kanlı Agar (Oxoid, CM0055), Nutrient Agar (Oxoid, CM0003), Nutrient Broth (Oxoid, CM0501), DNase Agar (Oxoid, CM0321), Muller Hinton Agar (Oxoid, CM0337), Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM0131), Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129), oksidaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ayraç emdirilmiş Oksidaz test çubukları (Oxidase Sticks, Oxoid, BR0064), Skim Milk Powder (Oxoid, LP0031), Tween 80 (Difco, 3118-15) ve L-lizin kullanıldı. Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) hücre kültürü kullanıldı. Testin yapılışında Edulp vasatı kullanıldı. Söz konusu hücre kültürü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı hücre koleksiyonundan temin edildi.

2.1.5. PCR’da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Hem örneklerden direkt teşhis için, hem de izole edilen suşların PCR temelli tekniklerle identifikasyonu amacıyla hassas terazi (Scaltec sbc41, Almanya), soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya), ısıtma bloğu (Bio, Letonya), steril kabin (laminar flow) (Bioair Instruments, Aura 2000, Mac, İtalya), vorteks (Fine Vortex, Kore), pH metre 420A (Orion, A.B.D), DNA Thermal Cycler (Biometra, Almanya), Jel elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus, A.B.D.), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System, UK), Thermal printer (Sony, Japan) kullanıldı.

2.1.6. PCR’da Kullanılan Buffer, Solüsyon, Primer ve Enzimler

Hem örneklerden direkt teşhis için, hem de izole edilen suşların PCR temelli tekniklerle identifikasyonu amacıyla, Etanol (%95’lik) (Merck, Almanya), Tris Borat EDTA (TBE) (Fermentas, Litvanya), Ticari Ekstraksiyon kiti (GeneJET Genomic

DNA Purification Kit, Fermentas), Dietilpirokarbonatlı su (DEPC- treated water) (Fermentas, Litvanya), 10xPCR Buffer (Fermentas, Litvanya), 25 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya), 10 mM dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya), Primerler (Thermohybaid, Almanya), Taq DNA Polymerase (5u/μl, Fermentas, Litvanya), DNA marker (100 bp, 1000 bp) (Fermentas, Litvanya), 6xLoading Dye (Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Kullanılan primerlerin spesifiteleri, NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programıyla *in silico* analizleri yapılarak kontrol edildi. Kullanılan primerlerin ilgili gen bölgeleri ve baz dizilimleri Çizelge.2.2’de verildi.

Çizelge.2.2. Kullanılan primerlerin ilgili gen bölgeleri ve baz dizilimleri (Whitby ve ark., 2000)

Primer	SM1, SM4
Spesifite	<i>S.maltophilia</i>
Bölge	23S rRNA
Sekans	5’-CAGCCTGCGAAAAGTA-3’ 5’-TTAAGCTTGCCACGAACAG-3’
Gen Büyüklüğü	531 bp

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laboratuvara getirilen örnekleri içeren tüpler vortekslenerek svab içeriğinin FTS'ye geçmesi sağlandı. Mümkün olduğunca homojenize edilen sıvıdan 100µl alınarak, selektif besiyeri olan VIA agara yayma ekim yapıldı ve 30-35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. VIA agarda gri-kahverengine yakın tipik çamurumsu kolonilerin bulunduğu bölgelerde besiyeri renginin yeşilden maviye döndüğü gözlemlendi. VIA agarda şekillenen kolonilerden Nutrient agar ve MacConkey agara tek koloni elde edilecek şekilde ekimler yapılarak aynı süre ve sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda şekillenen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelendi. MacConkey agarda tipik uçuk pembe veya renksiz koloniler gözlemlendi. Nutrient Agarda saf olarak elde edilen suşlar Gram boyama yöntemi ile boyandı. Mikroskopik olarak Gram negatif küçük çomaklar arandı. İdentifikasyon amacıyla, oksidaz, DNase, glikoz oksidasyon-fermentasyon testleri yapıldı (Denton ve Kerr, 1998). Hareket muayenesi için Kodako flagella boyama yöntemi uygulandı. Diğer türlerden ayırt edilmesi için nitrat, eskülin (Wolf ve ark., 2002), D-fruktoz oksidasyon-fermentasyon testleri yanında, %5 NaCl'de ve 42°C'de üreme olup olmadığı kontrol edildi (Coenye ve ark, 2004). Ayrıca proteaz sentezi, tween 80 hidrolizi, fosfolipaz C üretimi ve hemolitik aktivitesi incelendi. İzole ve identifiye edilen suşlara daha sonra moleküler yöntemlerin uygulanması için %20 gliserin içeren Tryptone Soya Broth'da süspanse edilerek -20°C ve -80°C'de saklandı.

2.2.1.1. Fenotipik Testler

Flagella tayini: Kodaka flagella boyama yöntemi ile yapıldı. Boyamaya başlamadan önce, solüsyon 1'den 10 birim, solüsyon 2'den 1 birim olacak şekilde karıştırıldı. Temiz ve kuru bir lam üzerine 2 damla distile su damlatıldı. Bir öze yardımıyla nutrient agarda üreyen bir koloni alınarak damla içinde yayılması beklendi. Preparat

oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra lamın üzeri hazırlanan boya karışımı ile kaplandı ve 5 dk beklendi. Süre sonunda lamın önü ve arkası 2-3 dk hafif akan suda yıkandı. Preparat kuruduktan sonra immersiyon objektifte periferden başlanarak incelendi (Kodaka ve ark., 1982).

Oksidaz Testi: Bu test için Oxoid, oksidaz identifikasyon stick'leri kullanıldı. Taze katı kültürden alınan koloniler sticklerin ucunda mor renk oluşumuna neden olduğunda pozitif, renk değişikliğine neden olmadığında negatif olarak değerlendirildi (Foster ve ark., 2008a).

DNase testi: DNase agar üzerine yapılan lineer ekimler 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda agar üzeri 1M HCl ile kaplanarak birkaç dakika beklenerek, ekim hattının çevresinde transparan alan oluşumu pozitif değerlendirildi (Denton ve Kerr, 1998).

Oksidasyon Fermentasyon testi: Bu test iki farklı şeker ile yapıldı. Önceden tindalize edilen glikoz ve D-fruktoz, 5'er ml olacak şekilde tüplere bölünmüş O/F besiyerine %5'er olacak şekilde eklendi. İzolatlardan hem glikozlu hem de d-fruktozlu O/F besi yerlerine iğne uçlu öze ile dikey ekim yapılarak 37°C'de 18-24 saat beklendi. Süre sonunda besi yerlerinin renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirildi (Van Den Mooter ve Swings, 1990).

Nitrat Redüksiyon Testi: Tüplere 5'er ml olacak şekilde bölünen nitrat buyyon içine katı besiyerinden taze kültürler ekilerek 37°C'de 1-2 gün üremeler kontrol edildi. Besiyerinde bulanıklık gözlemlendiğinde α -naftilamin ve sülfanilik asit ayraçları 5'er damla damlatıldı. Tüpler çalkalandıktan birkaç dakika sonra kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Renk değişimi olmadığı durumda tüpe 15-20 mg toz çinko eklenerek tekrar renk değişikliği olup olmasına göre testin sonucu değerlendirildi (Van Den Mooter ve Swings, 1990).

Eskülin Testi: Petri kaplarında hazırlanan Edwards besiyerine taze kültürlerden çizerek ekim yapıldı ve 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kahverengi koloni rengi pozitif olarak değerlendirildi. Tür ayrımında son olarak tüplerde 5’er ml bulunan %5’lik NaCl’e taze katı kültürlerden ekimler yapılarak 37°C’de ve nutrient agara çizerek ekilen kültürlerde 42°C’de, 18-24 saat inkübe edildi. Süre sonunda üreme olup olmadı kontrol edildi (Van Den Mooter ve Swings, 1990).

2.2.2. Virülens Özelliklerinin Belirlenmesi

Hemolitik Aktivite: Kanlı agarda birbirine yakın üremelerin çevresindeki yeşilimsi renk değişiminin gözlenebilmesi (Denton ve Kerr, 1998) için besiyeri olarak %2.5 koyun kanı (Figueiredo ve ark., 2006) içeren kanlı agar kullanıldı. Nutrient agarda saf olarak üretilen koloniden öze yardımıyla kanlı agarda yoğun ve tek koloniler ayrı ayrı görünecek şekilde çizme ekim yapıldı. Hemoliz oluşumu 18, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda değerlendirildi.

Proteaz Sentezi: Kazein hidrolizi ile belirlendi. Bunun için, %3 skim milk içeren Muller Hinton agar kullanıldı. Bu besiyerine taze *S.maltophilia* sıvı kültüründen 100 µl spot ekim yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekim noktalarının çevresindeki transparan zon alanları pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Edberg ve ark. 1996).

Tween 80 Hidrolizi: Tween 80 hidrolizi, Figueiredo ve ark. (2006)’nın bildirdikleri yöntemine göre yapıldı. Besiyeri olarak %1 Tween 80 eklenmiş TSA kullanıldı. *S.maltophilia* taze kültürlerinden 100’er µl besiyeri üzerine spot ekimler yapıldı ve 37°C’de 24-48 saat inkübe edildi. Ekim noktalarının çevresindeki bulanık ve düzensiz hale görünümü pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Edberg ve ark. 1996).

Fosfolipaz C Üretimi: Fosfolipaz C varlığının tespiti Chhibber ve ark. (2008)'nın, bildirdikleri yöntemle göre yapıldı. Besiyeri olarak Nutrient Buyyon 5'er ml olacak şekilde test tüplerine bölündü. Bunların üzerine, FTS ile hazırlanan %10'luk yumurta sarısı süspansiyonundan eşit hacimde eklendi. Negatif kontrol için yumurta sarısı süspansiyonu eklenmemiş Nutrient Buyyon kullanıldı. Bütün tüplere test edilecek *S.maltophilia* suşlarının bir gecelik kültürlerinden 10'ar µl inokule edildi ve 37°C'de 24-48 saat inkube edildi. Besiyerinde bulanıklık yanında yüzeyde sarımsı pıhtılaşma oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Sitotoksitenin Belirlenmesi: Bu amaçla Figueiredo ve ark. (2006), tarafından çalışmalarında kullandıkları süpernatanta uygun şekilde test materyali hazırlandı. Bunun için, %1 L-lizin içeren Trypticase Soya Broth besiyeri hazırlandı ve 5'er ml olacak şekilde tüplere bölündü. *S.maltophilia* suşları bu besiyerinde 37°C'de, 100 rev min⁻¹'e ayarlanan karıştırıcıda 22 saat kültüre edildi. Bu periyod sonunda tüpler 4°C'de 10 dk ve 10.000 g'de santrifüj edilerek 0,2 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra test materyali hazırlanmış oldu. Test materyallerinin gerek sitotoksitelerinin ve gerekse antiviral aktivitelerinin belirlenmesi in vitro koşullarda gerçekleştirildi.

Testin yapılışı; bu amaçla 96 gözlü mikropleytler (Greiner, Nuertingen, Germany) kullanıldı. Mikropleytin bütün gözlerine 50'şer mikrolitre Edulb vasatından konuldu. Her test materyali için 2'şer göz çalışıldı ve mevcut vasatın üzerine 50'şer mikrolitre test materyali konuldu. MDBK hücre kültürü Edulb + %10 FDS'lu vasat ile 3×10^{-5} hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirildi ve bütün gözlerle 50'şer µl ilave edildi. Pleytler kapakları kapatılarak 37°C'ye ayarlı CO₂'li etüvlere kaldırıldı. Ertesi gün test materyallerinin hücre kültürlerinde oluşturdukları toksik etki doku kültürü mikroskobu ile değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi. Test materyallerinin hücre kültürlerinde oluşturdukları toksisite derecelerine göre +, ++ veya +++ olarak kaydedildi.

2.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen *S.maltophilia* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi Disk Difüzyon yöntemi ile yapıldı (Arpi ve ark., 1996; Valdezate ve ark., 2001). *S.maltophilia* suşları McFarland 0.5 standart süspansiyonunun bulanıklığına göre belirlendi. Müller-Hinton Agar antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanıldı. Bu amaçla McFarland 0.5'e göre hazırlanan *S.maltophilia* suşlarından 0.1 ml alınarak Müller- Hinton agara ekim yapıldı.

Duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla, Ciprofloxacin (Oxoid, 5µg), Enrofloxacin (Oxoid, 5µg), Gentamicin (Oxoid, 10 µg), Tetracycline (Oxoid, 30 µg), Oxytetracycline (Oxoid, 30 µg), Trimethoprim/Sulphamethoxazole (Oxoid, 25 µg), Amoxicillin-Clavulanic acid (Oxoid, 30µg), Lincomycin/Spectinomycin (Oxoid, 109 µg), Tylosin (Bioanayse, 30 µg) , Ceftiofur (Bioanayse, 30 µg), Ofloxacin (Oxoid, 5µg), Tilmicosin (Bioanayse, 15 µg), Chloramphenicol (Oxoid, 30 µg), Ceftazidime (Oxoid, 30 µg), Azithromycin (BBL, 15 µg) ve Imipenem (Oxoid, 10 µg) kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılıklarını belirlenmesi amacıyla oluşan zonların ölçümü ve değerlendirilmesi Enrofloxacin hariç diğer antibiyotikler için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ün standartlarına göre yapıldı. Enrofloxacin ise Bayer Health Care LLC Animal Health Division' a göre değerlendirildi.

2.2.4. Moleküler Tanı

İzole edilen suşların genetik düzeyde doğrulanması ve klinik örneklerden direkt tanı amacıyla PCR kullanıldı (Albini ve ark., 2009).

2.2.4.1. Kültürden PCR

2.2.4.1.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

Kontrol suş ile kültürden kaynatma ve ticari kit ile ekstraksiyon denemeleri yapıldı ve iki yöntem arasında fark olmadığı görüldü. Bu nedenle konvansiyonel izolasyon sonrası kültürlerden kaynatma ile ekstraksiyon işlemi yapıldı.

Kaynatma ile ekstraksiyon protokolü: Tek koloni düşecek şekilde ekimleri yapılmış kültürlerden iki koloni alınarak 300 ml FTS içinde homojen hale getirildi. Ependorf içindeki süspansiyon 8000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra 10 dakika 100°C’ye ayarlanmış ısı bloğunda bekletildi. Isı bloğundan çıkan ependorflar 4000 rpm’de 2 dk daha santrifüj edildikten sonra üstteki sıvıda DNA ekstrakte edilmiş oldu.

2.2.4.1.2. Amplifikasyon İşlemi

PCR yönteminde kullanılan karışım ve amplifikasyon koşulları Albini ve ark. (2009)’ın PCR protokolünden modifiye ve optimize edilmiştir (Çizelge 2.3 ve 2.4).

Çizelge 2.3. PCR yönteminde kullanılan mix miktarları

Kullanılan solüsyonlar	Miktarları
DEPC- treated water	15.9 µl
10xPCR Buffer	2.5 µl
25 mM MgCl ₂	2.5 µl
10 mM dNTP	0.5 µl
SM1	0.2 µl
SM4	0.2 µl
Taq Polimeraz	0.2 µl
Template DNA	3 µl
Toplam Hacim	25 µl

Çizelge 2.4. PCR yönteminde kullanılan amplifikasyon koşulları

PCR Adımı	Siklus Koşulları	Siklus Sayısı
Ön denatürasyon	95°C 5 dk.	
Denaturasyon	95°C 30 sn.	30 siklus
Primer Bağlanması	58°C 30 sn.	
Ekstansiyon	72°C 60 sn.	
Final Ekstansiyon	72°C 2 dk.	

2.2.4.1.3. Elektroforez

PCR sonucunda örneklerin elektroforezinde %1.5'luk agaroz jel kullanıldı. Bu işlem için 3 g agaroz (Basica Le Agarose, Prona, İspanya) tartılarak steril bir erlene konuldu. Üzerine tris borate EDTA (TBE) buffer (x0.5 konsantrasyonda)'dan 200 ml eklenerek karıştırıldı. Mikrodalga fırında 1 dk 45 sn tutularak eritildi. Eriyen agaroz içerisine ethidium bromide (0.5 µg/ml) eklenerek karıştırıldı ve sıcaklığı biraz azalınca önceden tarakları yerleştirilmiş yatay DNA elektroforez cihazının kalıbına döküldü. Agar iyice katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı. Agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 0.5x TBE buffer konuldu.

Her bir amplikondan 10 µl alınarak 2 µl 6xLoading Dye solüsyonu ile karıştırıldı ve jel gözlerine yükleme yapıldı. Jeldeki birinci göze 3 µl DNA Marker (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus, Fermentas, Litvanya) konuldu. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda 90 voltta 2 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

2.2.4.1.4. Örneklerin Görüntülenmesi

Elektroforez sonuçları UV-transilluminator görüntüleme ünitesi kullanılarak (Gene Genius, Syngene, İngiltere) fotoğraflandı.

2.2.4.2. Deteksiyon limitinin Saptanması

Örnekler PCR yöntemiyle direkt olarak incelenmeden önce kontrol suş ile bakterinin deteksiyon limiti belirlendi. Primerlerin mililitrede 9 bakteri belirleyebilecek sensitivitede olduğu saptandı.

Örnekler laboratuvara ilk geldiğinde VIA agara ekim için alınan 100µl'den sonra kalan yaklaşık 800µl süspansiyonun tamamı direkt PCR yöntemiyle *S.maltophilia* yönünden incelendi (Whitby ve ark., 2000). Ayrıca konvansiyonel yöntemlerle cins ve tür düzeyinde identifiye edilen *S.maltophilia* suşları moleküler yöntemler kullanılarak doğrulandı. Bunun için uygulanan PCR yönteminde ekstraksiyon, amplifikasyon, elektroforez ve agaroz jel görüntüleme işlemleri gerçekleştirildi. Katı besiyerinden alınan koloniler steril FTS'de mililitrede 9×10^8 (McFarland 3 standardı) bakteri olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak ependorf tüplerde 5000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak pelet kısmı DNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

2.2.4.3. Klinik Örneklerden PCR

İçinde svab ve FTS bulunan tüpler iyice vortekslendikten sonra 200'er µl PCR yöntemi için alındı.

2.2.4.3.1. DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu için ticari bir kit olan Fermentas GeneJET Genomik DNA Purifikasyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi kit prosedürüne göre aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- Ependorflara konan 200 µl sıvı örnek üzerine, 400 µl Lizis Solüsyonu ile 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı.
- Hücrelerin tamamen lize olması için 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Bu süre sonunda, 200 µl %96'lık etanol eklendi ve vorteks yapıldı.

- Hazırlanan lizat, koleksiyon tüpü takılmış olan spin column tüpe aktarıldı.
- Spin column bulunan koleksiyon tüpü 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü takıldı.
- Önceden etanolle hazırlanan Wash Buffer I solüsyonundan 500 µl eklendi. 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki koleksiyon tüpü değiştirildi.
- Önceden etanolle hazırlanan Wash Buffer II solüsyonundan 500 µl eklendi. 12000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda koleksiyon tüpü atılarak, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü spin kolona takıldı.
- Son olarak, 200 µl Elution Buffer eklendi ve 2 dakika oda ısısında inkubasyonu takiben 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra spin column atılarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde DNA elde edildi.
- Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri amplifikasyon işlemi yapılincaya kadar -20 °C'de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

Amplifikasyon işlemi, elektroforez ve örneklerin görüntülenmesinde, kültürden PCR bölümündeki yöntemlerin aynıları kullanıldı.

2.2.4.3.2. Spesifite ve Sensitivite Belirlenmesi

Teşhiste kullanılan PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesini belirlemek için Altın Standart Test kullanıldı. PCR değerlendirilen test iken, genellikle konvansiyonel yöntemler standart test olarak baz alınır. Bu testin yapılışında kullanılan hesaplama oranlarıyla birlikte örnek çizelge aşağıda verildi (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Teşhisinde kullanılan PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesinde kullanılan örnek çizelge.

		Altın standart olarak belirlenen test		TOPLAM	
		Pozitif	Negatif		
Değerlendirilen test	Pozitif	Geçek Pozitif (A)	Yanlış Pozitif (B)	(A+B)	→ Yanlış Pozitif Oran $\frac{B}{B + D}$
	Negatif	Yanlış Negatif (C)	Gerçek Negatif (D)	(C+D)	→ Yanlış Negatif Oran $\frac{C}{A + C}$
TOPLAM		(A+C)	(B+D)		
		↓ Sensitivite $\frac{A}{A + C}$	↓ Spesifite $\frac{D}{B + D}$		

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Bu çalışmada Ankara, Yozgat ve Eskişehir illerinden toplanan 182 sığır, 120 koyun ve 60 at örneği *S.maltophilia* yönünden incelendi. İnceleme için sığır ve koyunların burun ve tırnak arasından, atların burunlarından alınan svab örnekleri kullanıldı. İzole edilen etkenlerin identifikasyonunda ve alınan örneklerden direkt teşhiste moleküler yöntemler kullanıldı. İncelenen toplam 362 materyalin 87 (%24)’sinden *S.maltophilia* izole edildi. Sığırlardan alınan 91’er burun ve tırnak arası svap örneğinden sırasıyla 22 (%24.1) ve 23 (%25.2); koyunlardan alınan 60’ar burun ve tırnak arası svap örneğinden sırasıyla 13 (%21.6) ve 10 (%16.6); atlardan alınan 60 adet burun svap örneğinden 19 (%31.6) *S.maltophilia* izole edildi (Çizelge 3.1). Sığır, koyun ve at örneklerinin ayrıntılı izolasyon oranları tablo 3.2, tablo 3.3 ve tablo 3.4’de verildi.

Çizelge 3.1. Sığır, koyun ve at örneklerinden elde edilen *S.maltophilia* izolasyon oranları, n, örnek sayısı.

Hayvan	Örnek	Pozitif	Negatif
Sığır	Burun (n:91)	22 (%24.1)	69 (%75.8)
	Tırnak (n:91)	23 (%25.2)	68 (%74.7)
Koyun	Burun (n:60)	13 (%21.6)	47 (%78.3)
	Tırnak (n:60)	10 (%16.6)	50 (%83.3)
At	Burun (n:60)	19 (%31.6)	41 (%68.3)
Toplam	Burun (n:211)	54 (25.5)	157 (%74.4)
	Tırnak (n:151)	33 (%21.8)	118 (%78.1)
	Tüm örnekler (n:362)	87 (%24)	275 (%75.9)

Selektif besiyerinde (VIA Agar) *S.maltophilia* şüpheli kolonilerden yapılan Gram boyama sonucunda Gram negatif çomaklar görüldü. İlk izolasyondan sonra VIA, Nutrient ve MacConkey Agar'lara pasajlanan kolonilerin görüntüleri şekil 3.1, 3.2, 3.3'de verildi.



Şekil 3.1. *S.maltophilia*'nın VIA agardaki görüntüsü



Şekil 3.2. *S.maltophilia*'nın Nutrient agardaki görüntüsü



Şekil 3.3. *S.maltophilia*'nın MacConkey agardaki görüntüsü

Tüm suşlar selektif besiyerinin rengini değiştirerek ve MacConkey agarda uçuk pembe koloni oluşturarak üredi. Hareket muayenesi, D-Fruktoz'lu O/F, eskülin, nitrat redüksiyon, DNase testleriyle, 42°C'de ve %5 NaCl'de üreme pozitif; oksidaz ve glikozlu O/F testleri negatif bulundu. DNase testinde gözlemlenen pozitif sonuçlara örnek şekil 3.4'de verildi.



Şekil 3.4. DNase pozitif *S.maltophilia* suşları

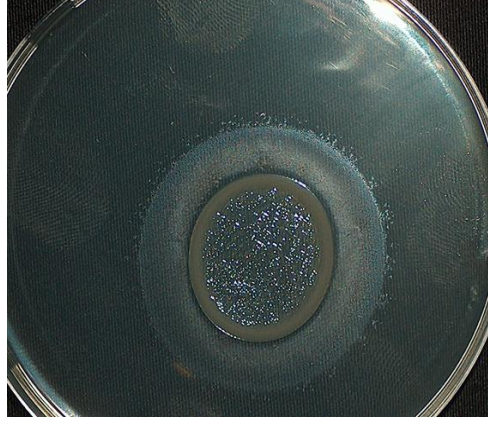
Bu çalışmada *S.maltophilia*'nın incelenen virülens özelliklerinden; kazein hidrolizi testinde 24 saatlik inkübasyon sonunda, Tween 80 hidroliz testinde ise, 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda tüm suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3.4 ve 3.5). Fosfolipaz C testinde 24-48 saat aralığında suşların %94.2'sinde yüzeyde beklenen pozitif sarımsı halka görünümü tespit edildi (Şekil 3.6). Kanlı agarda 24 saat sonra kolonilerin yoğun olduğu bölgelerde yeşilimsi renk değişikliği meydana geldi. Tüm suşlarda 48 saatten sonra, şekillenen yoğun kolonilerin çevresinde, şeffaflaşma gözlemlendi (Şekil 3.7). *S.maltophilia*'nın virülens özelliklerinin belirlenmesi için uygulanan testlerin sonuçları Çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. İdentifiye edilen *S.maltophilia* suşlarına ait virülens özellikleri

Uygulanan testler	Test edilen suş sayısı	Pozitiflik oranları
Proteaz (Kazein hidrolizi)	87	87 (%100)
Tween 80 hidrolizi	87	87 (%100)
Fosfolipaz C	87	82 (%94.2)
Hemoliz	87	87 (%100)
Sitotoksite	80	57 (%71.9)



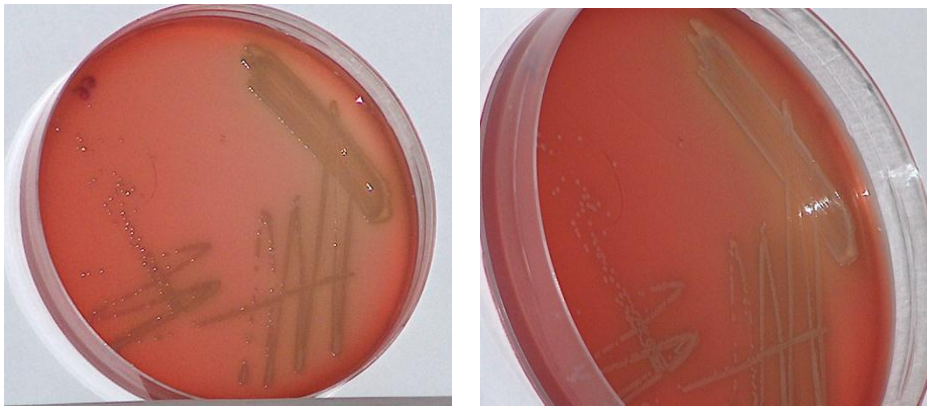
Şekil 3.5. Pozitif kazein hidrolizi testi sonucu



Şekil 3.6. *S.maltophilia*'nın Tween 80 hidrolizi



Şekil 3.7. Fosfolipaz C sentezinin görüntülenmesi
(besiyerinin üzerindeki sarımsı halka oluşumu pozitif)



Şekil 3.8. *S.maltophilia*'nın Kanlı agardaki hemolizine örnek

İncelenen tüm suşların kazein hidrolizi, Tween 80 hidrolizi ve hemoliz sonuçları pozitif bulunurken, fosfolipaz C ve sitotoksite sonuçları %100 pozitif bulunmadığı için, bu iki test sonuçları örneklenen bölge ve hayvan türüne göre karşılaştırıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *S.maltophilia* virülens özelliklerinden Fosfolipaz C ve sitotoksite oranlarının örneklenen bölge ve hayvan türlerine göre karşılaştırılması; n, örnek sayısı

Testler	Burun			Tırnak	
	Sığır (n:22)	Koyun (n:13 ve 9)	At (n:19)	Sığır (n:23)	Koyun (n:10 ve 7)
Fosfolipaz C	1 (%4,5)	2 (%15,3)	19 (%100)	1 (%4,3)	10 (%100)
Sitotoksite	18 (%81,8)	6 (%66,6)	12 (%63,1)	15 (%65,2)	6 (%85,7)

S.maltophilia'nın sitotoksitesinin belirlenmesi için 87 izolatin 80'i MDBK hücre kültüründe çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4'de verildi. Bu testte alınan sonuçlara göre bakterinin sitotoksitesi üç seviyede değerlendirildi. Düşük sitotoksik etki (+), yüzeydeki hücrelerin morfolojileri bozulmuş ancak monolayer tabaka korunmaktadır; orta derece sitotoksik etki (++), hücrelerin morfolojilerinin bozulması yanında, %40 - %60 oranlarında hücre dökülmesi meydana gelmiştir; yüksek sitotoksik etki (+++), monolayer tabaka tamamen bozulmuştur. Sitotoksite gözlenmeyen suşlar (-) olarak değerlendirildi. Değerlendirilemeyen 7 suşun bulunduğu hane (X) şeklinde gösterildi.

Çizelge 3.4. *S. maltophilia* suşlarının sitotoksik etki dereceleri

Suş no	Etki derecesi	Suş no	Etki derecesi	Suş no	Etki derecesi	Suş no	Etki derecesi
SB 1	+	ST 1	-	KB 1	-	A 1	+
SB 2	++	ST 2	-	KB 2	-	A 2	+
SB 3	++	ST 3	+++	KB 3	+++	A 3	-
SB 4	++	ST 4	-	KB 4	-	A 4	-
SB 5	+	ST 5	-	KB 5	++	A 5	-
SB 6	++	ST 6	++	KB 6	+++	A 6	+
SB 7	++	ST 7	+	KB 7	+	A 7	+
SB 8	+	ST 8	+++	KB 8	+	A 8	++
SB 9	+	ST 9	+++	KB 9	+	A 9	-
SB 10	+	ST 10	+	KB 10	X	A 10	+
SB 11	-	ST 11	++	KB 11	X	A 11	+
SB 12	+++	ST 12	++	KB 12	X	A 12	+
SB 13	+	ST 13	-	KB 13	X	A 13	+
SB 14	+	ST 14	-	KT 1	-	A 14	+
SB 15	+++	ST 15	++	KT 2	+	A 15	-
SB 16	+++	ST 16	-	KT 3	+	A 16	-
SB 17	-	ST 17	++	KT 4	++	A 17	-
SB 18	++	ST 18	+++	KT 5	+++	A 18	++
SB 19	+++	ST 19	-	KT 6	+	A 19	++
SB 20	++	ST 20	++	KT 7	++	+ K	+
SB 21	-	ST 21	+	KT 8	X		
SB 22	-	ST 22	+	KT 9	X		
		ST 23	+	KT 10	X		

SB, sığır burun; ST, sığır tırnak; KB, koyun burun; KT, koyun tırnak; A, at burun.

X, test yapılmayan izolat

Tüm sığır, koyun ve at suşları, siprofloksasin, enrofloksasin, sulfametoksazol/trimetoprim, ofloksasin ve azitromisine duyarlı; linkomisin/spektinomisin, tilosin, seftifur ve imipeneme karşı dirençli bulundu. Tüm sığır suşları amoksisilin/klavulanik asite dirençli iken koyun ve at suşları sırasıyla %78.2 ve %89.4 dirençli bulundu. Tüm koyun suşları gentamisine duyarlı iken sığır ve at suşları sırasıyla %33.3 ve %10.5 dirençli bulundu. Tüm sığır ve koyun suşları tilmikosine duyarlı iken at suşları %5.2 dirençli olduğu saptandı. Benzer olarak tüm koyun ve at suşları kloramfenikole duyarlı iken sığır suşları %4.4 dirençli bulundu. Sığır, koyun ve at suşlarının, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve seftazidime direnç yüzdeleri sırasıyla %60, %43.4, %47.3; %53.3, %47.8, %36.8; %62.2, %39.1, %26.3 olarak belirlendi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. *S.maltophilia* izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık test sonuçları; n, örnek sayısı; S, duyarlı; I, orta derece duyarlı; R, dirençli

Antibiyotik etken maddeleri	Sığır (n:45)			Koyun (n:23)			At (n:19)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Siprofloksasin	-	-	45	-	-	23	-	-	19
Enrofloksasin	-	-	45	-	-	23	-	-	19
Gentamisin	15	5	25	-	-	23	2	2	15
Tetrasiklin	27	4	14	10	2	11	9	2	8
Oksitetrasiklin	24	4	17	11	-	12	7	1	11
Sulfametoksazol/trimetoprim	-	-	45	-	-	23	-	-	19
Amoksisilin/klavulanik asit	45	-	-	18	-	5	17	-	2
Linkomisin/spektinomisin	45	-	-	23	-	-	19	-	-
Tilosin	45	-	-	23	-	-	19	-	-
Seftifur	45	-	-	23	-	-	19	-	-
Ofloksasin	-	-	45	-	-	23	-	-	19
Tilmikotin	-	-	45	-	-	23	1	-	18
Kloramfenikol	2	-	43	-	-	23	-	-	19
Seftazidime	28	-	17	9	-	14	5	-	14
Azitromisin	-	-	45	-	-	23	-	-	19
İmipenem	45	-	-	23	-	-	19	-	-

Solunum sistemi infeksiyonu tanısı konan 5 sığır ile ilgili bilgiler aşağıda sunulmuştur. 6 aylıktan 2 yaşa kadar olan bu 5 sığırdaki yüksek ateş, öksürük, iştahsızlık, kambur duruş gibi klinik belirtiler görülmüştür. Hayvanlara antibiyotik tedavisi uygulanmış ancak klinik belirtilerde düzelme olmamıştır. Bu hayvanlardan alınan örneklerden *S.maltophilia* üredi. İzole edilen suşlar sahada kullanılan antibiyotiklere dirençli bulundu (Çizelge 3.6).

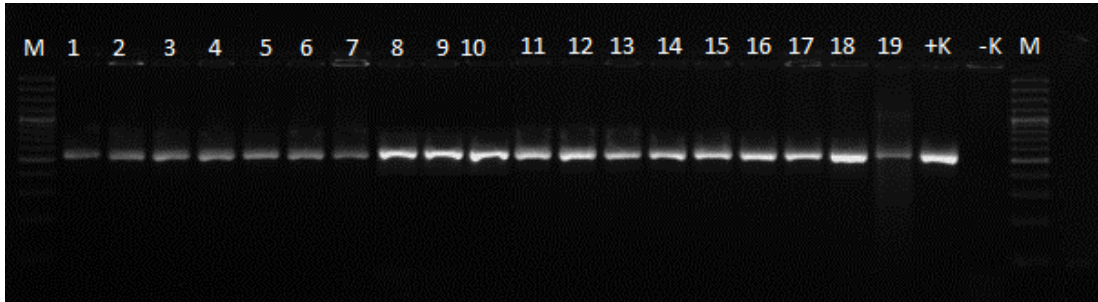
Çizelge 3.6. Solunum sistemi infeksiyonu tanısı konan 5 sığırdan izole edilen *S.maltophilia* virülens özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları

Solunum sistemi infeksiyonu tanısı konan hayvanlar ve yaşları (Çizelge 3.4'deki kodlar)		1 6 aylık (SB3)	2 10 aylık (SB16)	3 15 aylık (SB7)	4 1 yaşında (SB 20)	5 2 yaşında (SB 19)
İzolat		<i>S.maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i>	<i>S.maltophilia</i>
Virülens özellikleri	Hemoliz	+	+	+	+	+
	Kazein hidrolizi	+	+	+	+	+
	Tween 80 hidrolizi	+	+	+	+	+
	Fosfolipaz C	+	+	+	+	+
	Sitotoksite	++	+++	++	++	+++
Sahada kullanılan antibiyotikler	Gentamisin	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
	Oksitetrasiklin	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
	Amoksasilin / klavulanik asit	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
	Tilosin	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
	Seftifur	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
	Enrofloksasin	X	Duyarlı	Duyarlı	X	X
Antibiyogram sonucuna göre önerilen antibiyotikler	Siprofloksasin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	Sulfametoksazol/ trimetoprim	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	Tilmikosin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	Enrofloksasin	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı

3.2. Moleküler Tanı

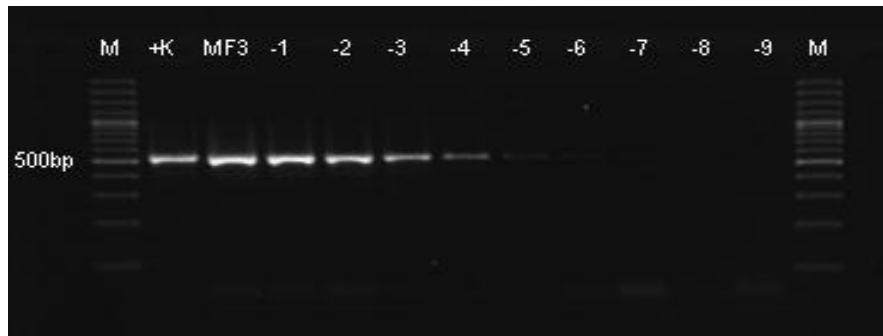
İzolasyon oranları PCR yöntemiyle doğrulandı. İzole edilen at suşlarının sonuçları şekil 3.9’de gösterildi.

Şekil 3.9. At izolatlarından yapılan PCR sonuçları; M, 100 bp marker; +K, pozitif kontrol; -K, negatif kontrol; 1-19, pozitif sonuçlar (531 bp).



Klinik örneklerden direkt tanı amacıyla yapılan PCR sonuçlarında, sığır burun ve tırnak arasında %32.9 ve %41.7; koyun burun ve tırnak arasında %41.6 ve %48.3; atların burunlarından %61.6 oranlarında pozitiflik saptandı. Deteksiyon limitinin saptanması için yapılan çalışmalarda, PCR protokolünde ml’de 9 bakteriyi saptadığı belirlendi (şekil 3.10).

Şekil 3.10. *S.maltophilia* primerlerinin deteksiyon limiti; M, 100 bp marker; +K, pozitif kontrol; MF3, Mc Farland No:3; -1,-9 arası 10 katlı dilüsyon oranları



Konvansiyonel yöntem ve PCR bulgularının pozitiflik oranlarının karşılaştırılması çizelge 3.7 ve 3.8’de verildi.

Çizelge 3.7. Konvansiyonel yöntem ve PCR bulgularının karşılaştırmalı sonuçları; n, örnek sayısı

	Kültür	PCR
Burun (n:211)	54 (% 25.5)	92 (% 43.6)
Tırnak (n:151)	33 (% 21.8)	67 (% 44.3)

Çizelge 3.8. Konvansiyonel yöntem ve PCR bulgularının örneklenen bölge ve hayvan türüne göre karşılaştırması; n,örnek sayısı

Hayvan türü	Sığır (n:91)		Koyun (n:60)		At (n:60)
Örnek	Burun	Tırnak	Burun	Tırnak	Burun
Kültür	22 (% 24.1)	23 (% 25.2)	13 (% 21.6)	10 (% 16.6)	19 (% 31.6)
PCR	30 (% 32.9)	38 (%41.7)	25 (%41.6)	29 (%48.3)	37 (% 61.6)

Çalışılan 362 örneğin teşhisinde kullanılan PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan altın standart testine göre; PCR'ın kültüre göre sensitivitesi %100; PCR'ın kültüre göre spesifitesi %73.8 olarak belirlendi. Sonuçlar çizelge 3.9'de verildi.

Çizelge 3.9. PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan altın standart test sonuçları, n, örnek sayısı

		Kültür		
		+	-	
PCR	+	87	72	159
	-	0	203	203
		87	275	n: 362

TARTIŞMA

Stenotrophomonas maltophilia çevrede yaygın olarak bulunan fırsatçı bir patojendir. Su, toprak özellikle de bitki kökleri *S.maltophilia*'nın yoğun olarak bulunduğu yaşam alanlarıdır. Son yıllarda da hastane kaynaklı infeksiyonlardan yüksek oranda izole edilmesiyle önem kazanmıştır. Aslında düşük virülense sahip bir patojen olmasına rağmen biyofilm oluşturma yeteneği, çoklu ilaç direnci olması ve ortamda yüksek düzeyde bulunabilmesi nedeniyle immun sistemi zayıflamış (kistik fibrozisli, yoğun bakım ünitelerinde kalan, kemoterapi gören, yoğun antibiyotik tedavisi gören vb.) hastalarda çok çeşitli infeksiyonlardan izole edilebilmekte, bu infeksiyonlara neden olabilmekte veya prognozları kötüleştirebilmektedir. Hastanelerde solunum, üriner, sentral sinir, iskelet kas, mide bağırsak sistemi, bakteriyemi, endokardit, göz, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilmesi yanında *S.maltophilia* bakteriyemi, pneumoni, meningitis, yumuşak doku infeksiyonları gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Ayrıca tüm dünyada gün geçtikçe gerek izolasyon gerekse infeksiyon nedeni olarak görülme sıklığı artmaktadır.

Önceki yıllarda *S.maltophilia* veteriner hekimliğinde genellikle primer patojen olarak değerlendirilmese de günümüzde doğal çevrede bulunması ve antibiyotiklere dirençli olması sonucu neden olduğu sekonder veya primer infeksiyonlarla önem kazanmıştır. *S.maltophilia*, çiğ süt, donmuş balık, tavşan dışkısı, kertenkele, kurbağa ve laboratuvar hayvanlarının mide-bağırsak kanalından izole edilmiştir. Türkiye’de hayvancılıkta *S.maltophilia* hala göz ardı edilmekte ve primer patojen olarak değerlendirilmemektedir. Ancak dünyada, çeşitli egzotik ve evcil hayvanların infekte yaralarından, kronik solunum yolu infeksiyonlarından, lenfadenitis, artritis, pneumoni, sepsis gibi olgulardan izole edilmiştir. Ayrıca *S.maltophilia*'nın, sıvı nitrojen tanklarında saklanan sperma ve embriyo örneklerindeki mikrobiyal kontaminasyonda en çok identifiye edilen bakteri olduğu ve fertilizasyonu, embriyonik gelişimi baskıladığı çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir.

Türkiye’de veteriner hekimliği alanında *S.maltophilia* hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Türkiye’de ilk kez sığır, koyun ve atlarda, *S.maltophilia* görülme sıklığının konvansiyonel ve moleküler tekniklerle saptanması,

izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının ve virulens özelliklerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Dünyada *S.maltophilia*'nın konvansiyonel izolasyonu için geliştirilmiş birçok selektif besiyeri vardır. Juhnke ve Des Jardin (1989), *S.maltophilia*'yı diğer *Pseudomonas* türlerinden ayıracak XMSM (*Xanthomonas maltophilia* Selective Medium) adını verdikleri selektif bir besiyeri geliştirmişlerdir. Ancak bu besiyerinde, temel girdiler yanında, siklohekzimid (100 µg/ml), nistatin (50 µg/ml), sephaleksim (50 µg/ml), basitrasim (25 µg/ml), penisilin G (25 µg/ml), novobiyosin (10 µg/ml), neomisin sülfat (30 µg/ml) ve tobramisin (1 µg/ml) gibi birçok maddenin kullanılması bu besiyerinin hazırlanmasını zorlaştırmaktadır. Bollet ve ark. (1995), *S.maltophilia*'nın doğal imipenemaz üretme özelliğine dayanan başka bir yöntem kullanmıştır. Bu yöntemde, katı besiyerine yayma yoluyla yapılan ekimden sonra 10 µg imipenem diski yerleştirmişler ve disklerin çevresindeki inhibisyon alanında gözlenen küçük kolonilerin *S.maltophilia* olduğunu saptamışlardır. Ancak bu yöntem de yeteri kadar seçici değildir. Bu eksikliği Kerr ve ark. (1996), *S.maltophilia* için geliştirdikleri selektif differensiyel besiyeri ile gidermişlerdir. Bu besiyerine indikatör sistem olan mannitol-bromtimol mavisine selektif ajan olarak vankomisin, imipenem ve amfoterisin B (VIA agar) eklemişlerdir. Bu besiyerini XMSM ile karşılaştırmışlar ve VIA agarın *S.maltophilia* üzerinde daha az inhibitör etkisi olduğunu ve XMSM'den daha selektif olduğunu saptamışlardır. VIA agarda vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* üreyebileceğini ancak mannitol fermentasyonundan dolayı *S.maltophilia*'dan kolayca ayırt edilebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları denemelerde amfoterisin B yerine nistatin (VIN agar) veya siklohekzimid (VIC agar) de kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Gerçekten de VIA Agar'ın selektivitesi bu bakteri için geliştirilen veya denenilen diğer besiyerleri ile karşılaştırıldığında daha üstün olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada hem besiyerinin kolay hazırlanır olması hem de ilk denemelerde, 18-24 saat içinde *S.maltophilia* şüpheli kolonilerinin net bir şekilde gözlenmesi ile konvansiyonel teşhiste, Kerr ve ark. (1996), geliştirdikleri selektif differensiyel besiyeri olan VIA Agar kullanıldı. Albini ve ark. (2009) da aynı besiyerini kullanarak *S.maltophilia*'yı ilk defa at patojeni olarak bildirmişlerdir.

Araştırmalarında, toplam 120 trakeo-bronşiyal, 7 bronşiyal-alveoler yıkantı ve 117 burun svab örneğinden 3 adet (%2.3) *S.maltophilia* izole etmişlerdir. Winther ve ark. (2010), aynı besiyerini kullanarak, kronik öksürüğü olan ve daha önce SXT veya penisilin tedavisi görmüş 7 atın trakeal yıkantı örneğinin 7'sinden (%100) *S.maltophilia* izole etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, atların burun svablarından elde edilen izolasyon oranları (%31.6), Albini ve ark. (2009)'nın bulgularından yüksektir. Bunun nedenleri arasında, Albini ve ark. (2009), birbiriyle bağlantısı olmayan, farklı yerlerden hastaneye gelen hayvanlardan örnekleme yaparken, bu çalışmada at örneklerinin aynı bölgedeki 4 ayrı çiftlikten alınması ve her bir çiftlikteki atların birbirleriyle temas halinde bulunması olabilir. Ayrıca bir diğer neden de biyogüvenlik kurallarına çiftlik ortamına göre hastane ortamında daha titizlikle uyulması ve bulaşmanın önlenmesi olabilir. Ayrıca çevresel hava sıcaklığı *S.maltophilia*'nın en yoğun üreme gösterdiği 15-30°C civarlarında olması kontaminasyon ve yayılımı arttırmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Sığır ve koyunlarda *S.maltophilia* izolasyonu için bu tez çalışmasında kullanılan örnekler ile paralellik gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. London ve ark. (1984) koyunların yününden, Bielanski ve ark. (2003) sıvı nitrojen tanklarındaki sığır embriyo ve spermasından *S.maltophilia* izolasyonunu araştırmışlardır. Bu tez çalışmasında sığır ve koyunların tırnak arası svab örneklerinden izole edilen *S.maltophilia* oranlarıyla (%25.2 ve %16.6) çevresel kontaminasyon bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte alınan burun svab örneklerindeki oranlar (%24.1 ve %21.6) bakterinin çevrede bulunma oranlarıyla uyum göstermektedir. Bu sonuçlara göre bakterinin üst solunum yollarından izole edilmesi, etkenin çevresel kontaminant olarak bulunduğu fikrini destekler niteliktedir. Bu yorumu at svap örneklerinden elde edilen veriler ile desteklemek de mümkündür. Buna örnek olarak, temizliğine daha çok dikkat edilen ve sadece gebe kısırakların bulunduğu bir çiftlikten alınan svap örneklerinden *S.maltophilia*'nın izole edilememesi verilebilir.

Aynı hayvanın tırnak arasından izole edilip burun svabından izole edilememesi *S.maltophilia*'nın normal koşullarda immün sistem tarafından baskılandığı ya da henüz bulaşma meydana gelmediği sonucunu çıkarır. Bununla birlikte solunum sistemi enfeksiyonu olan hayvanların tırnak arasından etken izole edilemediği halde burun svabından izole edilebilmiştir. Bu durum immünsupresyon

durumunda solunum sisteminde *S.maltophilia*'nın kolayca çoğalabildiğini göstermektedir. Ayrıca birçok antibiyotik grubunun uygulanmasına rağmen hayvanlardaki solunum sistemi infeksiyonunun önüne geçilememesi de *S.maltophilia*'nın infeksiyona katıldığı yorumunu da getirmektedir.

Örneklerden VIA Agar'da şekillenen şüpheli kolonilerden yapılan biyokimyasal testler bakterinin *S.maltophilia* olduğunu doğrulamıştır. Biyokimyasal testlerin yanında *S.maltophilia*'yı diğer *Stenotrophomonas* türlerinden ayırmak için kullanılan diğer bazı testler Coenye ve ark. (2004) ile Wolf ve ark.'nın (2002) araştırmalarıyla paralellik göstermiştir.

Virülens özellikleri yönünden izole edilen 87 *S.maltophilia* suşunun tamamı proteaz, Tween 80 hidrolizi ve hemoliz yönünden pozitif bulunurken, fosfolipaz C %94.2, sitotoksite %71.9 pozitif bulundu.

S.maltophilia için kullanılacak antibiyotik duyarlılık testinin seçiminde araştırmacılar farklı fikirler öne sürmektedirler. Pankuch ve ark. (1994), disk difüzyon yönteminde, ilk 24 saat ile 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda elde edilen bölge çaplarının farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durumun kinolon grubu antibiyotikler içerisinde, özellikle de siprofloksasinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Barry ve ark., 1985; Pankuch ve ark., 1994; Ringertz ve ark., 1989). Ancak Arpi ve ark. (1996), 124 *S.maltophilia* klinik izolatının siprofloksasine duyarlılığının ölçülmesinde disk difüzyonunun, E-test ve agar dilüsyon yöntemleri kadar güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında sığır, koyun ve at izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre; sığır suşları Siprofloksasin, Enrofloksasin, Sulfametoksazol/Trimetoprim, Ofloksasin, Tilmikosin ve Azitromisin; koyun suşları Siprofloksasin, Enrofloksasin, Gentamisin, Sulfametoksazol/Trimetoprim, Ofloksasin, Tilmikosin, Kloramfenikol ve Azitromisin preparatlarına karşı duyarlı bulundu. Son yıllarda bazı *S.maltophilia* insan izolatlarının Siprofloksasin, Sulfametoksazol/Trimetoprim ve Ofloksasin'e karşı direnç gözlemlendiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu durum insanların yanlış antibiyotik kullanımından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte hayvan yetiştiriciliğinde uygulanan kör tedavi nedeniyle *S.maltophilia* hayvan izolatlarının da yakın zamanda duyarlı olduğu preparatlara direnç geliştirmesi söz konusu olabilir. Keza Kloramfenikol ve

Gentamisin'e karşı sığır izolatlarında direnç geliştiği bu çalışmada saptandı. At izolatları Siprofloksasin, Enrofloksasin, Sulfametoksazol/Trimetoprim, Ofloksasin, Kloramfenikol, Azitromisin preparatlarına karşı duyarlı bulundu. Elde edilen sonuçlar Albini ve ark. (2009) ve Winther ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmalar ile paralellik gösterdi.

Hastane infeksiyonu olarak önem kazanması ile moleküler metotlarla *S.maltophilia*'nın çeşitli klinik ve çevresel örneklerden direkt olarak tespiti ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Hatta bakterinin direkt tespiti yanında tiplendirme, sekanslama (Da Silva Filho ve ark., 2004), direnç genlerinin saptanması, faj çalışmaları vb. birçok araştırma yapılmıştır. Türkiye'de de tıp hekimliğinde son yıllarda birçok çalışma yapılmış olsa da veteriner hekimlikte henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada *S.maltophilia*'nın direkt moleküler teşhisi için Whitby ve ark. (2000)'nin geliştirdiği primerler (SM1 ve SM4), BLAST programında yapılan *in siliko* analizlerinde yüksek spesifitede bulunduğu için seçildi. Da Silva Filho ve ark. (2004), kraşe ve orofarengeal svab örneklerine uyguladıkları multipleks PCR metodunda *S.maltophilia* için 16S rDNA primerleri (Malt1 ve Malt2) kullanmışlar. Aynı zamanda multipleks PCR ve kültür sonuçlarını SM1 ve SM4 primerleriyle de doğrulamasını yapmışlardır. Araştırmacıların, aldıkları karşılaştırılmalı sonuçlara göre 5 örnekten *S.maltophilia* izole edilemeyip her iki PCR metodunda da pozitiflik saptamışlardır. Ayrıca SM1 ve SM4 primerlerinin daha spesifik olduğunu belirlemişlerdir. Giordano ve ark. (2006), *S.maltophilia* identifikasyonunda ticari biyokimyasal sistemleri karşılaştırırken çalışmalarında kullandıkları izolatların doğrulamasında SM1 ve SM4 primerleriyle PCR metodunu uygulamışlardır. Çalıştıkları 100 suşun tamamında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Albini ve ark. (2009), 244 atın solunum sistemine ait çeşitli klinik örneklerinden 3 adet *S.maltophilia* izole etmiş ve konvansiyonel identifikasyonu, aynı primerleri kullandıkları moleküler yöntemle desteklemişlerdir. Bu çalışmada da tüm örneklerden elde edilen izolasyon oranları PCR yöntemiyle doğrulandı. İzolatlardan alınan pozitif sonuçlar yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik gösterdi. Ancak aynı klinik örneklerden yapılan direkt PCR sonuçlarında izolasyon oranlarının üzerinde pozitiflik saptandı. Primerlerin spesifitesi yüksek olduğu için moleküler

yöntemlerle saptanan teşhis oranının konvansiyonel yöntemlere göre fazla olması diğer çalışmalarda da gözlenmiş ancak bu çalışmada oranlar daha da yüksek bulunmuştur. Bunun nedenlerinden biri, bakteriyolojik ekimlerin en geç birkaç saat içinde uygulanması, ekstraksiyonun ise birkaç gün içinde yapılabilmesi olabilir. Her ne kadar svablar FTS içinde ve soğuk zincirde saklansa da *S.maltophilia*'nın FTS içinde ve düşük derecelerde üreyebilmesi PCR pozitif sonuçlarını yükseltmiş olabilir. Aynı zamanda PCR sonucu pozitif olup besiyerinde üremeyen suşların, bu çalışmada kullanılan selektif besiyerine eklenen meropenem'e düşük de olsa duyarlılıkları olabilir.

Bu çalışmada, sığır ve koyunların burun ve tırnak arası ile atların burun svab örneklerinden *S.maltophilia*'nın saptanmasında konvansiyonel ve PCR olmak üzere iki farklı yöntem kullanılırken aynı zamanda PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesi de belirlendi. Buna göre, PCR'ın kültüre göre sensitivitesi %100, spesifitesi %73.8 olarak belirlendi. İlk olarak Karpati ve Jonasson (1996), kistik fibrozisli hastaların kışelerinden *S.maltophilia* dahil 3 bakteri de PCR yönteminin spesifite ve sensitivitesini belirlemiş ve *S.maltophilia* için PCR'ın düşük sensitiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ancak Whitby ve ark. (2000), geliştirdikleri primerlerle (SM1 ve SM4), kistik fibrozisli hastaların kışelerinden *S.maltophilia* teşhisinde PCR'ın spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da Whitby ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri primerler kullanıldı ve paralel sonuçlar alındı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığır, koyun ve atların üst solunum yollarında ve bulundukları çevrede *S.maltophilia* izolasyonu ve identifikasyonu, antibiyotik duyarlılığı ve moleküler teşhisi amacıyla yapılan bu çalışmada, Türkiye’de hayvansal orijinli *S.maltophilia* varlığı ilk kez saptandı. Bu çalışma *S.maltophilia*’nın primer veya sekonder patojen olarak Türkiye’de hayvanlarda görülen özellikle solunum sistemi infeksiyonlarından sıkça izole edilebileceğini gösterdi. Özellikle de sahada uygulanan ve tedaviye cevap vermeyen solunum sistemi olgularının bir kısmının *S.maltophilia* kaynaklı olabileceği düşünüldü. Bu konuda henüz ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır ve araştırılmaya açıktır.

Teşhiste, selektif besiyeri, ticari biyokimyasal test kitlerinin ve spesifik primerlerinin bulunması dolayısıyla kontaminasyon riskinin pek bulunmadığı gözlemlendi. Nazlı üreyen bir bakteri olmadığı için teşhisinin kolaylıkla yapılabileceği ancak teşhisi yanılmaması için örneklerin en kısa zamanda işlenmesi gerektiği belirlendi.

Moleküler yöntemlerin daha hızlı, izolasyona gerek duyulmadan direkt klinik örneklerle uygulanabilmesi ve daha net sonuçlar vermesi nedeniyle konvansiyonel yöntemlere göre tercih edilebileceği belirlendi.

Türkiye’de hayvancılıkta yapılabilecek epidemiyolojik çalışmalarla bakterinin neden olduğu infeksiyon sıklığı veya klinik çalışmalarla bakterinin neden olduğu veya izole edildiği infeksiyonlardaki patobiyojinin ortaya çıkarılması yarar sağlayacaktır.

Ayrıca Türkiye’de son yıllarda hastane infeksiyonu olarak sıklıkla ortaya çıkmasında çevresel ve hayvansal etkiler araştırılmaya açıktır. Dünya’da *S.maltophilia* fajları ile ilgili araştırmalar yapılmakta ve bakterinin yüksek direnç mekanizmasına sahip olması nedeniyle hastanelerde faj tedavileri denenmektedir. Bu gelişmeler Türkiye’de hayvancılıkta da takip edilmelidir.

ÖZET

Hayvanlar ve Çevrelerinden *Stenotrophomonas maltophilia* İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, *Stenotrophomonas maltophilia*'nın sığır, koyun ve atların burunlarında ve çevrelerindeki sıklığı incelendi. Bu amaçla İç Anadolu Bölgesindeki 5 merkezden 60 at burun örneği, 182 sığır ve 120 koyunun burun ve tırnak arası örnekleri eşit sayıda toplandı. *S.maltophilia* izolasyonu için örneklerden selektif besiyeri olan VIA Agar'a ekimler yapıldı. Örnekler ayrıca direkt teşhis için PCR ile incelendi. Suşların antibiyotik duyarlılıkları Muller Hinton Agar'da disk difüzyon yöntemi ile incelendi.

İncelenen toplam 362 örneğin 87 (%24)'sinden *S.maltophilia* izole edildi. Sığırlardan alınan 91'er burun ve tırnak arası örneğinden sırasıyla 22 (%24.1) ve 23 (%25.2); koyunlardan alınan 60'ar burun ve tırnak arası örneğinden sırasıyla 13 (%21.6) ve 10 (%16.6); atlardan alınan 60 burun örneğinden 19 (%31.6) *S.maltophilia* izole edildi. Örnekler direkt olarak uygulanan PCR yönteminde 362 örneğin 159 (%43.9)'unda pozitiflik saptandı. *S.maltophilia*'nın tüm izolatları; virülens faktörleri yönünden proteaz, Tween 80 hidrolizi ve hemoliz testlerinde pozitif iken fosfolipaz C testinde % 94.2 oranında pozitif bulundu. Sitotoksitesi incelenen 80 izolatın 28 (%35)'inde düşük, 19 (%23.7)'unda orta derece ve 11 (%13.7)'inde yüksek sitotoksik etki görüldü. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları agar disk difüzyon yöntemi ile incelendi. Tüm sığır, koyun ve at suşları, siprofloksasin, enrofloksasin, sulfametoksazol/trimetoprim, ofloksasin ve azitromisin'e duyarlı; linkomisin/spektinomisin, tilosin, seftifur ve imipenem'e karşı dirençli bulundu. Tüm sığır suşları amoksisilin/klavulanik asit'e dirençli iken koyun ve at suşları sırasıyla %78.2 ve %89.4 dirençli bulundu. Tüm koyun suşları gentamisin'e duyarlı iken sığır ve at suşları sırasıyla %33.3 ve %10.5 dirençli bulundu. Tüm sığır ve koyun suşları tilmikosin'e duyarlı iken at suşları %5.2 dirençli olduğu saptandı. Benzer olarak tüm koyun ve at suşları kloramfenikol'e duyarlı iken sığır suşları %4.4 dirençli bulundu. Sığır, koyun ve at suşlarının, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve seftazidime direnç yüzdeleri sırasıyla %60, %43.4, %47.3; %53.3, %47.8, %36.8; %62.2, %39.1, %26.3 olarak belirlendi.

Bu sonuçlar, *S.maltophilia*'nın hayvanların burunlarında ve çevrelerinde yaygın olarak bulunduğunu gösterdi. Suşların antibiyotik dirençliliklerinin literatürlerde bildirilen insan suşlarına göre daha az olduğu belirlendi. *S.maltophilia* teşhisinde PCR yönteminin kültüre göre daha hassas olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: At, burun, koyun, sığır, *Stenotrophomonas maltophilia*.

SUMMARY

Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* from Animals and their Environment

The prevalence of *Stenotrophomonas maltophilia* in the nose and the environment of cattle, sheep and horses was investigated in this study. For this purpose, equal number of nose and interhoof samples from 182 cattle and 120 sheep and 60 nose samples from horses were collected in Central Anatolian region. The samples were cultured on selective VIA agar for the isolation of *S.maltophilia*. Samples were also examined by PCR for direct detection of organism. Antibiotic susceptibility of isolates were examined by disc diffusion method in Muller Hinton agar.

S.maltophilia was isolated from 87 (24%) of 362 samples examined. Each 91 samples taken from cattle nose and interhoof, *S.maltophilia* was isolated from 22 (24.1%) and 23 (25.2%) samples, respectively. Similarly, each 60 samples taken from sheep nose and interhoof, *S.maltophilia* was isolated from 13 (21.6%) and 10 (16,6%) samples, respectively. *S.maltophilia* was isolated from 19 (31.6%) of 60 equine nose samples. Of 362 samples examined by PCR for direct detection of organism, 159 (43.9%) were positive. All isolates of *S.maltophilia* were positive in protease, Tween 80 hydrolysis, and hemolysis tests, while 94.2% was positive in phospholipase C test. Cytotoxic activity of 80 isolates was examined in MDBK cell culture, and the cytotoxic effect was found in 28 (35%) isolates as low, in 19 (23.7%) isolates as medium and in 11 (13.7%) isolates as high. Antibiotic susceptibilities of isolates were examined by agar disk diffusion method. All cattle, sheep and horse isolates were sensitive to ciprofloxacin, enrofloxacin, sulfametoazole/trimetoprim, ofloxacin and azithromycin; and resistant to lincomycin/spectinomycin, tylocin, ceftiofur and imipenem. While all cattle strains were resistant to amoxacylin/clavulanic acid, 78.2% and 89.4% of sheep and horse isolates were found to be resistant, respectively. None of sheep strains, but 33.3% and 10.5% of cattle and horse strains were resistant to gentamicin, respectively. In all isolates, tilmicocin resistance was found only in 5.2% of horse isolates and chloramphenicol resistance was found only in 4.4% of cattle isolates. Resistance to tetracycline, oxytetracycline and ceftazidime were determined respectively in 60%, 43.4%, 47.3% in cattle isolates; 53.3%, 47.8%, 36.8% in sheep isolates; 62.2%, 39.1%, 26.3% in horse isolates.

These results suggested that *S.maltophilia* is a common inhabitant of animal nose and their environment. It was also suggested that the animal strains were less resistant to antibiotics when compared to the proclaimed resistance of humanbeings in literature. It was also observed that the PCR was more sensitive when compared with culture in direct detection *S.maltophilia*.

Key Words: Cattle, horse, nose, sheep, *Stenotrophomonas maltophilia*.

KAYNAKLAR

- ABUSSAUD, M., MAHAWREH, B. (1994). *Pseudomonas* flora of citrus—plant nurseries in the Jordan valley. *Pak J Bot.* **26**: 235-240.
- AISENBERG, G., ROLSTON, K. V., DICKEY, B. F., KONTOYIANNIS, D. P., RAAD, I. I., SAFDAR, A. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia in cancer patients without traditional risk factors for infection, 1997–2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **26**: 13-20.
- ALBINI, S., ABRIL, C., FRANCHINI, M., HUSSY, D., FILIOUSSIS, G. (2009). *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the airways of animals with chronic respiratory disease. *Schweiz Arch Tierheilk.* **151**: 323-28.
- AL-JASSER, A. M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim – sulfamethoxazole: an increasing problem. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **5**: 23.
- ALONSO, A., MARTINEZ, J. L. (2000). Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 3079-3086.
- ALONSO, A., MARTINEZ, J. L. (2001). Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 1879-1881.
- ALTHOUSE, G. C., LU, K. G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology.* **63**: 573-584.
- ANDREEVA, N. B., SOROKINA, T. A., KHMEL, I. A. (1996). Chitinolytic activity of pigmented *Pseudomonas* and *Xanthomonas* bacteria. *Microbios.* **87**: 53-57.
- ARELLA, M., SYLVESTRE, M. (1979). Production of an extracellular ribonuclease by *Pseudomonas maltophilia*. *Can J Microbiol.* **25**: 321-328.
- ARPI, M., VICTOR, M. A., MORTENSEN, I., GOTTSCHAU, A., BRUUN, B. (1996). In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. *APMIS.* **104**: 108-114.
- ASSIH, E. A., OUATTARA, A. S., THIERRY, S., CAYOL, J. L., LABAT, M., MACARIE, H. (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 559-568.
- AVISON, M. B., HIGGINS, C. S., FORD, P. J., VON HELDREICH, C. J., WALSH, T. R., BENNETT, P. M. (2002). Differential regulation of L1 and L2

β -lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrobial Chem.* **49**: 387-389.

BABALOVA, M., BLAHOVA, J., LESICKA-HUPKOVA, M., KRCMERY, V., KUBONOVA, K. (1995). Transfer of ceftazidime and aztreonam resistance from nosocomial strains of *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* to a recipient strain of *Pseudomonas aeruginosa* ML-1008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **14**: 925-927.

BARBOLLA, R., CATALANO, M., ORMAN, B. E., FAMIGLIETTI, A., VAY, C., SMAYEVSKY, J., CENTRON, D., PINEIRO, S. A. (2004). Class 1 integrons increase trimethoprim – sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 666-669.

BARRY, A. L., FASS, R. J., ANHALT, J. P., NEU, H. C., THORNSBERRY, C., TILTON, R. C., PAINTER, B. G., WASHINGTON II, J. A. (1985). Ciprofloxacin disk susceptibility tests: interpretive zone size standards for 5-microgram disks. *J Clin Microbiol.* **21**: 880-883.

BELL, E. B. (1968). Immunological control of fertility in the mouse: a comparison of systemic and intravaginal immunization. *J Reprod Fertil.* **17**: 275-283.

BELCOUR, B., COURTOIS, D., EHRET, C., PETIARD, V. (1993). Rapid production of irones by maturation of orris rhizomes by two bacterial strains. *Phytopathology.* **34**: 1313-1315.

BEN-GIGIREY, B., VIEITES, J. M., KIM, S. H., AN, H., VILLA, T. G., BARROS-VELAZQUEZ, J. (2002). Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in Albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control.* **13**: 293-299.

BERG, G., BALLING, G. (1994). Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae*. *J Phytopathol.* **141**: 99-110.

BERG, G., MARTEN, P., BALLING, G. (1996). *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oil-seed rape—occurrence, characterisation, and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiol Res.* **151**: 19-27.

BERG, G., ROSKOT, N., SMALLA, K. (1999). Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol.* **37**: 3594-3600.

BIELANSKI, A., BERGERON, H., LAU, P. C. K., DEVENISH, J. (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology.* **46**: 146-152.

BINKS, P. R., NICKLIN, S., BRUCE, N. C. (1995). Degradation of hexahydro1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1318-1322.

BOETHLING, R. S. (1975). Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. *J Bacteriol.* **123**: 954-961.

BOLLET, C., DAVIN-REGLI, A., DE MICCO, P. (1995). A simple method for selective isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 1653-1654.

BOROWICZ, J. J., BRISHAMMAR, S., GERHARDSON, B. (1995). A *Xanthomonas maltophilia* isolate tolerating up to 1% sodium azide in Tris/HCl buffer. *World J Microbiol Biotechnol.* **11**: 236-237.

BOTTONE, E. J., PEREZ, A. A., GORDON, R. F., QURESHI, M. N. (1994a). Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J Med Microbiol.* **40**: 148-154.

BOTTONE, E. J., MADAYAG, R. M., QURESHI, M. N. (1992). *Acanthamoeba* keratitis: synergy between amebic and bacterial co-contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *J Clin Microbiol.* **30**: 2447-2450.

BOTTONE, E. J., PEREZ II, A. A., OESER, J. L. (1994b). Loofah sponges as reservoirs and vehicles in the transmission of potentially pathogenic bacterial species to human skin. *J Clin Microbiol.* **32**: 469-472

BOTTONE, E. J., REITANO, M., JANDA, J. M., TROY, K., CUTTNER, J. (1986). *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as a correlate in pathogenesis of ecthyma gangrenosum. *J Clin Microbiol.* **24**: 995-997.

BRADBURY, J. F. (1984). Genus II. *Xanthomonas*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Ed.: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. p.: 199-210.

BRITT, A. J., BRUCE, N. C., LOWE C. R. (1992a). Identification of a cocaine esterase in a strain of *Pseudomonas maltophilia*. *J Bacteriol.* **174**: 2087-2094.

BRITT, A. J., BRUCE, N. C., LOWE C. R. (1992b). Purification and characterisation of an NAD-dependent secondary alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas maltophilia* MB11L. *FEMS Microbiol Lett.* **72**: 49-55.

BROWN, L. L., EVELYN, T. P. T., IWAMA, G. K., NELSON, W. S., LEVINE, R. P. (1995). Bacterial species other than *Renibacterium salmoninarum* cross react with antisera against *R.salmoninarum* but are negative for the p57 gene of *R.salmoninarum* as detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Dis Aquat Org.* **21**: 227-231.

BYNG, G. S., WHITAKER, R. J., GHERNA, R.L., JENSEN, R. A. (1980). Variable enzymological patterning in tyrosine biosynthesis as a means of de-

termining natural relatedness among the *Pseudomonadaceae*. *J Bacteriol.* **144**: 247-257.

CALZA, L., MANFREDI, R., CHIODO, F. (2003). *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* as an emerging opportunistic pathogen in association with HIV infection: A 10-year surveillance study. *Infection.* **31**: 155-161.

CAMERON, J. L., REESE, W. A., TAYAL, V. S., CLARK, R. F., KELSO, D., GONZALEZ, E. R., GARNETT, A. R., ORNATO J. P. (1986). Bacterial contamination of ambulance oxygen humidifier water reservoirs: a potential source of pulmonary infection. *Ann Emerg Med.* **15**: 1300-1302.

CHAUDHRY, N. A., FLYNN, H. W., SMIDDY, W. E., MILLER, D. (2000). *Xanthomonas maltophilia* endophthalmitis after cataract surgery. *Arch Ophthalmol.* **118**: 572-575.

CHHIBBER, S., GUPTA, A., SHARAN, R., GAUTAM, V., RAY, P. (2008). Putative virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia*: a study on clinical isolates. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**: 2819-2825.

CLOUD-HANSEN, K. A., VILLIARD, K. M., HANDELSMAN, J., CAREY, H. V. (2007). Thirteen-lined ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) harbor multiantibiotic-resistant bacteria. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* **46**: 21-23.

COENYE, T., VANLAERE, E., FAL SEN, E., VANDAMME, P. (2004). *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**: 1235-1237.

CORBEL, M.J., STUART, F.A., BREWER, R.A. (1984). Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand.* **56**: 341-348.

CULLMANN, W. (1991). Antibiotic susceptibility and outer membrane proteins of clinical *Xanthomonas maltophilia* isolates. *Chemotherapy.* **37**: 246-250.

CULLMANN, W., DICK, W. (1990). Heterogeneity of beta-lactamase production in *Pseudomonas maltophilia*: a nosocomial pathogen. *Chemotherapy.* **36**: 117-126.

DA SILVA FILHO, L. V. F., TATENO, A. F., VELLOSO, L. F., LEVI, J. E., FERNANDES, S., BENTO, C. N. O., RODRIGUES, J. C., RAMOS, S. R. T. S. (2004). Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* Complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in Respiratory Samples From Cystic Fibrosis Patients Using Multiplex PCR. *Pediatric Pulmonology.* **37**: 537-547.

DEBETTE, J. (1991). Isolation and characterization of an extracellular proteinase produced soil strain of *Xanthomonas maltophilia*. *Curr Microbiol.* **22**: 85-90.

DEBETTE, J., BLONDEAU, R. (1977). Characterisation de bacteries tellurique assimilables a *Pseudomonas maltophilia*. *Can J Microbiol.* **23**: 1123-1127.

DEBETTE, J., PRENSIER, G. (1989). Immunoelectron microscopic demonstration of an esterase on the outer membrane of *Xanthomonas maltophilia*. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 233-239.

DENTON, M., HALL, M. J., TODD, N. J., KERR, K. G., LITTLEWOOD, J. M. (2000). Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin Microbiol Infect.* **6**: 385-398.

DENTON, M., KERR, K. G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* **11**: 57-80.

DENTON, M., KERR, K. G. (2002). Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* **40**: 1884.

DENTON, M., RAJGOPAL, A., MOONEY, L., QURESHI, A., KERR, K. G., KEER, V., POLLARD, K., PECKHAM, D. G., CONWAY, S. P. (2003). *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. *J Hosp Infect.* **55**: 180-183.

DE VOS, P., DE LEY, J. (1983). Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int J Syst Bacteriol.* **33**: 487-509.

DIGNANI, C., GRAZZIUTTI, M., ANAISSIE, E. (2003). *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Semin Respir Crit Care Med.* **24**: 89-98.

DONZIS, P. B., MONDINO, B. J., WEISSMAN, B. A., BRUCKNER, D. A. (1987). Microbial contamination of contact lens care systems. *Am J Ophthalmol.* **104**: 325-333.

DRANCOURT, M., BOLLET, C., RAOULT, D. (1997). *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol.* **47**: 160-163.

DRAPER, C. S., WALKER, R. D., LAWLER, H. E. (1981). Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *J Am Vet Med Assoc.* **179**: 1223-6.

DU BOW, M. S., RYAN, T. (1977). Host Factor for coliphage Q β RNA replication as an aid in elucidating phylogenetic relationships: the genus *Pseudomonas*. *J Gen Microbiol.* **102**: 263-268.

- DUFRENSNE, J., VEZINA, G., LEVESQUE, R. C. (1988). Molecular cloning and expression of the imipenem-hydrolysing beta-lactamase gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis*. **10**: 806-817.
- DUTKIEWICZ, J., SORENSON, W. G., LEWIS, D. M., OLENCHOCK, S. A. (1992). Levels of bacteria, fungi, and endotoxin in stored timber. *Int J Biodeter Biodeg*. **30**: 29-41.
- DÜLGER, D., BERKTAŞ, M., BOZKURT, H., GÜDÜCÜOĞLU, H., MISIRLİGİL, A. (2006). Nozokomiyal *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. *Van Tıp Dergisi*. **13**: 49-52.
- EDBERG, S. C., GALLO, P., KONTRICK, C. (1996). Analysis of the virulence characteristics of bacteria isolated from bottled, water cooler, and tap water. *Microb Ecol Health Dis*. **9**: 67-77.
- EDMONDS, C., GRIFFIN, G. E., JOHNSTONE, A. P. (1989). Demonstration and partial characterization of ADP-ribosylation in *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem J*. **261**: 113-118.
- ELAD, Y., KOELH, J., FOKKEMA, N. J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *Eur J Plant Pathol*. **100**: 315-336.
- FENTON, J. J., HARSCH, H. H., KLEIN D. (1973). Production of volatile nitrogenous compounds from the degradation of streptomycin by *Pseudomonas maltophilia*. *J Bacteriol*. **116**: 1267-1272.
- FIGUEIREDO, P. M. S., FURUMURA, M. T., SANTOS, A. M., SOUSA, A. C. T., KOTA, D. J., LEVY, C. E., TANO, T. (2006). Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett Appl Microbiol*. **43**: 443-449.
- FINKMANN, W., ALTENODORF, K., STACKEBRANDT, E., LIPSKI, A. (2000). Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephilitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **50**: 273-282.
- FISHER, M. C., LONG, S. S., ROBERTS, E. M., DUNN, J. M., BALSARA, R. K. (1981). *Pseudomonas maltophilia* bacteremia in children under going open heart surgery. *JAMA*. **246**: 1571-1574.
- FLAHERTY, J. P., GARCIA-HOUCHINS, S., CHUDY, R., ARNOW, P. M. (1993). An outbreak of gram-negative bacteremia traced to contaminated O-rings in reprocessed dialyzers. *Ann Intern Med*. **119**: 1072-1078.
- FOSTER, N. F., CHANG, B. J., RILEY, T. V. (2008a). Evaluation of a modified selective differential medium for the isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Microbiol Methods*. **75**: 153-155.

FOSTER, N. F., HARNETT, G. B., RILEY, T. V., CHANG, B. J. (2008b). Cross-Reaction of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* Species in a 23S rRNA Gene-Directed PCR for Detection of *S.maltophilia*. *J Clin Microbiol.* **46**: 4111-4113.

FRENEY, J., LABAN, P., DESMONCEAUX, M., FLEURETTE, J. (1983). Micro-method for carbon substrate assimilation by *Pseudomonas maltophilia*. *Zentralbl Bakteri.* **255**: 479-488.

FRITZ, M. E., EKE, P. I., MALMQUIST, J., HARDWICK, R. (1996). Clinical and microbiological observations of early polytetrafluoroethylene membrane exposure in guided bone regeneration. Case reports in primates. *J Periodontol.* **67**: 245-249.

FUERST, J. A., HAYWARD, A. C.(1969). Surface appendages similar to fimbriae (pili) on *Pseudomonas* species. *J Gen Microbiol.* **58**: 227-237.

GARCIA, P., MONJARDIN, C., MARTIN, R., MADERA, C., SOBERON, N., GARCIA, E., MEANA, A., SUAREZ, J. E. (2008). Isolation of new *Stenotrophomonas* bacteriophages and genomic characterization of temperate phage S1. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 7552-60.

GARDNER, P., GRIFFIN, W. B., SWARTZ, M. N., KUNZ, L. J. (1970). Non-fermentative Gram negative bacilli of nosocomial interest. *Am J Med.* **48**: 735-749.

GIORDANO, A., MAGNI, A., TRANCASSINI, M., VARESI, P., TURNER, R., MANCINI, C. (2006). Identification of respiratory isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by commercial biochemical systems and species-specific PCR. *J Microbiol Methods.* **64**: 135-138.

GLADMAN, G., CONNOR, P. J., WILLIAMS, R. F., DAVID, T. J. (1992). Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood.* **67**: 192-195.

GROVER, S., ODELL, W. D. (1992). Partial characterization of the 30kD Ig-binding protein from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem Biophys Res Commun.* **182**: 1075-1081.

GUERZONI, M. E., LANCIOTTI, R., SINIGAGLIA, M., GARDINI, F. (1994). Analysis of the interaction between autochthonous bacteria and packaging material in PVC-bottled mineral water. *Microb Res.* **149**: 115-122.

GÜLMEZ, D., HASÇELİK, G. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect.* **11**: 880-886.

- HARRIS, N. B., ROGERS, D. G. (2001). Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis subsp. tetraspis*). *J Vet Diagn Invest.* **13**: 255-258.
- HASE, S., RIETSCHEL, E. T. (1976). Isolation and analysis of the lipid A backbone. Lipid A structure of lipopolysaccharides from various bacterial groups. *Eur J Biochem.* **63**: 101-107.
- HAUBEN, L., VAUTERIN, L., MOORE, E. R. B., HOSTE, B., SWINGS, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Inter J Syst Bacteriol.* **49**: 1749-1760.
- HEBBAR, P., BERGE, O., HEULIN, T., SINGH, S. P. (1991). Bacterial antagonists of sunflower (*Helianthus annuus* L.) fungal pathogens. *Plant Soil.* **133**: 131-140.
- HEJNAR, P., BARDON, J., SAUER, P., KOLAR, M. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* as a part of normal oral bacterial flora in captive snakes and its susceptibility to antibiotics. *Vet Microbiol.* **121**: 357-362.
- HENRICHSEN, J. (1975). The occurrence of twitching motility among Gram negative bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol.* **83**: 171-178.
- HIRAI, Y. (1991). Survival of bacteria under dry conditions: from a view point of nosocomial infection. *J Hosp Infect.* **19**: 191-200.
- HUGH, R., GILARDI, G. L. (1980). *Pseudomonas*. In Manual of clinical microbiology, 3rd.ed. Ed.: LENETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER, Jr., W., TRUANT, J. P. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.: 288-317.
- HUGH, R., LEIFSON, E. (1963). A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* **13**: 133-138.
- HUGH, R., RYSCHENKOW, E. (1961). *Pseudomonas maltophilia*, an *Alcaligenes*-like species. *J Gen Microbiol.* **26**: 123-132.
- HUPKOVA, M., BLAHOVA, J., KRALIKOVA, J., KRCMERY, V. (1995). Transferable resistance to beta-lactams in a nosocomial strain of *Xanthomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 1011-1012.
- IIZUKA, H., KOMAGATA, K. (1963). An attempt at grouping of the genus *Pseudomonas*. *J Gen Appl Microbiol.* **9**: 73-82.
- IIZUKA, H., KOMAGATA, K. (1964a). Microbiological studies on petroleum and natural gas. I. Determination of hydrocarbon-utilizing bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* **10**: 207-221.

IIZUKA, H., KOMAGATA, K. (1964b). Microbiological studies on petroleum and natural gas. II. Determination of pseudomonads isolated from oil-brines and related materials. *J Gen Appl Microbiol.* **10**: 223-231.

IKEMOTO, S., SUZUKI, K., KANEKO, T., KOMAGATA, K. (1980). Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. *Int J Syst Bacteriol.* **30**: 437-447.

JAKOBI, M., WINKELMANN, G., KAISER, D., KEMPLER, C., JUNG, G., BERG, G., BAHL, H. (1996). Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot.* **49**: 1101-1104.

JOHNSON, E. H., AL-BUSAIDY, R., HAMEED, M. S. (2003). An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *J Vet Med.* **50**: 102-104.

JUFFS, H. S. (1973). Identification of *Pseudomonas* species isolated from milk produced in south eastern Queensland. *J Appl Bacteriol.* **36**: 585-598.

JUHNKE, M. E., DES JARDIN, E. (1989). Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 747-50.

JUHNKE, M. E., MATHRE, D. E., SANDS, D. C. (1987). Identification and characterization of rhizosphere competent bacteria of wheat. *Appl Environ Microbiol.* **53**: 2793-2794.

KABASHIMA, T., ITO, K., YOSHIMOTO, T. (1996). Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J Biochem.* **120**: 1111-1117.

KAWAI, F. (1993). Bacterial degradation of acrylic oligomers and polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 382-385.

KAISER, S., BIEHLER, K., JONAS, D. (2009). A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol.* **191**: 2934-2943.

KRCMERY, V., LANGSADL, L., ANTAL, M., SECKAROVA, A. (1985). Transferable amikacin and cefamandole resistance: *Pseudomonas maltophilia* and *Acinetobacter* strains as possible reservoirs of R plasmids. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **29**: 141-146.

KELLY, M. D., MORTENSEN, J. E., KONKLE, B. A., STULL, T. L. (1995). A plasmid mediating production of a β -lactamase by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Curr Ther Res.* **56**: 152-162.

KERR, J. R. (1996). Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol.* **45**: 380-382.

KERR, K. G., DENTON, M., TODD, N., CORPS, C. M., KUMARI, P., HAWKEY, P. M. (1996). A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **15**: 607–10.

KETCHUM, P. A., PAYNE, W. J. (1992). Purification of two nitrate reductases from *Xanthomonas maltophilia* grown in aerobic cultures. *Appl Environ Microbiol*. **58**: 3586-3592.

KHARDORI, N., ELTING, L., WONG, E., SCHABLE, B., BODEY, G. P. (1991). Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. *Rev Infect Dis*. **12**: 997-1003.

KIM, H. B., SRINIVASAN, S., SATHIYARAJ, G., QUAN, L. H., KIM, S. H., NAM BUI, T. P., LIANG, Z., KIM, Y. J., YANG, D. C. (2010). *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*. **60**: 1522-1526.

KLICK, J. M. ve DU MOULIN, G. C. (1978). An oxygen analyzer as a source of *Pseudomonas*. *Anesthesiology* **49**: 293-294.

KOBAYASHI, D. Y., GUGLIELMONI, M., CLARKE, B. B. (1995). Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turf grass. *Soil Biol Biochem*. **27**: 1479-1487.

KODAKA, H., ARMFIELD, A. Y., LOMBARD, G. L., DOWELL, V. R. (1982). Practical Procedure for Demonstrating Bacterial Flagella. *J Clin Microbiol*. **16**: 948-952.

KOMAGATA, K. (1961). Differentiation of genus *Pseudomonas* and related aerobic bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. **7**: 282-299.

KOMAGATA, K., YABUUCHI, Y., TAMAGAWA, V., OHYAMA, A. (1974). *Pseudomonas melanogena* Iizuka and Komagata 1963, a later subjective synonym of *Pseudomonas maltophilia* Hugh and Ryschenkow 1960. *Int J Syst Bacteriol*. **24**: 242-247.

KWOK, O. C. H., FAHY, P. C., HOITINK, H. A. J., KUTER, G. A. (1987). Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology*. **77**: 1206-1212.

LAMBERT, B., BEYNS, F., VAN ROOYEN, L., GOSSELE, F., PAPON, Y., SWINGS, J. (1987). Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl Environ Microbiol*. **53**: 1866-1871.

LAMBERT, T., PLOY, M. C., DENIS, F., COURVALIN, P. (1999). Characterization of the chromosomal *aac(6)-Iz* gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. **43**: 2366-2371.

- LEE, N. A., CLARK, D. P. (1993). A natural isolate of *Pseudomonas maltophilia* which degrades aromatic sulfonic acids. *FEMS Microbiol Lett.* **107**:151-155.
- LEE, N. R., HWANG, M. O., JUNG, G. H., KIM, Y. S., MIN, K. H. (1996). Physical structure and expression of *alkBA* encoding alkane hydroxylase and rubredoxin reductase from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem Biophys Res Commun.* **218**: 17-21.
- LEE, M., WOO, S. G., CHAE, M., SHIN, M. C., JUNG, H. M., TEN, L. N. (2011). *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**: 598-604.
- LI, X. Z., ZHANG, L., MCKAY, G. A., POOLE, K. (2003). Role of the acetyltransferase AAC(6)-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* **51**: 803-811.
- LIU, S. C., WEBSTER, D. A., WEI, M. L., STARK, B. C. (1996). Genetic engineering to contain the V itreoscilla hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol Bioeng.* **49**: 101-105.
- LONDON, C. J., GRIFFITH, I. P., KORTT, A. A. (1984). Proteinases produced by *Pseudomonads* isolated from sheep fleece. *Appl Environ Microbiol.* **47**: 75-79.
- LYSENKO, O., WEISER, J. (1974). Bacteria associated with the nematode *Neoplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J Invertebr Pathol.* **24**: 332-336.
- MAC DIARMID, J. A., BURRELL, D. H. (1993). Degradation of the wool fibre by bacteria isolated from fleece rot. *Wool Technol Sheep Breed.* **40**: 123-126.
- MACHUCA, E., ORTIZ, A. M., RABAGLIATI, R. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* peritonitis in a patient receiving automated peritoneal dialysis. *Adv Peritoneal Dial.* **21**: 63-65.
- MAES, M. (1993). Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiol Lett.* **113**: 161-166.
- MALECKA-GRIGGS, B. ve REINHARDT, D. J. (1983). Direct dilution sampling, quantitation, and microbial assessment of open-system ventilation circuits in intensive care units. *J Clin Microbiol.* **17**: 870-877.
- MARGESIN, R., SCHINNER, F. (1991). Characterization of a metalloprotease from psychrophilic *Xanthomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol Lett.* **79**: 257-262.
- MARTINEZ, J., SEGURA, P., GARCIA, D., ADURIZ, G., IBABE, J. C., PERIS, B., CORPA, J. M. (2006). Septicaemia secondary to infection by *Corynebacterium macginleyi* in an Indian python (*Python molurus*). *Vet J.* **172**: 382-385.

MAZZOLA, M., STAHLMAN, P. W., LEACH, J. E. (1995). Application method Affects the distribution and efficacy of rhizobacteria suppressive of downy brome (*Bromus tectorum*). *Soil Biol Biochem.* **27**: 1271-1278.

MICOZZI, A., VENDITTI, M., MONACO, M., FRIEDRICH, A., TAGLIETTI, F., SANTILLI, S., MARTINO, P. (2000). Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* **31**: 705-11.

MIDELFART, J., MIDELFART, A., BEYANGER, L. (1996). Microbial contamination of contact lens cases among medical students. *CLAO J.* **22**: 21-24.

MINKWITZ, A., BERG, G. (2001). Comparison of Antifungal Activities and 16S Ribosomal DNA Sequences of Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol.* **39**: 139-145.

MOFFET, H. L., WILLIAMS, T. (1967). Bacteria recovered from distilled water and inhalation equipment. *Am J Dis Child.* **114**: 7-11.

MORTENSEN, J. E., FISHER, M. C., LI PUMA, J. J. (1995). Recovery of *Pseudomonas cepacia* and other *Pseudomonas* species from the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **16**: 30-32.

MOSS, C. W., SAMUELS, S. B., WEAVER, R. E. (1972). Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol.* **24**: 596-598.

MUIR, P., FOX, R., WU, Q., BAKER, T. A., ZITZER, N. C., HUDSON, A. P., MANLEY, P. A., SCHAEFER, S. L., HAO, Z. (2010). Seasonal variation in detection of bacterial DNA in arthritic stifle joints of dogs with cranial cruciate ligament rupture using PCR amplification of the 16S rRNA gene. *Vet Microbiol.* **141**: 127-133.

MUIR, P., OLDENHOFF, W. E., HUDSON, A. P., MANLEY, P. A., SCHAEFER, S. L., MARKEL, M. D., HAO, Z. (2007). Detection of DNA from a range of bacterial species in the knee joints of dogs with inflammatory knee arthritis and associated degenerative anterior cruciate ligament rupture. *Microb Pathog.* **42**: 47-55.

NAKATSU, C. H., FULTHORPE, R. R., HOLLAND, B. A., PEEL, M. C., WYNDHAM, R. C. (1995). The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed. *Mol Ecol.* **4**: 593-603.

NAZİK, H., ÖNGEN, B., ERTURAN, Z., ŞALCIOĞLU, M. (2007). Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Jpn J Infect Dis.* **60**: 82-86.

NEAL, D. J., WILKINSON, S. G. (1982). Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia* structural studies of the side-chain, core, and lipid-A

regions of the lipopolysaccharide from Strain NCTC 10257. *Eur. J. Biochem.* **128**: 143-149.

NESME, X., VANEECHOUTTE, M., ORSO, S., HOSTE, B., SWINGS, J. (1995). Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S Rna gene. *Syst Appl Microbiol.* **18**: 127-135.

NGUYEN, M. H., MUDER, R. R. (1994). Meningitis due to *Xanthomonas maltophilia*: case report and review. *CID.* **19**: 325-6.

NICODEMO, A. C., GARCIA PAEZ, J. I. (2007). Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Microbiol Infect Dis.* **26**: 229-237.

NORD, C. E., WADSTROM, T., WRETLIND, B. (1975). Antibiotic sensitivity of two *Aeromonas* and nine *Pseudomonas* species. *Med Microbiol Immunol.* **161**: 89-97.

O'BRIEN, M., DAVIS, G. H. (1982). Enzymatic profile of *Pseudomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol.* **16**: 417-421.

OIE, S. ve KAMIYA, A. (1992). Microbial contamination of brushes used for preoperative shaving. *J Hosp Infect.* **21**: 103-110.

OKAZAKI, A., AVISON, M. B. (2007). *Aph(3')*-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 359-360.

OLIVERA-GARCIA, D., DALL'AGNOL, M., ROSALES, M., AZZUZ, A. C. G. S., MARTINEZ, M. B., GIRON, J. A. (2002). Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg Infect Dis.* **8**: 918-923.

ORRISON, L. H., BIBB, W.F., CHERRY, W.B., THACKER, L. (1983). Determination of antigenic relationships among legionellae and non-legionellae by direct fluorescent-antibody and immuno diffusion tests. *J Clin Microbiol.* **17**: 332-337.

OYIAZU, H., KOMAGATA, K. (1983). Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid compositions and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J Gen Appl Microbiol.* **29**: 17-40.

PALLERONI, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Ed.: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. p.: 141-199.

PALLERONI, N. J. (2005). Genus IX. *Stenotrophomonas* Palleroni and Bradbury 1993 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition, Volume Two The *Proteobacteria*, Part B The *Gammaproteobacteria*. Ed.: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. p.: 107-115.

PALLERONI, N. J., BRADBURY, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J Syst Bacteriol.* **43**: 606-609.

PALLERONI, N. J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R., DOUDOROFF, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **23**: 333-339.

PANKUCH, G. A., JACOBS, M. R., RITTENHOUSE, S. F., APPLEBAUM, P. C. (1994). Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight β -lactams (including β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2317-2322.

PAPADAKIS, K. A., VARTIVARIAN, S. E., VASSILAKI, M. E., ANAISSIE, E. J. (1996). Septic prepatellar bursitis caused by *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *Clin Infect Dis.* **22**: 388-389.

PAPADAKIS, K. A., VARTIVARIAN, S. E., VASSILAKI, M. E., ANAISSIE, E. J. (1997). *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis-report of two cases and review of the literature. *J Neurosurg.* **87**: 106-108.

PAPAPETROPOULOU, M., ILIOPOULOU, J., RODOPOULOU, G., DETORAKIS, J., PANIARA, O. (1994a). Occurrence and antibiotic resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *J Chemother.* **6**: 111-116.

PAPAPETROPOULOU, M., RODOPOULOU, G., GIANNOULAKI, E., STERGIOPOULOS, P. (1994b). Effect of temperature on antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas* species isolated from drinking water. *J Chemother.* **6**: 404-407.

PEASE, P. E., LAWSON, J. W., LANE, M., TALLAK, J. E., ALLAN, R. (1989). Observations on cell-wall deficient forms of *Pseudomonas maltophilia*. *Microbios.* **57**: 21-26.

PEDERSEN, M. M., MARSO, E., PICKETT, J. (1970). Non-fermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am J Clin Pathol.* **54**: 178-192.

PENLAND, R. L., WILHELMUS, K. R. (1997). Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol.* **35**: 915-922.

PHALE, P. S., MAHAJAN, M. C., VAIDYANATHAN, C. S. (1995). A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSU89. *Arch. Microbiol.* **163**: 42-47.

QURESHI, A., MOONEY, L., DENTON, M., KERR, K. G. (2005). *Stenotrophomonas maltophilia* in Salad. *Emerg Infect Dis.* **11**: 1157-58.

RAMOS, P. L., VAN TRAPPEN, S., THOMPSON, F. L., ROCHA, R. C. S., BARBOSA, H. R., DE VOS, P., MOREIRA-FILHO, C. A. (2011). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugarcane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **61**: 926-931.

RINGERTZ, S., BJORKLIND, A., KRONVALL, G. (1989). Species-specific interpretive breakpoints for ciprofloxacin disk diffusion susceptibility testing. *Scand J Infect Dis Suppl.* **60**: 46-53.

RODERO, F. G., MASIA, M. M., CORTES, J., TABLA V. O., MAINAR, V., VILAR, A. (1996). Endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: case report and review. *CID.* **23**: 1261-1265.

ROMANENKO, L. A., UCHINO, M., TANAKA, N., FROLOVA, G. M., SLINKINA, N. N., MIKHAILOV, V. V. (2008). Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol.* **189**: 337-344.

ROSENTHAL, S. L. (1974). Sources of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species found in human culture. *Am J Clin Pathol.* **62**: 807-811.

SADDLER, G. S., BRADBURY, J. F. (2005). Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition, Volume Two The *Proteobacteria*, Part B The *Gammaproteobacteria*. Ed.: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. p.: 63.

SAIMAN, L., TABIBI, S., STARNER, T. D., SAN GABRIEL, P., WINOKUR, P. L., JIA, H. P., McCRAY, P. B., TACK, B. F. (2001). Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2838-2844.

SAWYER, M. H., BAUMANN, P., BAUMANN, L. BERMAN, S. M., CANOVAS, J. L., BERMAN, R.H. (1977). Pathways of d-fructose metabolism in species of *Pseudomonas*. *Arch Microbiol.* **112**: 49-55.

SCALLY, C. M., WINDER, F. G. (1991). Deoxyribonuclease from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochem Soc Trans.* **19**: 40.

SCHABLE, B., RHODEN, D. L., HUGH, R., WEAVER, R.E., KHARDORI, N., SMITH, P.B., BODEY, G.P., ANDERSON, R.L. (1989). Serological classification of *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) based on heat-stable O antigens. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1011-1014.

- SCHABLE, B., RHODEN, D. L., JARVIS, W.R., MILLER, J. M. (1992). Prevalence of serotypes of *Xanthomonas maltophilia* from world wide sources. *Epidemiol. Infect.* **108**: 337-341.
- SEMEL, J. D., TRENHOLME, G. M., HARRIS, A. A., JUPA, J. E., LEVIN, S. (1978). *Pseudomonas maltophilia* pseudosepticaemia. *Am J Med.* **64**: 403-406.
- SENOLE, E., DES JARDIN, J., STARK, P. C., BAREFOOT, L., SNYDMAN, D. R. (2002). Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis.* **34**: 1653-1656.
- SHEN, P., HUANG, M., PENG, Z. (1992). Studies of plasmids of *Pseudomonas maltophilia*. *Acta Genet Sin.* **19**: 355-361.
- SHIMIZU, K., KIKUCHI, K., SASAKI, T., TAKAHASHI, N., OHTSUKA, M., ONO, Y., HIRAMATSU, K. (2008). *Smqnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 3823-3825.
- SIERRA, M., GARCIA-LOPEZ, M. L., GONZALEZ, E., GARCIA, M. C., OTERO, O. (1995). Species of psychrotrophic bacteria on freshly-dressed lamb carcasses. *Arch Lebensmittelhyg.* **46**: 22-23.
- SINGER, E., DEBETTE, J. (1993). Nutritional factors controlling exocellular proteinase production in a soil-isolated *Xanthomonas maltophilia* strain. *J Basic Microbiol.* **33**: 113-121.
- SIKOROWSKI, P. P., POWELL, J. E., LAWRENCE, A. M. (1992). Effects of bacterial contamination on development of *Micropolitis croceipes*. *Entomophaga.* **37**: 475-481
- SINGER, E., DEBETTE, J., LEPRETRE, A., SWINGS, J. (1994). Comparative esterase electrophoretic polymorphism and phenotypic analysis of *Xanthomonas maltophilia* and related strains. *Syst Appl Microbiol.* **17**: 387-394.
- STAINER, R. Y., PALLERONI, N. J., DOUDOROF, M. (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- STARR, M. P., JENKINS, C. L., BUSSEY, L. B., ANDREWES, A. G. (1977). Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Microbiol.* **113**: 1-9.
- STEVENS, J., FANBURG, B. L., LANZILLO, J. J. (1990). Determination of peptidyl dipeptidase activity in 24 bacterial species. *Can J Microbiol.* **36**: 56-59.
- SU, J. J., KAFKEWITZ, D. (1994). Utilization of toluene and xylenes by a nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* **15**: 249-257.

SUGA, K., KABASHIMA, T., ITO, K., TSURU, D., OKAMURA, H., KATAOKA, J., YOSHIMOTO, T. (1995). Prolidase from *Xanthomonas maltophilia*: purification and characterization of the enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem.* **59**: 2087-2090.

SWINGS, J., DE VOS, P., VAN DEN MOOTER M., DE LEY, J. (1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**: 409-413.

TALON, D., BAILLY, P., LEPRAT, R., GODARD, C., DECONNINK, E., CAHN, J. Y., MICHEL-BRIAND, Y. (1994). Typing of hospital strains of *Xanthomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Hosp Infect.* **27**: 209-217.

TEO, W. Y., CHAN, M. Y., LAM, C. M., CHONG, C. Y. (2006). Skin manifestation of *Stenotrophomonas maltophilia* infection – a case report and review article. *Ann Acad Med Singapore.* **35**: 897-900.

TOLEDO-PEREYRA, L. H., RAIJ, L., SIMMONS, R. L., NAJARIAN, J. S. (1974). Role of endotoxin and bacteria in long term survival of preserved small bowel allografts. *Surgery* **73**: 474-481.

ULRICH, J. A., NEEDHAM, G. M. (1953). Differentiation of *Alcaligenes faecalis* from *Bordetella bronchiseptica* by biochemical and nutritional methods. *J. Bacteriol.* **65**: 210-215.

VALDEZATE, S., VINDEL, A., LOZA, E., BAQUERO, F., CANTON, R. (2001). Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 1581-1584.

VALDEZATE, S., VINDEL, A., MARTIN-DAVILA, P., DEL SAZ, B. S., BAQUERO, F., CANTON, R. (2004). High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol.* **42**: 693-699.

VAN COUWENBERGHE, C. J., COHEN, S. H. (1994). Analysis of epidemic and endemic isolates of *Xanthomonas maltophilia* by contour clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **15**: 691-696.

VAN COUWENBERGHE, C. J., COHEN, S. H., TANG, Y. J., GUMERLOCK, P. H., SILVA, J. (1995). Genomic fingerprinting of epidemic and endemic strains of *Stenotrophomonas maltophilia* (formerly *Xanthomonas maltophilia*) by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol.* **33**: 1289-1291.

VAN DEN MOOTER, M., SWINGS, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int J Syst Bacteriol.* **40**: 348-369.

- VAN HOLDER, R., VANHAECKE, E., RINGOIR, S. (1992). *Pseudomonas* septicemia due to deficient disinfectant mixing during reuse. *Int J Artif Org.* **15**: 19-24.
- VAN ZYL, E., STEYN, P. L. (1990). Differentiation of phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 60-71.
- VAN ZYL, E., STEYN, P. L. (1992). Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 193-198.
- VARTIVARIAN, S. E., PAPADAKIS, K. A., ANAISSIE, E. J. (1996). *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* urinary tract infection. A disease that is usually severe and complicated. *Arch Intern Med.* **156**: 433-435.
- VAZQUEZ, S. C., MERINO, L. N. R., MACCORMACK, W. P., FRAILE, E. R. (1995). Protease-producing psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica. *Polar Biol.* **15**: 131-135.
- VILLARINO, M. E., STEVENS, L. E., SCHABLE, B., MAYERS, G., MILLER, J. M., BURKE, J. P., JARVIS, W. R. (1992). Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection/colonisation in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **13**: 201-206.
- VISSER, M. R., BOGAARDS, L., ROZENBERG-ARSKA, M., VERHOEF, J. (1992). Comparison of the autoSCAN-W/A and Vitek AutoMicrobic systems for identification and susceptibility testing of bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **11**: 979-984.
- VON GRAEVENITZ, A., BUCHER, C. (1983). Isolation of *Pseudomonas maltophilia* from human stools with thienamycin. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* **254**: 403-404.
- WALSH, T. R., HALL, L., ASSINDER, S. J., NICHOLS, W. W., CARTWRIGHT, S. J., MACGOWAN, A. P., BENNETT, P. M. (1994). Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta.* **1218**: 199-201.
- WALSH, T. R., MACGOWAN, A. P., BENNETT, P. M. (1996). Sequence analysis of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*, abstr. C33. In Program and Abstracts of the 36th Inter science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- WANG, X. Z., LI, B., HERMAN, P. L., WEEKS, D. P. (1997). A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1623-1626.

- WECKESSER, J., DREWS, G., ROPPEL, J., MAYER, H., FROMME, I. (1974). The lipopolysaccharides (O-antigens) of *Rhodopseudomonas viridis*. *Arch. Microbiol.* **101**: 233-245.
- WHITAKER, R. J., BYNG, G. S., GHERNA R. L., JENSEN, R.A. (1981). Diverse enzymological patterns of phenylalanine biosynthesis in pseudomonad bacteria are conserved in parallel with DNA/DNA homology groupings. *J. Bacteriol.* **147**: 526-534.
- WHITBY, P. W., CARTER, K. B., BURNS, J. L., ROYALL, J. A., LIPUMA, J. J., STULL, T. L. (2000). Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. *J Clin Microbiol.* **38**: 4305-4309.
- WILKINSON, K. G., DIXON, K. W., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid associated bacteria. *Plant Soil.* **159**: 1291-1295.
- WILKINSON, S. G. (1970). Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetra-acetic acid. *J. Bacteriol.* **104**: 1035-1044.
- WILKINSON, S. G., GALBRAITH, L., ANDERTON, W. J. (1983). Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia*: composition of the lipopolysaccharide and structure of the side-chain polysaccharide from strain N.C.I.B. 9204. *Carbohydr Res.* **112**: 241-252.
- WILKINSON, S. G., GALBRAITH, L., LIGHTFOOT, G. A. (1973). Cell walls, lipids, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem.* **33**: 158-174.
- WINN, A. M., MILES, C. T., WILKINSON, S. G. (1996). Structure of the O3 antigen of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas* or *Pseudomonas*) *maltophilia*. *Carbohydr Res.* **282**: 149-156.
- WINN, A. M., WILKINSON, S. G. (1996). Structure of the O20 antigen of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas* or *Pseudomonas*) *maltophilia*. *Carbohydr Res.* **294**: 109-115.
- WINN, A. M., WILKINSON, S. G. (1997). Structure of the O2 antigen of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas* or *Pseudomonas*) *maltophilia*. *Carbohydr. Res.* **298**: 213-217.
- WINTHER, L., ANDERSEN, R. M., BAPTISTE, K. E., AALBEK, B., GUARDABASSI, L. (2010). Association of *Stenotrophomonas maltophilia* infection with lower airway disease in the horse: A retrospective case series. *Vet J.* **186**: 358-363.

- WISHART, M. M. ve RILEY, T.V. (1976). Infection with *Pseudomonas maltophilia*: hospital out break due to contaminated disinfectant. *Med J Aust.* **2**: 710-712.
- WIWAT, C., LERTCANAWANICHAKUL, M., SIWAYAPRAM, P., PANTUWATANA, S., BHUMIRATANA, A. (1996). Expression of chitinase-encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Gene* **179**: 119-126.
- WOLF, A., FRITZE, A., HAGEMANN, M., BERG, G. (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**: 1937-1944.
- WOODWARD, L. M., BIELKE, A. R., EISSES, J. F., KETCHUM, P. A. (1990). Occurrence of nitrate reductase and molybdopterin in *Xanthomonas maltophilia*. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 3766-3771.
- YANG, H. C., IM, W. T., KANG, M. S., SHIN, D. Y., LEE, S. T. (2006). *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 81-84.
- YANG, P., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. (1993a). Polyamine patterns as chemotaxonomic markers for the genus *Xanthomonas maltophilia*. *Int J Syst Bacteriol.* **43**: 709-714.
- YANG, P., VAUTERIN, L., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., KERSTERS, K. (1993b). Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol.* **16**: 47-71.
- YANG, J., WANG, X. Z., HAGE, D. S., HERMAN, P. L., WEEKS, D. P. (1994). Analysis of dicamba degradation by *Pseudomonas maltophilia* using high-performance capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* **219**: 37-42.
- YEMİŞEN, M., METE, B., TUNALI, Y., YENTUR, E., ÖZTÜRK, R. (2008). A meningitis case due to *Stenotrophomonas maltophilia* and review of the literature. *Int J Infect Dis.* **23**: 1-3.
- ZBINDEN, A., BOTTGER, E. C., BOSSHARD, P. P., ZBINDEN, R. (2007). Evaluation of the colorimetric VITEK2 card for identification of Gram negative nonfermentative rods: comparison to 16S Rrna gene sequencing. *J Clin Microbiol.* **45**: 2270-2273.
- ZHONG, W. P. (1990). Identification and classification of 204 strains of Gram negative organisms isolated from poultry eggs. *Chin J Prev Med.* **24**: 257-260.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : İnci Ülkü
 Soyadı : ÇELİKEL
 Doğum yeri ve tarihi : İstanbul, 19/08/1978
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
 Mikrobiyoloji A.D. Dışkapı/ANKARA
 Tlf :506 437 94 16

II- Eğitimi

1996-2003 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara
 1990-1996 Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi /Ankara
 1985-1990 Hürriyet İlkokulu /Ankara

III- Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2004-2005 Hakan Tavukçuluk sorumlu veteriner hekim

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği
 Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

1. Onuk E E, İnat G, Fındık A, Çelikel İ Ü, Çiftçi A, (2010) Sığır karkas orijinli *Escherichia coli* O157 izolatlarının rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-Polimeraz zincir reaksiyonu ile genotiplendirilmesi. *J Etlik Vet Microbiol*, 21 (2): 79-84.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Seminerler ve Kongreler

1. Laboratuvar Güvenlik Standartları (I. Seminer)
2. Toprakta Bakteriyel DNA İzasyonu ve Medikal Önemi (II. Seminer)
3. V. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 2009 Tekirdağ
 Yemlere ilave edilen alternatif büyütme faktörünün broiler besi performansı ve bağırsak mikrobiyotası üzerine etkileri (Poster)
4. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi 2006 Antalya
5. IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 2010 Kıbrıs
 Sığır ve koyunlarda *Stenotrophomonas maltophilia* taşıyıcılığının saptanması ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi (Sunu)