



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA VİRULANS
FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Erhan ÖZSOY

Mikrobiyoloji Ana Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Umut Safiye ŞAY COŞKUN

TOKAT – 2021

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../2021)

Erhan Özsoy

.....

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi boyunca desteğini ve ilgisini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Umut Safiye ŞAY ÇOSKUN'a göstermiş olduğu özveri için teşekkürlerimi sunarım.

Başta bölümdeki Araştırma Görevli Arkadaşlara Sayın Dr. Ayşe ALICI ve Bahise Çağla TAŞKIN DALGIÇ olmak üzere teşekkür ederim.

Değerli katkılarını sakınmayan, öğrenim sürecim boyunca ilgi ve desteklerini hissettiğim Biyoistatistik Ana Dalı Bölüm Başkanı Doktora Öğretim Üyesi. Osman DEMİR'e teşekkür ederim.

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

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) aerob, sporsuz, hareketli, düz veya hafif kıvrımlı, 42 C°de üreyebilen Gram negatif basildir. *P. aeruginosa*; son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç enfeksiyonların etkenidir. *P. aeruginosa* patogenezinde rol alan virülans faktörleri olan hücre dışı pek çok faktör görev almaktadır. Bu virülans faktörlerinin patogenezdaki temel mekanizmaları anlamak ve her birinin tedaviyi nasıl etkilediği ya da terapotik bir ajan olarak kullanılabileceğini araştıran çalışmalar önemlidir. Bu çalışmadaki amacımız *P. aeruginosa* suşlarının direnç durumunu ve virulans faktörlerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmaya Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hastalara (n:80) ait örneklerden izole edilen ve *P.aeruginosa* olarak tanımlanan suşlar çalışmaya dahil edildi.

Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımına bakıldığında izolatların en çok Göğüs Hastalıkları Servisinden (%13), Dahiliye Servisinden (%12) ve Kardiyoloji Yoğun bakım (%10) en az ise Anestezi Yoğun bakımdan (%1), Cerrahi Onkolojisinden (%1) ve Üroloji Servisinden (%1) gelen örneklerden üretildiği saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının 35'inin (%43.8) balgam, 19'unun (%23.8) yara, 17'sinin (21,3) idrar, 7'sinin (%8,8) kan, 1'inin (%1) steril vücut sıvısı ve 1'inin (%1) burun örneklerinden izole edildiği görülmüştür. *P. aeruginosa* izolatlarının en çok piperasilin-tazobaktam (%65) en az ise tobramisin (%6) ve amikasin'e (%6) karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının üretilmiş olduğu örnekler ile izolatların antibiyotiklere karşı direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p \geq 0,05$). *P. aeruginosa* izolatlarının %81.3'ünün ekzotoksin A, % 30'unun eksoenzim S, %32.5'inin fosfolipaz C, %42.5'inin elastaz ürettiği saptanmıştır. İzolatların %70.4'ünün hareketli olduğu, %33.9'unun pyosyanin, %41,3'inin pyoverdin, %1,8'nin pyoverdin ürettiği %8,9'unun ise pigmentasyon özelliğinin olmadığı saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının üretildiği örnekler ve virülans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p \geq 0,05$). Ayrıca antibiyotik direnci ile virülans faktörlerinin varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.005$).

P.aeruginosa virulansı oldukça yüksek non-fermenter bir bakteri olup toplum kökenli enfeksiyonlara, özellikle immün sistemi zayıf hastalarda, birçok hastane kaynaklı enfeksiyona neden olması ve giderek artan antibiyotik direnci ile dikkat çeken bir patojendir. Antibiyotik direnç durumunun ve enfeksiyonun seyrini değiştirme potansiyeli olan virölans faktörlerinin sıklığının incelenmesinin, bu mekanizmalar bütününe hedef alabilecek olası farklı terapötik uygulamalara temel oluşturması açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*; Ekzotoksin A, Eksoenzim S, Fosfolipaz C, Elastaz, Antibiyotik Direnci.



ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) aerob have been Gram-negative bacilli that can produce at 42° C without spores, motile, straight or slightly curved. *P. aeruginosa* has high mortality and morbidity, which has been common with its increasing incidence in recent years, the variety of virulence factors that have been the cause of difficult-to-treat infections and the constantly rising antibiotic resistance rates. Many extracellular factors that are virulence factors that has played a role in *pseudomonasaeruginosapathogenesis*. These virulence factors have been important in understanding the basic mechanisms in the pathogenesis and studies investigating how each affects treatment or can be used as a therapeutic agent. In this study our aim has been to investigate the resistance status of *P. aeruginosa* strains and virulence factors. Identified as *P.aeruginosa* in the Microbiology Laboratory of Tokat Gaziosmanpaşa University Medical Faculty Hospital and isolated from patient samples has been included in this study. (n:80)

According to the samples which have been sent to clinics considering its distribution the isolates have been mostly from Chest Diseases Service (13%), Internal Medicine Service (12%) and Cardiology Intensive Care (10%) and at least Anesthesia Intensive Care (1%), Surgical Oncology (1%) and it has been determined that it has been produced from samples (1%) from the urology service. *P. aeruginosa* isolates have been determined to be most resistant to piperacillin-tazobactam (65%) and least to tobramycin (6%) and amikacin (6%). Any statistically significant relationship has not been determined between the samples from which *P. aeruginosa* isolates were produced and the resistance of the isolates against antibiotics. ($p \geq 0,05$). It has been determined that 81.3% of *P. aeruginosa* isolates produced *Tox A*, 30% of *Exo S*, 32.5% of *PLC*, 30% of *Exo S*, 42.5% *Las B*. It has been determined that 70.4% of the isolates were mobile, 33.9% produced pyocyanin, 41.3% of pyoverdin, 1.8% of pyoverdin but 8.9% of have not had pigmentation feature. Moreover, there has not been detected statistically significant difference between antibiotic resistance and the presence of virulence factors ($p > 0.005$). *P.aeruginosa* virulanns have been highly non-fermenting bacteria that cause community-acquired infections and have been a notable pathogen, especially in patients with weak immune systems, with increased antibiotic resistance and many hospital-acquired infections. We think that examining the antibiotic resistance status and the frequency of

virulence factors that have the potential to change the course of the infection will be useful in terms of providing the basis for possible different therapeutic applications that can target these mechanisms.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Exotoxin A, Exoenzym S, Phospholipase C, Elastase, Antibiotic Resistance.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK SÖZLEŞME	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.2. Patogenez ve İmmunité	5
2.2.1. Adhesinler	6
2.2.2. Polisakkarit Kapsül	6
2.2.3. Endotoksin	6
2.2.4. Piyosiyanın	7
2.2.5. Eksotoksin A	7
2.2.6. Eksoenzim S ve T	7
2.2.7. Elastaz	8
2.2.8. Alkalın Proteaz	8
2.2.9. Fosfolipaz C	8
2.2.10. Rhamnolipid	9
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarında Antibiyotik Direnci	9
2.4. Epidemiyoloji	10
2.5. İnsanda Yaptığı Hastalıklar	10
2.5.1. Akciğer Enfeksiyonları	11
2.5.2. Primer Deri Enfeksiyonları	11
2.5.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları	11
2.5.4. Kulak Enfeksiyonları	12
2.5.5. Göz Enfeksiyonları	12
2.5.6. Bakteremi ve Endokardit	12
2.5.7. Diğer Enfeksiyonlar	13
2.5.8. Laboratuvar Tanısı	13
2.5.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Bakterilerin İdentifikasyonu ve Fenotipik Yöntemlerin Çalışılması	15
3.1.1. Kanlı Agar Besiyeri	15
3.1.2. Mueller Hinton Agar	15
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	15
3.3. Pigment Varlığının ve Tipinin Değerlendirilmesi	16
3.3.1. Besiyerler	16
3.3.1.1. <i>Pseudomonas</i> F agar (King B) Besiyeri	16
3.3.1.2. <i>Pseudomonas</i> P agar (King A) Besiyeri	16

3.4. Hareket Besiyeri	17
3.5. İzolasyon Aşaması	17
3.6. PCR Aşaması	18
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	18
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA.....	21
6. SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	33



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. KİNg A ve King B besiyerinde Pigment varlığının gösterilmesi 16

Şekil 3.2. Hareket besiyerinde Hareket özeliğinin saptanması 17



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	9
Tablo 3.1. PCR aşamasında kullanılan primerler tabloda gösterilmiştir.	18
Tablo 4.1. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının izole edildiği örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı.....	19
Tablo 4.2. <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları.....	20
Tablo 4.3. <i>P. aeruginosa</i> suşlarının izole edildikleri örneklerle göre virulans faktörlerinin dağılımı.....	20



KISALTMALAR

DNA	: Deoksinükleik Asit
EF2	: Elongasyon faktör 2
EXO S	: Eksoenzim S
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
GTP	: Guanosin trifosfat
İBL	: İndüklenebilir beta-laktamaz
LasA	: Proteaz
LasB	: Elastaz
LPS	: Lipopolisakkarid
PLC	: Fosfolipaz C
rRNA	: Ribosomal RNA
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TOX A	: Eksotoksin A

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), özellikle kistik fibröz (KF) hastaları başta olmak üzere çoğunlukla bağışıklık sistemi baskılanmış veya yeterli durumda olmayan bireylerde kronik enfeksiyonlara sebep olan Gram negatif fırsatçı bir patojen olarak bilinmektedir. Genellikle toprak ve suda yaşayan *P. aeruginosa*, hastanelerin yanık üniteleri, entübasyon tüpleri ve stentler gibi birçok implante medikal cihazlarda dahi bulunabilmektedir. Yüksek morbidite ve mortalite özelliği sayesinde birçok farklı dokuyu enfekte ederek enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyona rapor edilmektedir. Bu enfeksiyonların yaklaşık %13'ünün (6000) birçok ilaca karşı direnç gösterdiği ve 400 insanın ölümü ile sonuçlandığı bilinmektedir (Lambert, 2002: 23).

P. aeruginosa fırsatçı bir mikroorganizma olup, gıdalara ve gıda ile temas eden yüzeylerde tutunup, biyofilm oluşturabilme kabiliyetine sahip mikroorganizmaların arasında bulunmaktadır. Etken çoğunlukla nosokomiyal ve immün sistemi baskılanmış konakçılarda enfeksiyonlara neden olur. Etkenin biyofilm içinde üremesi ve antibiyotik direnci nedeniyle eradikasyonu güçtür (Public Health England, 2015: 2). Kan dolaşımına karışmak suretiyle yayılan bakteri konağa kolonizasyon neticesinde fosfolipaz, elastaz, piyosiyenin, alkali proteaz, benzeri virülans faktörleriyle doku hasarlarına sebep olmaktadır (Karatuna ve Yağcı, 2008: 42).

Sık antibiyotik kullanan kişilerde gastrointestinal kolonizasyon olabilmektedir. *P. aeruginosa*, çok çeşitli akut ve kronik (AIDS, akciğer kanseri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, bronşektazi ve kistik fibroz (KF) bulunan hastalarda) enfeksiyonlara neden olur. *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının %10-25'inin nedeni olarak görülmektedir (Gülseren ve ark. 1999: 373). Bu nedenle, patojenik mekanizmalarını spesifik olarak hedefleyerek elde edebilen *P.aeruginosa* enfeksiyonları için yeni terapötik seçenekler bulmak önemlidir. Patojenik bir bakterinin hastalığa neden olma özelliği, konak dokularına aktif olarak zarar veren toksinler ve adezyon molekülleri gibi "virülans faktörleri" olarak adlandırılan maddelerin üretimine bağlıdır. Virülans faktörlerinin üretimlerini veya işlevlerini inhibe etmek potansiyel olarak yeni bir antibakteriyel strateji araştırmalarında yoğun bir ilgi görmüştür. Bu çalışmalarda patojen etkisiz hale getirilir ve bu patojenin konakçıda çok fazla doku hasarına neden olmadan konakçının bağışıklık

sisteminin enfeksiyondan temizlenme oranını artırır Van (Delden ve Iglewski, 1998: 552).

Bu çalışmanın, amacı *P. aeruginosa* isolatlarında virölans faktörlerinin genotipik ve fenotipik yöntemlerle araştırılarak bu virölans faktörlerinin antibiyotiklere karşı direnç ile ilişkisini araştırmaktır.



2. BÖLÜM

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae ailesine dahil olan *Pseudomonas*, toprakta ve suda yaşamakta olan *non-fermentatif* bakteri topluluğudur. *P. aeruginosa*, insanlarda olduğu gibi hayvanlarda ve bitkilerde de enfeksiyon oluşumuna sebep olmaktadır (Nickerson ve Sinskey, 1977: 306). *P. aeruginosa*, antibiyotiklere karşı dirençli tespit edilmekte ve oluşturduğu enfeksiyonlardan dolayı morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır (Sligl ve ark. 2015: 131). *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* cinsleri içerisinde en sık izole edilmiş olan insan patojenidir. *Aeruginosa* adı mavi-yeşil renkten dolayıdır denilmiştir. Mavi-yeşil renk birçok klinik izolattaki koloniler içerisinde görülmektedir (Brooks ve ark. 1998: 232).

P. aeruginosa'yı ilk olarak 1882'de Gessard, mavi yeşil cerahat etkeni olarak belirlemiştir. *P. aeruginosa* kan dolaşımı, enfeksiyonu etkeni olarak yeni doğanda 1886'da yetişkinde ise 1899'da tespit edilmiştir. Bu konuda çalışmalar yapanlar arasında Hitschman ve Kreibich (1897), Frenkel (1917) ve Osler (1925) sayılabilir. Dooren de Jong 1926 yılında *Pseudomonas* cinsi bakterileri, değişik organik bileşiklerin enerji ve karbon kaynağı şeklinde kullanımını içeren fenotipik özellikleri açısından gruplandırmıştır (Aydın, 2001: 15). Buchanon, Holt ve Lessel 1966'da fenotipik özelliklerini dikkate alarak gruplandırmıştır. Palleroni ve arkadaşları (1973), *Pseudomonaslar*ı rRNA homolojilerini 5 grup halinde incelemiştir. 1900'lü yılların sonlarında insan vücudunun hemen hemen bütün bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilen *Pseudomonas aeruginosa*nın 1980 senesinden sonra hastane enfeksiyon etkeni olarak görülmeye başlamıştır (Kayse ve ark. 1997: 230).

2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa uygun besiyerinde hafif alkali ortamlarda, optimum 30-37 °C sıcaklıkta gelişir ve 41°C'de üreyebilir. Bu ısıda üreyebilmesi onun önemli bir özelliğidir ve arka arkaya 3 pasajda 42 °C'de üreyebilmektedir. Aerob olmasının yanında denitrifikasyon özelliğinde bulunduğu anaerob üreyen çeşitleri de bulunmaktadır. Sıvı olan besiyerinde ise yüzeyde zar yaparak homojen ve yoğun şekilde üreyebilir ve zarın alt kısmında mavi yeşil pigmenti ayırt edilebilmektedir. Uzun müddet beklemiş

kültür ortamları zaman geçtikçe alkali hale dönüştüğünden bakteriler litik fermentlerle erir ve bunun sonucunda da sıvı besiyerini daha berrak hale gelir (Aslan, TY: 2).

Bazıları hücre dışına alginat salgıladıkları için mukoid koloniler yaparlar. Ayrıca % 5 koyun kanlı agarda kolonileri basık, R koloni biçiminde olup beta hemoliz yaparlar. Kültürlerinde tatlımsı, olgunlaşmış üzüm veya aromatik meyve trimetilamin kokusuna benzer bir özel bir koku oluşturlar (Forbes ve ark. 2002: 366).

P. aeruginosa'nın dayanıklılığı, nemli ortamları sevmesi, üremesi için fazla besine gereksinim duymaması, antibiyotiklere ve birçok antiseptiğe dirençliliği, hastaneler gibi dış ortamlarda kendisine yaşama alanı bulmasını daha kolay hale getirmektedir. Dezenfektanlarda üreyerek hastane enfeksiyon salgınlarına neden olabilir. Yüzeysel deri enfeksiyonlarından fulminan sepsise kadar oldukça geniş bir yelpazede yer alan hastalıklara sebep olur (Blondel-Hill, 2007: 25).

Pseudomonas türleri 0.5-1.0 ve 1.5–5.0 µm boyutlarında, hafif veya düz kıvrımlı, sporsuz, aerob, gram-negatif çomaklardır (Murray ve ark. 2007: 735). *P. aeruginosa* besiyerlerinde farklı koloni morfolojilerinde rastlanabilmektedir. Doğal ortamdan, su ve toprakta izole edilenler küçük, kaba koloniler meydana getirir. Klinik materyallerden üretilenler ise iki çeşit olur. Bunlardan birincisi kalkık kenarlı ve düz, yumuşak, büyük koloniler (non-mukoid) meydana getirir. İkincisi ise daha virulan tiptedir ve bu tipte bir tür ekzopolisakkarit olan alginat üretimi neticesinde mukoid tipte koloniler oluşmaktadır (Theilacker ve ark. 2003: 3876).

Birçok *Pseudomonas* suşları kültür ortamında pigment üretmektedirler ve üretilen bu pigmentler kültür ortamının şartlarına göre değişir. Mutasyon durumunda bu özellik ortadan kalkar veya aynı zamanda daha çok pigment üretimi meydana gelebilir. Bunlar oksijenin olmadığı bir ortamda meydana gelmezler, oda sıcaklığı oluşmaları için uygun ortamdır. *P. aeruginosa* mavi-yeşil bir pigment olan piyosiyenin üretebilir. Piyosiyenin; fenazin yapısındadır, çoğunlukla mavi yeşil renklidir ve koloni de bu renklerde olur. Bu pigment sadece aerob ortamda meydana gelir ve tanı değeri yüksektir. King A besiyeri kullanmak suretiyle Piyosiyenin üretimi arttırmak mümkündür. Pyoverdin suda çözünen mavi renkli piyosiyeninle birleştğinde parlak yeşil renk meydana getirirler (Şen Akoğlu, 2006: 3). Pyorubin kırmızı renkte ve pyomelanin kahverengi pigmentlerdir. Varlıkları

halinde pyosiyanini maskeleyebilirler. Az sayıdaki kökenleri pigment oluşturmazlar (Brooks: 1998: 233).

Piyosiyanin meydana gelmesi üreme ortamı ile ilgilidir. Ortamda bulunan yüksek fosfat konsantrasyonlarında üreme daha fazla olmaktadır. Stoklanmış olan kültürlerde pigment oluşturma özelliklerini yok olabilir. *P. aeruginosa*'nın suda ve kloroformda eriyen pyosiyanin pigment ve suda eriyen piyoverdin pigmentinin bir araya gelmesi neticesinde karakteristik parlak yeşil rengi meydana gelir. *P. aeruginosa*'nın bazı kökenleri piyorubin ve kahverengi-siyah bir pigment olan piyomelanin de ortaya çıkartabilir. *Pseudomonas aeruginosa* kökenleri, farklı şartlarda polisakkarit yapıda kapsüle benzeyen yapılar ortaya çıkar. Bu yapı hücre haricinde bulunur ve bu yapıya slime tabakası adı verildiği gibi mukoid ekzopolisakkarit ya da glikokaliks adı verilmektedir (Denton ve Wilcox, 1997: 469).

Pseudomonas'larda fazla miktarda plazmid mevcuttur. Bu plazmidler bir taraftan metabolizma ile ilgili olaylarda, antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasında rol alırlar. *Pseudomonas*'larla enterik bakterilerin gen haritaları arasında farklılıklar mevcuttur. Bu farklılardan, bakteriyosin yapımını sağlayan genlerin, enterik bakterilerde plazmidlerde yer alırken, *Pseudomonas*'larda kromozoma yerleşmiş olmasıdır. *Pseudomonas*'ların türü kökenlerince oluşturulan bakteriyosinlere piyosin ve aeuginosin de denmektedir. *P. aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosiyanin çeşidi tespit edilmiştir (Erdem, 1999: 552).

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmek yerine karbonhidratları oksidasyon yolu ile parçalar ve asit meydana getirir. *P. aeruginosa* oksidaz pozitifdir. Sitokrom C oksidaz ihtiva etmeleri *Pseudomonas* türünü Enterobacteriaceae familyasından farklı kılan en önemli özelliklerdendir. *Pseudomonas* cinsini zorunlu aerob yapar. Ancak *P. aeruginosa* anaerobik şartlarda da yaşayabilir, bu farklılığı terminal elektron alıcı olarak nitrati kullanabilme özelliğinden kaynaklanır ve *P. aeruginosa* değişik çevre şartlarında varlığını sürdürebilmektedir (Maçın, 2014: 15).

2.2. Patogenez ve İmmunité

2.2.1. Adhesinler

P. aeruginosa'nın konak hücrelere yapışmasında piluslar ve adhesinler rol oynar. Pili epiteliyal hücrelere bağlanmada önemli rol oynar. *Neisseria gonorrhoeae*'de de benzer bir yapı bulunmuştur. *P. aeruginosa* ayrıca nöraminidaz üretir. Nöraminidaz'ın görevi pili reseptöründen sialik asit artıklarını uzaklaştırmaktır (Gacar, 2005: 12). Çoğunlukla prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değildir. *P. aeruginosa*'da pili seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında kolonizasyona ve hızla yayılmaya yardım eder (Karatuna, 2008: 44).

2.2.2. Polisakkarit Kapsül

P. aeruginosa'nın farklı şartlarda meydana getirdiği polisakkarit kapsüle “slime tabakası” adı verilmektedir. Bu tabaka, konak bağışıklık sistemini etki altına alarak bakterinin konak cevabından kurtulmasını sağlamaktadır (Lagournintzis, 2003: 4615). Mikroorganizmanın nötrofil ve fagositlere karşı korumaya yardım eder. Bunun yanında bakteriyi opsonizasyondan ve kompleman sisteminden korumaktadır. Bunun yanında makrofajları ve monosit stimüle etmektedir. Lenfositler üzerine mitojenik etkiye sahiptir. T hücrelerinde agregasyona sebep olur, monositlerden de Tümör Nekrozis Faktör (TNF) salgılanmasını arttırır. Sonuç olarak sistemik dolaşımdaki septik çok mediatörlerinin yükselmesine neden olarak *P. aeruginosa*'ya bağlı septik çok patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Lagournintzis, 2003: 4616).

2.2.3. Endotoksin

Endotoksin gram-negatif bakterinin dış hücre duvarında lipopolisakkarid molekülünün lipid A fraksiyonudur. Gram-negatif bakterilerin neden olduğu sepsiste üzerinde en çok çalışılan ekzojen mediatörüdür ve bu hücre duvar komponentlerinden endotoksinler, sepsisi tetikleyen moleküllerin başındadır. Lipopolisakkarid (LPS) yapıdaki endotoksinin patogenezdaki rolü mevcuttur. Gram-negatif bakteri hücre duvarın en dışında olan O-antijeni, kor polisakkaridi ve LPS tabakasından meydana gelmiştir. Doymuş yağ asitlerinden oluşan lipid-A, gram-negatif bakterilerde ishal, ateş ve şok benzeri belirtilere sebep olan endotoksin aktivitesine neden olan tabakadır (Ural, 2018, 22).

2.2.4. Piyosiyanin

Piyosiyaninin epidermis çoğalmasını durdurduğu, kalsiyum homeostazını ve siliyer fonksiyonları bozduğu, hücre solunumunu inhibe ettiği, prostasiklin salınımına sebep olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında Piyosiyanin α 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozarak akciğerlerde hasar oluşmasına neden olmaktadır (Mavrodi, 2001: 6455).

P. aeruginosa'nın ürettiği mavi pigment; oksijenin toksik formu olan süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini katalizle eder. Piyosiyanin (demir bağlayan siderofor) varlığında doku hasarına sebep olan daha toksik hidroksil radikalleri üretilir. Bu pigment ayrıca inflamatuvar cevabı uyarır. Bazı bakterilerin üremesini engelleyip *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunu kolaylaştırır (Gacar, 2005: 13).

2.2.5. Eksotoksin A

Eksotoksin A (*Tox A*) en önemli virulans faktörüdür. Bu toksin; ökaryotik hücrelerde protein sentezini durdurur (Vasil, 1977: 354). Ekzotoksin A hücre dışı bir enzimdir ve birçok *P. aeruginosa* kökenince yapılmaktadır. Konak hücrenin protein sentezini engellemekte ve adenosindifosfatın transferini katalize etmektedir. Bu reaksiyon elongasyon faktör 2'yi (EF2) inaktive ederek protein sentezini inhibe etmektedir. Ekzotoksin A, bakteriyel invazyonda ve lokal doku hasarında önemli bir etkidir (Koneman, 2006: 304).

2.2.6. Eksoenzim S ve T

Eksoenzim S (*Exo S*) ve Eksoenzim T *P. aeruginosa* sentezlenen ekstrasellüler enzimlerdir. Ekzotoksin A ve eksoenzim S ADP- ribozil transferaz olarak rol oynar (Nicas ve Iglewski, 1985: 388). Ekzotoksin A'dan farklı olarak, eksoenzim S, elongasyon faktör 2'yi ADP ribozillemez. Buna karşın düşük molekül ağırlıklı hedef hücrelerde proteinleri baskılar. İki aktif bölgesi ve iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. Yaralara, yanık ve kronik akciğer enfeksiyonlarına neden olan ve bakterinin yayılmasını sağlayan önemli virulans faktörleridir. Ekzotoksin A ve Eksoenzim S birlikte enfekte olan hastalarda, mortalite yüzdesi daha fazladır. Eksoenzim T hücre içerisine maddelerin girişini kolaylaştırır. Yara iyileşmesini engelleme özelliğiyle eksoenzim T, küçük virulans

faktörlerdendir (Smith ve Iglewski, 2003: 1461).

2.2.7. Elastaz

Elastini sinerjistik olarak indirgeyen iki enzim olan *LasA* (serin proteaz) ve *LasB* (elastaz) diğer elastin ihtiva eden dokulardaki hasar ile akciğer parankim dokusu ve yaygın *P. aeruginosa* enfeksiyonu neticesinde meydana gelen hemorajik lezyonlarla (ektima gangrenozum) ilişkilidir. Bu iki enzim kompleman bileşenlerini indirgeyerek, nötrofil kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederek akut enfeksiyonlarda doku hasarına neden olur. Kronik *Pseudomonas* enfeksiyonları enfekte dokuda immün kompleks birikimi ile birlikte, *LasA* ve *LasB*'ye karşı antikor oluşumu ile karakterizedir (Murray, 2002: 298).

Elastin akciğerlerin daralıp genişlemesine imkân tanıyan bir proteindir. Hücre dışına tip 2 salgı sistemi vasıtasıyla salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasar oluşmasına sebep olmakta, kompleman ya da serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar. Damar duvar yapısında da bol miktarda elastin bulunduğundan, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur. IgG'yi, fibrini, kollajeni, sürfaktan proteinleri D ve A'yı parçalamaktadır. Bunun yanında solunum yolu epitellerindeki sıkı bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenlik seviyesini yükseltir ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının artmasına sebep olur (Wick, 1999: 257).

2.2.8. Alkalın Proteaz

Alkalın proteaz, yüksek proteolitik aktivite ihtiva etmektedir. 49 kDa ağırlığındaki enzim *apr* geni tarafından kodlanmıştır ve enzim en iyi alkali pH düzeylerinde etkinlik göstermektedir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesi enfeksiyonun yayılmasına sebep olabilir (Hobden, 2002: 392).

2.2.9. Fosfolipaz C

Fosfolipaz C (PLC) lipid ve lesitinin yapısını bozarak dokunun parçalanmasını sağlayan ısı-labil hemolizindir. Hemolizin üretimi ve hastalık oluşumu arasında önemli bir ilişki olmasına rağmen bu enzimin solunum ve üriner sistem enfeksiyonundaki rolü açık değildir (Gacar, 2005: 14).

2.2.10. Rhamnolipid

Lesitin içeren dokuları yaran, parçalayan ısı-dayanıklı hemolizindir. Aynı zamanda solunum yolundaki siliar aktivitenin baskılanmasından sorumludur (Gacar, 2005: 14).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnci

Beta-laktam antibiyotikler, hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavi edilmesinde yararlanılan antimikrobiyal ilaçların önde gelenidir. Fakat bu geniş kullanımın yanında bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta-laktam antibiyotiklere direnç seviyesinin sürekli yükseldiği gözlenmektedir (Ayaz, 2008: 36). *P. aeruginosa* sefalosporinaz oluşturmaları, efluks pompaları ve düşük intrinsik dış membran permeabiliteleri ile kombine direnç mekanizmalarına sahiptir. *P. aeruginosa*'da geniş spektrumlu beta-laktamlara direncin ana sebepleri sefalosporinazların aşırı sentezlenmesi ve/veya Sınıf A, B ve D beta-laktamazlardır (Bert ve ark. 2002: 12). Bunun neticesinde çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas* enfeksiyonları, uygun olmayan ilaç kullanımı ile beraber hastane enfeksiyonlarında önemli zararlar doğurmaktadır. Plazmid kontrolünde bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve kromozomal indüklenebilir beta-laktamaz sentezleyebilen suşların tespit edilmesi, tedavi sırasında kullanılabilecek antibiyotiklerin belirlenmesinde önemli bir etkidir (Walsh, 2002: 2756). *P. aeruginosa* 'nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları Tablo 1'de gösterilmiştir (Gacar, 2005: 16).

Tablo 2.1. *P. aeruginosa* 'nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

Antibiyotik	Direnç Mekanizması
B-laktam antibiyotikler	B-laktam hidrolizi,
	Düşük permeabilite,
	Penisilin bağlayan proteinlerin değişimi
Aminoglikozidler	Adenilasyon, asetilasyon, veya fosforilasyon ile enzimatik hidroliz,
	Düşük permeabilite,
	Ribozomal hedefin değişimi
Kloramfenikol	Asetiltransferaz ile enzimatik hidroliz,
	Düşük permeabilite
Florokinolonlar	Düşük permeabilite,
	Hedefin değişmesi (DNA giraz)

2.4. Epidemiyoloji

P. aeruginosa sağlıklı kişileri nadiren de olsa kolonize edebilir. Kolonizasyon invaziv enfeksiyona dönüşebilir. Altta yatan risk faktörü olanlarda %50 oranında kolonizasyon invaziv *P. aeruginosa* enfeksiyonuna ilerleyebilir. Hastane enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bakterilerden biridir. Hastane ortamında *P. aeruginosa*'nın kaynak ve yaygınlığının belirlenmesi enfeksiyonun etkin epidemiyolojik kontrolü için gereklidir. Yanık hastalarının derilerinde, solunum cihazına bağlı hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal sisteminde ve antibiyotik alan hastalarda %50 oranında taşıyıcılık olabilmektedir (Shannon ve French, 2004: 819). Hastane çevresinde; çiçekler, hasta çıkartıları, tuvaletler, solunum ve diyaliz cihazları, lavabo gibi nemli bütün ortamlarda ve dezenfektan solüsyonlarda yaşayabilirler. Özellikle hastane enfeksiyonlarında hastaların bağırsak floralarında *P. aeruginosa*'nın yerleşmesi önem taşır. İnsanlarda ve özellikle çeşitli nedenlerle savunma mekanizmaları zayıflamış kişilerde önemli hastalıklar oluştururlar. Hastalığın oluşumunda mevsimsel farklılık görülmez. Hastanede yatan hastaların solunum ve gastrointestinal sistemlerinde geçici olarak yerleşirler (Murray ve ark. 2002: 298).

2.5. İnsanda Yaptığı Hastalıklar

P. aeruginosa sağlıklı bireylerde enfeksiyona neden olabilir. Ancak daha çok pek immun yanıtı bozulmuş bireylerde, ayrıca hayvanlarda ve bitkilerde hastalık oluşturabilmektedir (Çelik, 2009: 37).

2.5.1. Akciğer Enfeksiyonları

P. aeruginosa ile solunum yolu enfeksiyonu altta yatan predizpozan bir enfeksiyon mevcut olmadan çok az görülmektedir. Nozokomiyal pnömonilerin yaklaşık % 16'sının oluşturarak *S aureus*'tan sonra ikinci sırada bulunmaktadır (Vahaboğlu ve Akhan, 2002: 1609). Bazı hastalardan izole edilen mukoid suşların antibiyotik tedavisi ile yok edilmesi zordur. İmmün yetmezliği olan hastalarda *Pseudomonas* enfeksiyonlarını hazırlayan en önemli iki faktör: 1) Normal bakteri topluluklarını azaltan hatta yok eden geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi, 2) Alt solunum yollarına (alveoller gibi) bakterilerin geçişini kolaylaştıran solunum cihazlarının kullanımınıdır. Bu tür invazif hastalıklar küçük apse oluşumu ve doku nekrozunun eşlik ettiği yaygın tipik iki taraflı bronkopnomoni ile karakterizedir. Ölüm oranı yaklaşık %70 olarak bildirilmektedir (Murray ve ark. 2002: 299).

2.5.2. Primer Deri Enfeksiyonları

Ciddi yanığı olan hastalarda, yaraların kolonizasyonu, çoğunlukla lokalize damar hasarı, doku nekrozu ve bakteriyemi ile sonuçlanabilir. Yanık yüzeyinin nemli olması, yaraya nötrofillerin girişinin yetersizliği, hastaları *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına yatkın hale getirir. Sıcak su muslukları ve yüzme havuzları gibi yerlerdeki bulaşlı suyla temas sonucu gelişen ve *P. aeruginosa* ile oluşan enfeksiyonlardan biri de follikülitlerdir.

Bakteriyemi sırasında ektima gangrenozum lezyonları dışında selülit, subkütan nodüller, veziküler ve püstüler lezyonlar, bül, derin apseler, nekrotizan fasiit gelişebilir (Murray ve ark. 2002: 299).

2.5.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Çoğunlukla hastanede yatan hastalarda böbrek transplantasyonu, cerrahi girişim sonrası ya da sonda kullanılması ile oluşabileceği gibi bakteriyemi ile de oluşabilir. Hastane ortamından alınan üriner sistem enfeksiyonlarında, *Pseudomonas*lar üçüncü sıklıkta bulunmuştur (Bilgehan, 1995: 162).

2.5.4. Kulak Enfeksiyonları

Pseudomonas sağlıklı kişilerde nadiren bulunmasına rağmen, yaralanma, inflamasyon, nem ve varsa dış kulakta kolaylıkla yerleşir. Dış kulak enfeksiyonlu hastalardan sıklıkla izole edilebilir (Murray ve ark. 2002: 299). Yüksek ısı ve nem, kulağı yabancı cisimle karıştırma, dış kulak yolunun gereğinden fazla temizlenmesi enfeksiyona yatkınlığı artıran sebepler arasındadır (Topal, 2018: 45). Ayrıca yeni doğanlarda orta kulak enfeksiyonlarında sebep olabilir. Bağışıklık sistemi zayıf ya da diabetes mellitus hastalarında orta kulak veya dış kulak enfeksiyonlarından sonra mastoidit görülebilir (Murray ve ark. 2002: 300).

2.5.5. Göz Enfeksiyonları

Göze yabancı cisim ile penetran travma sonrası veya kontamine damlaların damlatılması ile gelişebilen ve bazen görme kaybı ve endoftalmite neden olabilecek enfeksiyonlardır. Yenidoğanda damlacık enfeksiyonları da bu sonuca ulaşabilir. Göz enfeksiyonları konjonktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmit şeklinde gelişebilirler. Kontamine kozmetik ürünleri, kontakt lensler ve lens solüsyonları bu tür enfeksiyonların oluşmasına neden olabilmektedir (Çelik, 2009: 36).

2.5.6. Bakteremi ve Endokardit

P. aeruginosa'ya bağlı baktereminin diğer gram negatif bakteremilerden ayırt edici bir yönü yoktur. Ancak, organizmanın bağışık yanıtı düşük hastaları seçmesinden ve *Pseudomonas*ın virulansından dolayı ölüm oranı daha yüksektir. Bakteremi sıklıkla nötropeni, diyabetes mellitus, şiddetli yanıklarda ve hematolojik kanseri olan hastalarında görülür. Pek çok bakteremi, alt solunum yolu, üriner sistem, deri ve yumuşak doku (genelde yanık yara enfeksiyonu) enfeksiyonu ile ilişkilidir. Bakteremi hastalarının pek azında saptanmasına rağmen karakteristik deri lezyonları (ecthyma gangrenosum) gelişebilir. Lezyonlar kanamalı, nekrotik, ve ülser haline gelen eritemli veziküller olarak

açıkça görülür. Lezyonların mikroskopik incelemesinde, nütropenik hastalardan beklendiği gibi organizmanın çok sayıda bulunması, damarlarda deformasyon ve nötrofil eksikliği (ya da yokluğu) görülür. *Pseudomonas* endokarditi, damariçi ilaç bağımlılarında sık görülmektedir. Enfeksiyon hastalar tarafından, suda yaşayan organizmalarla kontamine enjektör, kaşık gibi ilaç alımında kullanılan araçlarla alınır. Trikuspit kapakçık enfeksiyonu olan hastalar aortik veya mitral kapak enfeksiyonu olan hastalardan daha kronik seyir ve prognoz gösterir (Murray ve ark. 2002: 301).

2.5.7. Diğer Enfeksiyonlar

P. aeruginosa ayrıca gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi ve iskelet kası enfeksiyonlarında da görülür. Enfeksiyonların pek çoğunun oluşumunda altta yatan sebepler: Organizmanın nemli, rutubetli yerlerde yaşaması, konak savunmasından kaçması, kutanöz travma, antibiyotik kullanımı veya ile normal floranın bozulmasıdır. İmmün yetmezliği olan hastalarda tüm *Pseudomonas* türleri fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. Akciğer enfeksiyonu olan hastalarda solunum sisteminde, üriner katateri olan hastalarda üriner sistemde yerleşirler (Murray ve ark. 2002: 301).

2.5.8. Laboratuvar Tanısı

P. aeruginosa tanısında alınacak örnekler deri lezyonları, cerahat, idrar, kan, spinal sıvı, balgam vb. olabilir. Laboratuvarlarda kanlı agar ve EMB agar gibi rutinde kullanılan besiyerlerinde 30-37°C’de kolaylıkla ürer (Murray ve ark. 2002: 302). Aerobik inkübasyona gereksinim duyarlar, böylelikle buyyonda üremeleri oksijen oranının yüksek olduğu buyyon-hava ara yüzünde sınırlı kalır. Koloni büyüklüğü, hemolitik aktivite, pigmentasyon, koku ve koloni özellikleri ile pozitif oksidaz reaksiyonu ve fermentasyon yapmaması gibi hızlı biyokimyasal test sonuçları bu bakterinin ilk tanımlanmasında önemlidir. *P. aeruginosa* hızlı üreyen, beta hemolitik, düz ve yaygın R tipi kenarlı koloniler oluşturur. Pyosiyenin üretimi ile mavi pigmentasyon, sarı-yeşil pigment (pyoverdin) ve karakteristik tatlı üzüksü kokuya sahiptir. Bu konvansiyonel yöntemlerin yanısıra ve otomatize ticari identifikasyon sistemleri mevcuttur (Hall, 2015: 475).

2.5.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol

P. aeruginosa'nın değişik direnç paternlerinin bulunması, dirençli suşların artması ve hastanelerdeki fazla miktarda antibiyotik kullanılması son senelerde çoklu antibiyotik direnç paternli *P. aeruginosa* suşlarının artmasına sebep olup, ortaya çıkan enfeksiyonların tedavilerinde sorunların oluşmasına sebep olur. Beta-laktam ajanlara karşı gösterdiği dirençte beta-laktamaz yapımı, hücresel geçirgenliğin daha az hale gelmesi ve antibiyotiğin hedef bölgesinde farklılık gibi birçok değişik mekanizmanın etkisi bulunmaktadır. Ayrıca çoklu ilaç direnci olan *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde antipseudomonal ßlaktam ile birlikte aminoglikozid veya florokinolon kullanmak tedavide etkili olabilir. Genel olarak bakıldığında karbapenemler *P. Aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde en güvenilir ajanlarken günümüzde *P. aeruginosa*'nın karbapenemlere direncinde giderek artış görölmektedir. Yapılan çalışmalarda karbapenemlerin kullanımında görölen önemli artışın imipenem ve meropenem dirençli *P. aeruginosa* yaygınlığındaki artışla sıkı ilişkisi saptanmıştır (Xu ve ark. 2013: e78604). *Pseudomonas*'ları hastane ortamından yok etmeyi denemek pratik olarak mümkün değildir. Etkili bir enfeksiyon kontrolü için solunum ekipmanı ve diyaliz cihazlarının bulaşıdan olabildiğince korunması ve hasta ve sağlık personeli arasındaki çapraz geçişin önlenmesi gereklidir. Normal floranın baskılanmaması ve dirençli *Pseudomonas*'ların ürememesi için geniş spektrumlu antibiyotiklerin gereksiz kullanımının engellenmesi önerilir (Forbes, 2002: 366).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 01.01.2016-01.01.2017 tarihleri arasında gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 80 *P. aeruginosa* izolatu çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'nun onayı (12.02.2013 tarihli ve 17.KAEK-021 sayılı) alınmıştır.

3.1. Bakterilerin İdentifikasyonu ve Fenotipik Yöntemlerin Çalışılması

P. aeruginosa izolatlarının identifikasyonu ve antibiyotik direnç profili Vitek 2 (Biomerioux Fransa) cihazı ile belirlenmiştir. İzolatlar sütlü besiyerinde -80 °C'da muhafaza edilmiştir. Çalışma öncesi izolatlar kanlı agara ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır.

3.1.1. Kanlı Agar Besiyeri

1000 ml Distile su içerisen 40 gr kanlı agar bazı (blood agar base) (Difco) ekleyip pH 7.3 olacak şekilde kanlı agar bazı ile karıştırılarak, otoklavda 15 dakika ve 121°C'de sterilize edip ve 50° C'ye kadar soğuduktan sonra %5-10 kadar EDTA'lı (antikoagülan) steril edilerek insan kanı ilave edilerek karıştırılıp petri kabına dökeriz.

3.1.2. Mueller Hinton Agar

1000 ml distile su içerisine 38 gr mueller hinton agar ekler ve pH 7.3 olacak şekilde hazırlamış olduğumuz karışımı 15 dk ve otoklavda 121°C'de bekletip 50°C'ye kadar soğumasını bekleyip steril petri kaplarına dağıttık.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre Vitek 2 (Biomerioux Fransa) cihazı kullanılarak çalışılmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin, tobramisin), sefalosporinlere (seftazidim, sefepim), florokinolonlara (siprofloksasin, ofloksasin), karbapenemlere (imipenem, meropenem) ve anti-psödomonal penisilinlere (piperasilin) karşı direnç durumu belirlenmiştir.

3.3. Pigment Varlığının ve Tipinin Değerlendirilmesi

3.3.1. Besiyerler

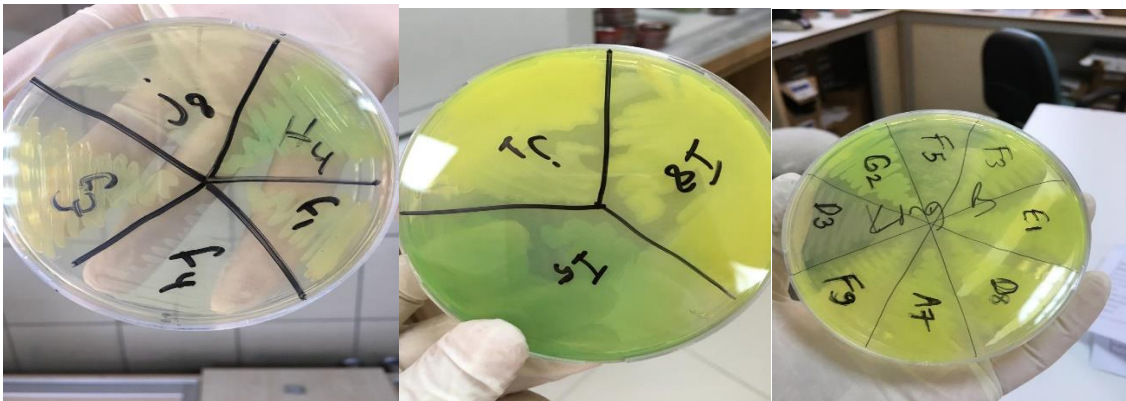
3.3.1.1. *Pseudomonas* F agar (King B) Besiyeri

1000 ml distile su içine 35 gr dehidrate besiyeri (Merck) ve 10 ml gliserol eklenip ve pH 7.3 olacak şekilde besiyer eritilip daha sonra otoklavda 15 dakika 121°C’de sterilize edilip ve petri kaplarına dökülmüştür.

3.3.1.2. *Pseudomonas* P agar (King A) Besiyeri

1000 mlt distile su (H₂O) içerisine 44 gr dehidrate besiyeri (Merck) ve 10 mlt gliserol eklenip pH 7.3 olacak şekilde besiyeri eritilip daha sonra otoklavda 15 dakikada ve 121°C’de sterilize edilip petri kaplarına dökülmüştür.

Virülans faktörlerinden pigment üretimi için *Pseudomonas* P agar ve *Pseudomonas* F agar besiyerlerini kullanılmıştır. Test edilen izolatlar, piyosiyenin oluşumunun saptandığı *Pseudomonas* P agar ve piyoverdin oluşumunun saptandığı *Pseudomonas* F agara çizgi şeklinde ekilmiştir. Her iki plağı 18 ila 24 saat inkübe edildikten sonra UV ışığı altında incelenmiştir. Sarımsı yeşil renkte oluşumlar piyoverdin pigmenti, mavimsi yeşil ya da mavi renkte oluşumlar ise piyosiyenin pigment olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. KİNG A ve King B besiyerinde Pigment varlığının gösterilmesi

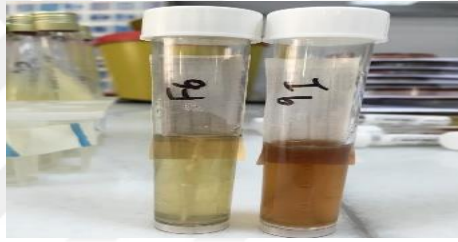
1. Mavi yeşil pigment I₅
2. Sarı yeşil pigment I₈

3. Pigment üretmeyen suş D₃

3.4. Hareket Besiyeri

1000 ml distile suyun içerisine 4gr agar, 10 gr Pepton (Merck), 5 gr Sodyum klorür, 3 gr Sığır özütü ekleyerek ph: 7.4 olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır. Öncelikle distile suyun içerisine peptonları ertikten sonra Sodyum klorür ve Sığır özütü eklenerek besiyeri tüplere dağıtılarak 15 dakika otoklavda 121 °C de sterilize edilmiştir.

Hareket (Twitching) testi için suşların hareket besiyerlerinin dip kısmına kadar özenin iğne kısmı ile batırarak ekimi yapıp, 37 °C'de 24 ile 48 saat arasında inkübe edilmiştir. Kültürde ekim yapılan alanın iyi üremesi ve sisli zon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.



(+)

(-)

Şekil 3.2. Hareket besiyerinde Hareket özeliğinin saptanması

3.5. İzolasyon Aşaması

Real-Time Virulans faktörlerinin PCR ile araştırılması için kanlı besiyerinde 18 ila 24 saat inkübasyon edilip ve ardından Luria-bertani sıvı besiyerinde 18-24 saat inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının santrifüj edildi. Örnekler tüpün altında kalan kısmı fosfat tamponu ile sulandırılarak moleküler testler için kullanılmak üzere hazırlandı.

İzolasyon öncesi kit içeriğinde bulunan liyofilize Proteinaz K ve Carrier RNA yine kit içeriğinde buluna ilgili tamponlar ile sıvı forma geçirildi. Proteinaz K tüpü içerisine 1100 µl PK storage buffer eklenerek, Carrier RNA üzerine 1000 µl Rnase free water ekleyerek vorteks yardımı ile çözülüp homojenize edildi. Her bir örnek için hazırlanmış olan 10 µl Carrier RNA (1mg/ml), 20 µl Proteinaz K (10mg/ml) olacak şekilde karışımı eklendi ve vortex yardımıyla karıştırıldı. *P. aeruginosa* suşlarının

izolasyonları Magnesia 16 (Anatolia Geneworks Türkiye) cihazında yapıldı.

3.6. PCR Aşaması

İzolasyondan sonra PCR işlemi örnek sayısına göre her bir örnek için 0.1 µl olacak şekilde PCR master miksine ekleyip ve pipet yardımı ile homojenize edilerek Montania 4896 Real-time PCR (Anatolia 111 Geneworks, Turkey) cihazı ile tamamlandı. *ExoS* ve *ToxA* için amplifikasyon programları aşağıdaki gibiydi: 95 ° C'de 3 dakika denatürasyon ve 95 ° C'de 15 saniyelik denatürasyon 45 döngü; *ExoS* ve *ToxA* primerleri için sırasıyla 52 ° C'de 45 saniye, *PLC N* ve *Las B* primerleri için sırasıyla 52 ° C'de 45 saniye ve 72 ° C'de 30 saniye uzatma, ardından sıcaklığın 60 ° C'den 90 ° C'ye yükseltildiği son bir uzatma elongasyon adımı şeklindedir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. PCR aşamasında kullanılan primerler tabloda gösterilmiştir.

	Primerler	bp
<i>Las B</i>	(+) CTGCGCGGGTCTATGTGCC	300
	(-) GATGCTGGACGGGTCGAG	
<i>Exo S</i>	(+) CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG	504
	(-) CCGAACCGCTTCACCAGGC	
<i>Tox A</i>	(+) CTGCGCGGGTCTATGTGCC	428
	(-) GATGCTGGACGGGTCGAG	
<i>Plc N</i>	3'-TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG-5'	481
	5'-TCGCTGTCGAGCAGGTCGAAC-3'	

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Tanımlayıcı istatistik olarak kategorik değişkenler için sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. Kategorik değişkenler için gruplar arası farklılık Pearson Ki kare testi kullanılmış olup $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Tüm analizler, IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistics 21.0 programından yararlanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 80 *P. aeruginosa* izolatlarının 30 'u kadın hastalara 50'si ise erkek hastalardan izole edilmiştir. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımına bakıldığında izolatların en çok Göğüs Hastalıkları Servisinden (%13), Dahiliye

Servisinden (%12) ve Kardiyoloji Yoğun bakım (%10) en az ise Anestezi Yoğun bakımdan (%1), Cerrahi Onkolojisinden (%1) ve Üroloji Servisinden (%1) gelen örneklerden üretildiği saptanmıştır. Örneklerin %37.5'i (n=30) yoğun bakımdan gönderilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildiği örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı

Klinik	n	%
Anestezi Yoğun bakım	1	1,3
Beyin Cerrahi Yoğun bakım	4	5,0
Cerrahi Onkoloji Servisi	1	1,3
Çocuk Yoğun bakım	1	1,3
Dahiliye Servisi	10	12,5
Genel Cerrahi Yoğun bakım	5	6,3
Göğüs Hastalıkları Servisi	11	13,8
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	3	3,8
Kardiyoloji Yoğun bakım	8	10,0
Kulak Burun Boğaz Servisi	3	3,8
Kardiyovasküler Cerrahi Yoğun bakım	2	2,5
Nefroloji Servisi	1	1,3
Nöroloji Yoğun bakım	4	5,0
Onkoloji Yoğun bakım	3	3,8
Ortopedi Polkliniği	4	5,0
Ortopedi Servisi	3	3,8
Ortopedi Yoğun bakım	2	2,5
Pediatric Servisi	3	3,8
Plastik Cerrahi	7	8,8
Üroloji Servisi	1	1,3
Üroloji Polkliniği	3	3,8

P. aeruginosa izolatlarının 35'inin (%43.8) balgam, 19'unun (%23.8) yara, 17'sinin (21,3) idrar, 7'sinin (%8,8) kan, 1'inin (%1) steril vücut sıvısı ve 1'inin (%1) burun örneklerinden izole edildiği görülmüştür.

P. aeruginosa izolatlarının en çok piperasilin-tazobaktam (%65) en az ise tobramisin (%6) ve amikasin'e (%6) karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Tablo 4.2) *P. aeruginosa* izolatlarının üretilmiş olduğu örnekler ile izolatların antibiyotiklere karşı direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p \geq 0,05$).

Tablo 4.2. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç oranları

Antibiyotik	n	%
Piperasilin-Tazobaktam	52	65
Seftazidim	27	33.8
Sefepim	30	37.5
İmipenem	34	42.5
Meropenem	32	40
Amikasin	5	6,3
Gentamisin	11	13,8
Netilmisin	9	13,8
Tobramisin	6	7.5
Siprofloksasin	21	26.3
Levofloksasin	19	23.8

P. aeruginosa izolatlarının %81.3'ünün *Tox A*, % 30'unun *Exo S*, %32.5'inin *PLC*, %30'unun *Exo S*, %42.5'inin *Las B* ürettiği saptanmıştır. İzolatların %70.4'ünün hareketli olduğu, %33.9'unun pyosyanin, %41,3'inin pyoverdin, %1,8'nin pyoverdin ürettiği %8,9'unun ise pigmentasyon özelliğinin olmadığı saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının ürettiği örnekler ve virülans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.005$) (Tablo 4.3). Ayrıca antibiyotik direnci ile virülans faktörlerinin varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.005$).

Tablo 4.3. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildikleri örneklere göre virülans faktörlerinin dağılımı.

	Örnek birleş				p
	BALGAM	İDRAR	KAN	YARA	
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	

TOX	Negatif	5(13,9)	4(23,5)	1(12,5)	5(26,3)	0,630
	Pozitif	31(86,1)	13(76,5)	7(87,5)	14(73,7)	
EXO	Negatif	20(55,6)	15(88,2)	7(87,5)	14(73,7)	0,056
	Pozitif	16(44,4)	2(11,8)	1(12,5)	5(26,3)	
PLC	Negatif	27(75)	12(70,6)	4(50)	11(57,9)	0,405
	Pozitif	9(25)	5(29,4)	4(50)	8(42,1)	
LAS	Negatif	20(55,6)	10(58,8)	6(75)	10(52,6)	0,740
	Pozitif	16(44,4)	7(41,2)	2(25)	9(47,4)	
Pyosyanin	Negatif	16(59,3)	7(63,6)	5(83,3)	9(75)	0,612
	Pozitif	11(40,7)	4(36,4)	1(16,7)	3(25)	
Pyoverdin	Negatif	21(58,3)	11(64,7)	4(50)	11(57,9)	0,917
	Pozitif	15(41,7)	6(35,3)	4(50)	8(42,1)	
Pyorubin	Negatif	27(100)	10(90,9)	6(100)	12(100)	0,244
	Pozitif	0(0)	1(9,1)	0(0)	0(0)	
Nonpigmente	Negatif	25(92,6)	11(100)	5(83,3)	10(83,3)	0,479
	Pozitif	2(7,4)	0(0)	1(16,7)	2(16,7)	
HAREKET	Negatif	19(52,8)	9(52,9)	3(37,5)	11(57,9)	0,814
	Pozitif	17(47,2)	8(47,1)	5(62,5)	8(42,1)	

5. TARTIŞMA

P.aeruginosa virulansı oldukça yüksek, non-fermenter bir bakteri olup toplum kökenli enfeksiyonlara, özellikle immün sistemi zayıf hastalarda, birçok hastane kaynaklı

enfeksiyona neden olması ve giderek artan antibiyotik direnci ile dikkat çeken bir patojendir. *Pseudomonas aeruginosa* son yıllarda yükselen insidansı, ürettiği virulans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli artan antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır (Sadikot ve ark. 2005: 1210).

Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi 2016 yılı elde edilen verilere göre, ülkemizde invaziv örneklerden toplam 1466 *P.aeruginosa* izolatu üretilmiştir. Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre *P.aeruginosa* izolatlarında; piperasilin-tazobaktam direnci %30.1, seftazidim direnci % 23.5, sefepim direnci ise %30.5 olarak saptanmıştır. Aminoglikozitlerden gentamisin ve tobramisin direnci % 26.1, amikasin direnci ise %23.2 olarak saptanmıştır. Siprofloksasin ve levofloksasin direnci %37.7, imipenem ve meropenem direnci %46.1 olarak tespit edilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016: 21).

EARSS-Net 2016 Raporuna göre AB ülkelerinde invaziv *P.aeruginosa* izolatlarında piperasilin tazobaktam direnci %0 ile %48.8 arasında, seftazidim direnci %0 ile %44.2 arasında aminoglikozit direnci %0 ile %50.6 arasında, florokinolon direnci %3.6-51.7 arasında, karbapenem direnci % 2.4-51.6 arasında bildirilmiştir (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017: 24). Eldere ve ark. Belçika ve Lüksemburg'daki 40 farklı hastaneden nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş 716 *P. aeruginosa* suşunda mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal ilaç direncini araştırmışlardır. Suşların % 38'i yoğun bakım hastalarından izole edilmiş olup, solunum yolu örnekleri ve idrar örnekleri etkenin en sık izole edildiği örnekler olarak bulunmuştur. Seftazidime karşı direnç oranı % 28,5, sefepime % 29,5, piperasilin/tazobaktama % 17,5, siprofloksasine % 24, amikasin % 10,5 ve gentamisine %23,5 olarak saptanmıştır. Çalışmaya katılan 40 hastanın *P. aeruginosa* antibiyotik direnç oranlarının birbirlerinden anlamlı derecede farklı olduğu bildirilmiştir (Van, 2003).

Durmaz ve ark. *P. aeruginosa* izolatlarında direnç oranlarını amikasinine karşı %43, gentamisine %38, seftazidime %42, sefepime %40, sefoperazon-sulbaktama %44, siprofloksasine %47, levofloksasine %47, piperasilintazobaktama %71, imipeneme %37, meropeneme %37 ve netilmisine %28 olarak bildirmiştir. Özellikle yoğun bakımdan

gelen örneklerden identifiye edilen izolatlarda direnç oranlarının diğer kliniklere göre daha dirençli tespit edildiği vurgulanmıştır (Durmaz ve Toka Özer, 2015: 239).

Ankara’da 2019 yılında yapılan 470 *P. aeruginosa* suşunun dâhil edildiği çalışmada izolatların en sık idrar ve yara sürüntü örneklerinden tanımlanmış olduğu ve amikisine % 8, gentamisine % 20, seftazidime % 19, sefepime % 24, siprofloksasine % 26, imipeneme % 27, meropeneme % 24 ve piperasilin-tazobaktama % 19 oranında direnç tespit edildiği belirtilmiştir (Altunay ve ark. 2019: 64). Kılınç ve ark. izolatların büyük oranda yoğun bakım ünitelerinden elde edildiği çalışmada izolatların en sık (%39.2) üriner sistem ve (%31.8) solunum sistemi örneklerinden elde edildiğini ayrıca levofloksasine %36.4, siprofloksasine %34.6, imipeneme %30, meropeneme %31.2, piperasilin-tazobaktama %57.9, amikisine %11.5, seftazidime %15.9, sefepime %19.5 ve gentamisine %18.6 duyarlı saptanmıştır (Kılınç ve ark. 2015: 67).

Tokat bölgesinde 2013 yılında yapılan çalışmada ise izolatların %34.5 oranıyla en sık solunum yolu örneklerinden tanımlandığı ve %24.6 oranıyla göğüs hastalıkları ve %23.2 oranıyla genel cerrahi servisinden gönderilen örneklerden izole edildiği görülmüştür. Antibiyotiklere direnç oranları; gentamisin için %30, amikasin için %19, seftazidim için %24, sefepim için %19, piperasilin-tazobaktam için %10, siprofloksasin için %45, levofloksasin için %23 olarak tespit edilmiştir. İmipenem ve meropeneme direnç saptanmamıştır (Şay Coşkun ve Coşkun, 2013: 176). Aynı bölgede 2019 yılında yapılan çalışmada ise meropeneme %67, imipeneme %59.8, sefaperazon-sulbaktama % 42.9, seftazidim %23.8, piperasilin-tazobaktam %21.8, siprofloksasin %21.8, sefepim %15.9, aztreonama %13.6 direnç saptanmıştır (Şay Coşkun, 2018: 68). Aynı bölgede yapılan çalışmada direncin artıyor olması dikkat çekicidir.

Bu çalışmada izolatlar bölgemizde yapılan diğer çalışmayla uyumlu olarak izolatlar daha sık solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. İzolatalarda piperasilin-tazobaktama %65, seftazidime %33.8, sefepime %37.5, imipeneme %42.5, meropeneme %40, amikisine %6,3, gentamisine, %13,8, netilmisine %13,8, tobramisine %7.5, siprofloksasine %26.3, levofloksasine %23.8 oranında direnç saptanmıştır. Direnç oranları literatür ile benzer olmakla birlikte diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde aminoglikozidler en etkili ajanlar olarak görülmektedir.

P.aeruginosa patogenezinde rol alan virölans faktörleri olan hücre dışı pek çok faktör görev almaktadır. Bu virölans faktörlerinin patogenezdaki temel mekanizmaları anlamak ve her birinin tedaviyi nasıl etkilediği ya da terapotik bir ajan olarak kullanılabileceğini araştıran çalışmalar önemlidir. Bu amaçla konakçı-patojen etkileşimlerinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir (Veesenmeyer ve ark. 2009: 1778). *P. aeruginosa* virölans faktörleri arasında başta biyofilm olmak üzere ekzotoksin A, aljinat, ekzoenzim S, elastaz ve fosfolipaz, flagella gibi bir dizi virölans faktörüne sahiptir (52).

Maçın ve ark.'nın 2017'de 258 *P. aeruginosa* izolatu ile yaptığı çalışmada suşların 222'sinde (%86) hareket, 190'ında (%73.6) elastaz, 56'sinde (%21.7) piyosiyanın tespit edilmiştir. Piyosiyanın pigmenti ise en sık kan kültürlerinden izole edilirken, pigment üreten suşlarda pigment üretmeyen suşlara göre hareket özelliğinin daha yüksek görülmüştür. Ayrıca pigment üretmeyen *P. aeruginosa* suşlarında pigment üreten suşlara göre daha yüksek antibiyotik direnç oranları saptanmıştır. Pigment üretimlerine göre genotipik virölans faktörleri incelendiğinde; pigment üreten suşların *exoS* gen bulundurma oranı pigment üretimi olmayan suşlara göre daha fazla sahip oldukları görülmüştür. Pigment üretimi olan *P. aeruginosa* suşlarının virölans faktörlerini pigment üretmeyen suşlara göre daha fazla sahip olduklarını ve pigment üretiminin virölansı değerlendirmek açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Maçın, 2014: 19).

Sonbol ve ark. toplam 44 çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın (ÇİDPA) virölans faktörlerinin moleküler analizi ve antimikrobiyal direnç profiliyle incelemişlerdir. Sonuçlara göre hemolitik fosfolipaz C (*plcH*), test edilen ÇİDPA izolatlarında tespit edilirken, eksotoksin A (*toxA*) geni mevcut değildir. Diğer virölans genleri, test edilen izolatlarda değişken yüzde ile tespit edilmiştir. *PilB*, *plcH*, *plcN* ve *algD*, 12 ÇİDPA'nın 11'inde, *LasB* virölans geni ise izolatların dokuzunda tespit edilmiştir (Sonbol ve ark. 2016: 569).

İran'da 100'ü yanık, 50'si yara ve 118'i solunum yolu örneklerinden tanımlanan suşların tamamının 268 *P. aeruginosa* izolatının tamamının *lasB* geni taşıdığı görülmüştür. Solunum yolu ve yanık örneklerinden üretilen izolatlarda *exo S* istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır. *ToxA* gen prevalansı ise akciğer yolu ve yanık izolatlarında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nikbin ve ark. 2012: 119).

Al-Domoshi ve ark.'ı 2018 yılında yaptığı çalışmada aynı izolatlar içinde birden fazla virülans faktörünün bir arada bulunmasının da dikkat çekici olduğunu ortaya koymuştur. *LasB* % 69.23, *ExoA* % 46.15 oranında saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın farklı koşullara uyum sağlayabilen ve bu nedenle çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan, prognozu olumsuz etkileyen ve iyileşmede gecikmeye yol açan bir dizi virülans özelliğine sahip olduğu vurgulanmıştır (Al-Dahmoshi, 2018: 31).

Çeşitli örneklerde virülans faktörlerinin araştırıldığı başka bir çalışmada tüm izolatların *LasB* genini bulundurduğu görülmüştür. Yanık ve solunum sistemi örneklerinden tanımlanan izolatlarında *toxA* geninin varlığı, kandan üretilenlerden önemli ölçüde daha yüksekti saptanmıştır. Bununla birlikte, solunum sistemi örnekleri ve yanık örneklerinden tanımlanan izolatlarda *exoS* pozitifliği ile kandan elde edilenden arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bazı virülans genleri ile enfeksiyon kaynakları arasındaki önemli korelasyonlar, enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının, *P. aeruginosa* izolatları arasında virülans genlerinin yayılmasını kontrol etmeye yardımcı olacağı belirtilmiştir (Genetic Identification of Pseudomonas, 2015: 31).

Ventilatör ilişkili pnömoni etkeni olarak tanımlanmış 173 adet *P. aeruginosa*'nın %58,9'unda *exoU*, % 46.1'inde *exoS*, % 41.2'sinde *lasB*, % 20.5'inde *toxA* tespit edilmiştir (Hassuna, 2010: 589). *P. aeruginosa*'da virülans genleri ile biyofilm oluşumu arasında ilişki tespit eden bir çalışmada (n=47) 45 izolatta (% 95.7) *toxA* geni, 42 izolatta (% 89.4) *algD* geni, 42 izolatta (% 89.4) *pslA*, 41 izolatta (% 87.2) *pelA* ve 19 izolatta (% 40.45) *nan1* gen saptanmıştır. Sonuç olarak *P. aeruginosa*'da virülans genleri ile biyofilm oluşumu arasında ilişki olduğu tespit etmişlerdir (Elmaraghy ve ark. 2019: 9).

Toplam 134 *P. aeruginosa* izolatında virülans genlerinin geleneksel multipleks PCR ile araştırıldığı başka bir çalışmada izolatların sırasıyla % 93, % 90, % 88, % 57 ve % 43'ünde *phz*, *lasB*, *toxA*, *exoS* ve *exoU* genlerini bulundurduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direncinin ve virülans faktörlerinin ve üretilen toksinlerin izlenmesinin, salgınlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda bakteriyel virülansı değerlendirmek için önemli olduğu önerisinde bulunulmuştur (Rania Abozahra, 2021: 101).

Sharifi ve ark. 2019 yılında İran'ın güneydoğusundaki dört hastanesinden izole edilen 208 *P. aeruginosa* izolatının tamamının polimiksin-B ve kolistine duyarlı

olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, izolatların% 40.4'ü ÇİD olup, bunların arasında üçüncü kuşak sefalosporinlere, aminoglikozidlere ve karbapenemlere direnç sırasıyla % 47.5, % 32.3 ve % 40'tır. *ExoA*, *exoS*, *exoU*, *pilB* ve *nan1* prevalansı sırasıyla % 98.8, % 44, % 26, % 8.3 ve % 33.3 olarak tespit edilmiştir (Sharifi, 2019: 807).

Örneklere göre virülans faktörlerinin ve antibiyotik direncinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşlar ile diğer örneklerden izole edilen suşlar arasında hem ortalama total proteaz ve elastaz aktivitesi açısından hem de antibiyotiklere direnç oranları yönünden fark bulunmamıştır. Her iki grup için en fazla direnç seftazidim (sırasıyla %67.9 ve %57.9) ve sefoperazona (sırasıyla %49.3 ve %48.7) karşı tespit edilmiştir (Demir ve ark. 2008: 198).

Literatür değerlendirildiğinde hem örneklerin hem de antibiyotik direncinin virülans faktörleri ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunduğu gibi, ilişkinin olmadığını tespit eden çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %81.3'ünün *Tox A*, % 30'unun *Exo S*, %32.5'inin *PLC*, %30'unun *Exo S*, %42.5'inin *Las B* ürettiği iolatların %70.4'ünün hareketli olduğu görülmüştür. Diğer çalışmalarda göz önüne alındığında *P. aeruginosa*'nın çeşitli virülans faktörlerini ürettiği ancak oranların bölgesel farklılıklar gösterdiği görülmektedir.

P. aeruginosa gerek farklı direnç mekanizmalarıyla, gerekse pek çok virülans faktörünün yardımıyla tedavisi zor inatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Sahip olduğu antimikrobiyal direnç gerek aktarılabilen mekanizmalarla, gerekse uygunsuz antibiyotik kullanımını bölgesel farklılıklar gösterebilmektedir. Bu direnç paternlerinin ve durumlarının her bölgede sıkı takibi yapılarak antimikrobiyal kullanım politikalarının buna göre şekillendirilmesi gerekmektedir. Enfeksiyonun seyrini ve ciddiyetini değiştirme potansiyeli olan virülans faktörlerinin sıklığının ve bu mekanizmaların daha detaylı çalışmalarla incelenmesinin, bu mekanizmalar bütününe hedef alabilecek olası farklı terapötik uygulamalara temel oluşturması açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

1. Çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplam 80 *P. aeruginosa* izolatlarının 30 'u kadın hastalara 50'si ise erkek hastalardan izole edilmiştir. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımına bakıldığında izolatların en çok Göğüs Hastalıkları Servisinden (%13), Dahiliye Servisinden (%12) ve Kardiyoloji Yoğun bakım (%10) en az ise Anestezi Yoğun bakımdan (%1), Cerrahi Onkolojisinden (%1) ve Üroloji Servisinden (%1) gelen örneklerden üretildiği saptanmıştır.

2- *P. aeruginosa* izolatlarının 35'inin (%43.8) balgam, 19'unun (%23.8) yara, 17'sinin (21,3) idrar, 7'sinin (%8,8) kan, 1'inin (%1) steril vücut sıvısı ve 1'inin (%1) burun örneklerinden izole edildiği görülmüştür.

3- *P. aeruginosa* izolatlarının %81.3'ünün *Tox A*, % 30'unun *Exo S*, %32.5'inin *PLC*, %42.5'inin *Las B* ürettiği saptanmıştır. İzolatların %70.4'ünün hareketli olduğu, %33.9'unun pyosyanin, %41,3'inin pyoverdin, %1,8'nin pyoverdin ürettiği %8,9'unun ise pigmentasyon özelliğinin olmadığı saptanmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarının üretildiği örnekler ve virülans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.005$). Ayrıca antibiyotik direnci ile virülans faktörlerinin varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.005$).

4- Literatür değerlendirildiğinde hem örneklerin hem de antibiyotik direncinin virülans faktörleri ile ilişkilendirildiği çalışmalar bulunduğu gibi, ilişkinin olmadığını tespit eden çalışmalar da bulunmaktadır. Diğer çalışmalar da göz önüne alındığında *P. aeruginosa*'nın çeşitli virülans faktörlerini ürettiği ancak oranların bölgesel farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Enfeksiyonun seyrini ve ciddiyetini değiştirme potansiyeli olan virülans faktörlerinin sıklığının bölgesel olarak takip edilmesinin, bu mekanizmalar bütününe hedef alabilecek olası farklı terapötik uygulamalara temel oluşturması açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Al-Dahmoshi, H. O. M, Al-Khafaji N. S, Jeyad A. A, Shareef H. K, Al-Jebori R. F. (2018). Molecular Detection of Some Virulence Traits Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates, Hilla-Iraq. *Biomed Pharmacol J*, 11(2), 30-41.
- Alhede, M. Bjarnsholt, T. Givskov, M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion, *Adv. Appl. Microbiol.* 86, 1e40.
- Altunay, E. Akkan Kuzucu, E. Öcal, D. N. Erdem, G. (2019). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal direnci*

- Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates which were obtained from various clinical samples, *Anadolu Güncel Tıp Derg*, 1(3), 63-7
- Aslan, V. (T.Y). Hayvanlarda *Pseudomonas* Enfeksiyonları, *Alke Med Dergisi*, 14, 1-10
- Ayaz, C. (2008). *Beta-laktamların genel özellikleri ve penisilinler*, s: 266-78. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Aydın, F. (2001). *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması*. Uzmanlık Tezi, A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Ankara.
- Bert, F. Branger, C. Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother*, 50(1), 11-8.
- Bilgehan, H. (1995). *Klinik Mikrobiyoloji*. Barış Yayınevi, İzmir, 161-72.
- Blondel-Hill, E. Henry, D.A. Speert, D.P. *Pseudomonas*, (2007). Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML, Jorgensen JH (eds). *Manuel of Clinical Microbiology*, 9. baskı kitabında s.734-48, ASM Press, Washington.
- Brooks Gf, Butel Js, Morse Sa. (1998). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 21. Baskı. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange. 231-236
- Çelik, B. (2009). *Doğadan ve klinik örneklerden izole edilen pseudomonas bakterilerinin değişik fenotipik özelliklerinin farklı yöntemlerle araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Demir, M. Cevahir, N. Kaleli, İ. Yıldırım, U. Şahin, R. Çevik, E. (2008). Tepeli Alt Solunum Yolu Örnekleri Ve Solunum Yolu Dışı Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarında Siderofor, Total Matriks Proteaz Ve Elastaz Aktivitesinin Araştırılması, *Mikrobiyol Bül*, 42, 197-208.
- Denton, M. Wilcox, M.H. (1997). Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother*, 40, 468-74.
- Durmaz, S. Toka Özer, T. (2015). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens *Abant Med J*, 4(3), 239-42
- Elmaraghy, N. Abbadi, S. Elhadidi, G. Hashem A, Yousef, A. (2019). Virulence Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated at Suez Canal University Hospitals with Respect to the Site of Infection and Antimicrobial Resistance. *Int J Clin Microbiol Biochem Technol*. 2, 8-19. <https://dx.doi.org/10.29328/journal.ijcmbt.1001006>
- Erdem, B. (1999). *Pseudomonaslar*, Ustaçelebi Ş. (ed):Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabı içinde, Gündes Kitapevi, Ankara, 551-7.

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC.
- Forbes, B.A. Sahm, D.F. Weissfeld, A.S. (2002). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. (11th ed.) St Louis: Mosby Company. 365-75.
- Gacar, G. G. (2005). *Pseudomonas aeruginosa (PAO1)susunun değişik ısı ve değişik üreme fazlarında housekeeping gen anlatımı düzeyleri*, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli.
- Genetic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes among Different Isolates Mona A Khattab, Mona S Nour and Nadia M ElSheshtawy* Khattab et al., J Microb Biochem Technol 2015, 7:5 DOI: 10.4172/1948-5948.1000224
- Gülseren, F. Mamıkoğlu, L. Öztürk, S. Yücesoy, M. Biberoğlu, K. Yuluğ, N. Doğanay, M. Sümerkan, B. Kocagöz, S. Unal, S. Caloğlu, S. Köksal, I. Leblebicioğlu, H. Günaydın, M. (1999). A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 43, 373-8
- Hall, G.S. (2015). *Nonfermenting and miscellaneous Gram negative bacilli*. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds). *Diagnostic Microbiology* fifth edition. Copyright China, 474-94.
- Hassuna, N.A. Mandour, S.A. Mohamed, ES. (2010). Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt. *Infect Drug Resist.* 13, 587-95 <https://doi.org/10.2147/IDR.S233694>
- Hobden, J.A. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. *DNA and Cell Biology*, 21 (5-6), 391-6.
- Karatuna, O. Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virölans faktörleri ve quorum sensing, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 38(1), 42-51.
- Kayse, F. H. Bienz, K. A. Eckert, J. (1997). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Çev: Küçüker M. A., Tümbay E., Anę Ö. *Pseudomonadaceae*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 230.
- Kılınç, Ç. Güçkan, R. Çepni, M. Aydın, O. Çatakoğlu, A. H. (2015). Çeşitli klinik örneklerden elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci *Eur J Health Sci*, 1(3), 96-100
- Koneman, E. Stephan, D.A. William, M.J. Schreckenberger, P.C. Winn, C.W. (2006). *The nonfermentative Gram-negative bacilli*. Konoman's Colour Atlas and 55 Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia, Lippincott 303-91
- Lagournintzis, G. Christofidou, M. Ditnitracopoulos, G. Paliogianni, F. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of 67 tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators

- nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infection and Immunity*, 71(8), 4614-22.
- Lambert, P.A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 95(41), 22-6.
- Maçın, S. (2014). *Pigmentli ve Pigmentsiz Pseudomonas Aeruginosa Suşlarının Virulans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Mavrodi, D.V. Bonsall, R.F. Delaney, S.M. Soule, M.J. Phillips, G.Thomashow, L.S. (2001), Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 183(21), 6454-65.
- Murray, P.R. Baron, E.J. Jorgensen, J.H. Landry, M.L. Pfaller, M.A. (2007). *Klinik mikrobiyoloji* 9. Baskı; 48:734-48.
- Murray, P.R. Rosenthal, K.S. Kobayashi, G.S. Pfaller, M.A. (2002). *Pseudomonas and Related Organisms*. Medical Microbiology, Chapter 32, 297-304
- Nicas, T.I. Iglewski, B.H. (1985). The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol*, 31, 387-92.
- Nickerson, J.T. Sinskey, A.J. (1977). *Microbiology of foods and food processing*, Elsevier NorthHolland, 306s
- Nikbin, V.S. Aslani, M.M. Sharafi, Z. Hashemipour, M. Shahcheraghi, F. Ebrahimipour, GH. (2012). Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iran J Microbiol*. 4(3), 118-23.
- Public Health England (UK Standards for Microbiology Investigations). (2015). Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services. *Public Health Services*, 3: 1- 41
- RaniaAbozahra^aMohammed A.El-Kholy^bKholoudBaraka^aVirulence genotyping of drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Egypt using multiplex PCRGene Reports, 22, March 2021, 101000
- Sadikot, R.T. Blackwell, T.S. Christman, J.W. Prince, A.S. (2005). Pathogen-host Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 171, 1209–23.
- Shannon, K.P. French, G.L. (2004). Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 818-25.
- Sharifi, H. Pouladfar, G. Shakibaie, M. Pourabbas, B. Mardaneh, J. Mansouri, S. (2019). Prevalence of β -lactamase genes, class 1 integrons, major virulence factors and clonal relationships of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

- hospitalized patients in southeast of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(7), 806-12. doi: 10.22038/ijbms.2019.35063.8340
- Sligl, W.I. Dragan, T. Smith, S.W. (2015). Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *Int J Infect Dis*. 37, 129-34.
- Smith, R, S. Iglewski, B. H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1460-5.
- Sonbol, F. Ibrahim, M. Khalıl, A. F. Mohamed, A. B. Samir, S. (2015). ALI2 Correlation between antibiotic resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates *Turk J Med Sci*, 45, 568-77
- Şay Coşkun, U. S. Copur Cicek, A. Kilinc, Ç. Guckan, R. Dagcioglu, Y. Demir, O. Sandalli, C. (2018). Effect of mazEF, higBA and relBE toxin-antitoxin systems on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* isolates *Malawi Med J*. 30(2), 67–72.
- Şay Coşkun, U. S. Coşkun, G. (2013). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Direnç Durumunun Belirlenmesi Determination of Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Variety of Clinical Samples of a State Hospital *FLORA*, 18(4), 175-80.
- Şen Akoğlu, A. (2006). Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(2), 2-13.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2016 Yıllık Raporu [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Urunler DB/uamdss/yillik raporlar/UAMDSS 2016 Raporu](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji%20Referans%20Laboratuvarlari%20ve%20Biyolojik%20Urunler%20DB/uamdss/yillik%20raporlar/UAMDSS%202016%20Raporu)
- Theilacker, C. Coleman, F. Mueschenborn S, et al. Coleman, F.T. Mueschenborn, S. Llosa, N. Grout, M. Gerald, B.P. (2003). Construction and characterization of a *P. aeruginosa* mucoid exopolysaccharid/alginate conjugate vaccine. *Infect Immun*, 71, 3875-84.
- Topal, K. (2018). Olgularla Kulak Enfeksiyonları, *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi*, 10(3), 44-7.
- Ural, O. Sepsis Fizyopatolojisi, http://www.yogunbakimdergisi.org/managete/fu_folder/2007-01/html/2007-7-1-173-177.html (04.11.2018).
- Vahaboğlu, H. Akhan, S. Ç. (2002). *Pseudomonas Aeruginosa ve Diğer Pseudomonas türleri*” Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M, *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 1608-16

- Van Delden, C. Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, 4(4), 551-60.
- Van, E.J. (2003). Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother*, 51(2), 347-52.
- Vasıl, M.L. Kabat, D. Iglewski, B.H. (1977). Structure-activity relationships of an exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 16, 353-61.
- Veesenmeyer, J.L. Hauser, A.R. Lisboa, T. Rello, J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*. 2009 ve doi:10.1097/CCM.0b013e31819ff137, 37(5), 1777-86.
- Walsh, T.R. (2002). Bolmström A, Qwarnström A, Gales A: Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing, *J Clin Microbiol*, 40(8), 2755-9
- Wick, M.J. Hamood, A.N. Iglewski, B.H. (1999). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol*, 4(4), 527-35.
- Xu, J. Duan, X. Wu, H. Zhou, Q. (2013). Surveillance and correlation of antimicrobial usage and resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: a hospital population-based study. *PLoS ONE*, 8(11), e78604.

ÖZGEÇMİŞ