

Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi

The virulence characteristics and epidemiological relationship of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Nilüfer UZUNBAYIR-AKEL¹, Yamaç TEKİNTAŞ², Fethiye Ferda YILMAZ³, İsmail ÖZTÜRK², Mustafa ÖKEER³, Sabire Şöhret AYDEMİR⁴, Fatma Feriha ÇİLLİ⁴, Mine HOŞGÖR-LİMONCU³

ÖZET

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa* konak savunmasının bozulduğu durumlarda, özellikle sağlık kuruluşlarında ciddi enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojendir. Direnç problemine ek olarak bu bakterilerin sahip oldukları farklı virülans özellikleri enfeksiyonun ve tedavinin seyrini değiştirebilmektedir. Bu çalışmada çeşitli kliniklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının, epidemiyolojik ilişkilerinin ve virülans faktörleri özelliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin farklı kliniklerinden izole edilen 83 *P. aeruginosa* izolatu ile gerçekleştirildi. Etken olan izolatların antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact® otomatize sistemiyle ve klonal ilişkileri "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ERIC-PZR)" ile araştırıldı. Her bir klondan seçilen temsilcilerin virülans faktörlerinin belirlenebilmesi için fenotipik testler yapıldı. Elastaz aktivitesinin araştırılmasında "Elastin Congo Red" ölçüm yöntemi kullanılırken, Proteaz, DNaz, Lipaz, Siderofor ve Hareket (Twitching) aktivitelerinin fenotipik olarak belirlenmesi amacıyla uygun yöntemler uygulandı. İzolatların biyofilm

ABSTRACT

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that can cause serious infections, especially in health care settings where host defense is impaired. In addition to resistance problem, the different virulence characteristics of these bacteria can change the course of infection and cure. In this study, it was aimed to determine antibiotic susceptibilities, epidemiological relations and virulence factors of clinical *P. aeruginosa* isolates.

Methods: This study was performed, a total of 83 *P. aeruginosa* isolated from different clinical samples of Ege University Faculty of Medicine Hospital. Antibiotic susceptibilities of isolates were investigated by the VITEK 2 Compact® automated system and epidemiological relations of isolates determined via "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)". Phenotypic tests were performed to determine the virulence factors of the selected representatives from each clone. While the "Elastin Congo Red" method was used for the investigation of elastase activity, appropriate methods applied for Protease, DNase, Lipase, Siderophore and Twitching activities to the detect virulence properties phenotypically. The biofilm production of isolates was

¹Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir

²İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

³Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁴Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Mine HOŞGÖR-LİMONCU

Ege Üni. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD. Bornova 35100 İzmir - Türkiye
Tel : +90 532 568 19 81 E-posta / E-mail : minehosgorlimoncu@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 27.11.2018
Kabul Tarihi / Accepted : 23.01.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.68235

Uzunbayır-Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, Öztürk İ, Okeer M, Aydemir SŞ, Çilli FF, Hoşgör-Limoncu M. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(4): 395-404

üretimleri kristal viyole metoduyla ve biyofilme ilişkili olduğu düşünülen çoğunluğu algılama (ÇA) genleri ise PZR yöntemiyle araştırıldı.

Bulgular: Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre en yüksek direnç imipeneme karşı (%43,4), en düşük direnç ise amikasinine karşı (%14,5) gözlemlendi. İzolatların ERIC-PZR sonuçlarına göre 19 ilişkisiz klon içerisinde yer aldıkları saptandı. Her bir klonu temsilen seçilen izolatların tamamında siderofor ve elastaz üretimi gözlemlendi, proteaz, lipaz ve twitching motilitesi sırasıyla 5, 14 ve 15 izolatta belirlenirken, hiçbir kökünde DNaz üretimi saptanmadı. 19 temsilci izolatın dokuzunun güçlü biyofilm ürettiği ve lasI, lasR, rhlR genlerini sırasıyla 17, 18, 13 izolatta, rhlI geninin ise tüm izolatlarda pozitif olduğu belirlendi.

Sonuç: Bulgular değerlendirildiğinde, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde farklı antibiyotik direnç profilleri olan *P. aeruginosa* izolatları saptandı. Bu dirençli izolatların epidemiyolojik olarak ilişkisiz klonlarda yer almaları, genotipik olarak farklı özelliklere sahip izolatların kliniklerde dolaşımında olduklarını göstermektedir. Patogeneze katkıda bulunabilecek pek çok virülans faktörünü de içeren bu izolatlarda özellikle biyofilm üretiminin yaygın olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum hem tedavinin daha zor hale gelmesini, hem de sağlık kuruluşlarında pek çok farklı yüzeyde kolonize olabilmelerine katkıda bulduklarını düşündürmektedir. Ülkemizde ve bölgemizde yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla *P. aeruginosa* bakterilerinin direnç durumları ve virülans faktörlerinin, enfeksiyonun şiddetine olan etkileri ortaya konulabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, ERIC-PZR, virülans faktörleri, biyofilm

investigated by crystal violet method, and the quorum sensing (QS) genes thought to be related to biofilm were determined by PCR method.

Results: According to results of antibiotic susceptibility test, the highest resistance was observed against imipenem (43,4%) and the lowest resistance was observed against amikacin (14,5%). Isolates were found in 19 unrelated clones according to ERIC-PZR results. Siderophore and elastase production were observed in all of the representative isolates. Protease, lipase and twitching motility were determined at 5, 14 and 15 isolates respectively, no DNase production was detected. Nine of the 19 representative isolates produced strong biofilms, and the lasI, lasR, rhlR genes were identified in 17, 18, 13 isolates respectively and the rhlI gene was found in all strains.

Conclusion: When the data were evaluated, different antibiotic resistant *P. aeruginosa* isolates which have different resistance profiles were detected at Ege University Faculty of Medicine Hospital. The inclusion of these resistant isolates in epidemiologically unrelated clones suggests that isolates with genotypically different properties are circulating in the clinics. Despite the many virulence factors that can contribute to pathogenesis, it is noteworthy that biofilm production is particularly prevalent in these isolates. This situation has meant that treatment becomes more difficult, as well as being able to colonize on many different surfaces in health care facilities. More extensive studies in both our country and our region could show the resistance profile of *P. aeruginosa* bacteria and the effects of virulence factors on the severity of infection.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, ERIC-PCR, virulence factors, biofilm

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa hastane enfeksiyonlarına neden olan ve pek çok moleküle dirençli Gram negatif non-fermentatif bakteridir (1). Başta yoğun bakım

olmak üzere pek çok farklı klinikten izole edilen bu bakteri, hastane kökenli enfeksiyonların %10-15'inden sorumludur. Sadece kliniklerde değil hastanenin

genel hijyeni açısından da oldukça önemli sonuçlar doğuran bu bakterinin, su kaynaklarını kontamine ederek salgınlara neden olduğu bilinmektedir (2,3).

Pseudomonas aeruginosa patogeneğinde hücre dışı pek çok faktör görev almaktadır. Bu sistemler bakterinin hareketini artırarak (twitching motilitesi) besin maddelerine daha kolay ulaşmasını sağlayabildiği gibi, çeşitli maddeleri parçalayabilen enzimler (Elastaz, Proteaz, DNaz) aracılığıyla dokulara daha kolay penetre olabilmelerini veya kolonize ettikleri dokuda daha fazla hasara neden olabilmelerini sağlamaktadır. Bununla birlikte bakteriye ait en önemli virülans faktörü biyofilm üretimidir (4).

Hemen hemen tüm virülans faktörleri gibi biyofilm üretimi de, hücre yoğunluğuna bağlı mekanizma olan çoğunluğu algılama (ÇA”quorum sensing”) sistemine bağlı olarak indüklenmektedir. ÇA sisteminin yardımıyla bakterilerin sayıları belirli seviyelere ulaştığında, bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit yapının içerisine gömülerek üremeye başlarlar. Bu sayede bakteriler, etraflarını çevreleyen koruyucu duvar oluşturarak çevre koşullarına, dezenfektanlara ve antimikrobiallere daha dirençli hale gelirler. *Pseudomonas aeruginosa*, virülans faktörlerinin eksprese olmasını sağlayan *las* ve *rhl* genleri olmak üzere iki tane ÇA sistemine sahiptir ve enfeksiyonlarının şiddeti, virülans faktörlerinin üretimine bağlıdır (5,6) .

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda izole edilmiş ve klonal ilişkisiz olduğu belirlenen *P. aeruginosa* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılık profillerinin, virülans faktörlerinin, varlığının ve ÇA genleriyle olan

ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatların seçilimi:

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı’nda farklı kliniklerden Ekim 2014 - Ocak 2015 tarih aralığında izole edilmiş 181 *P. aeruginosa* kökeni VITEK MS otomatize sistemi ile tür tayini yapılarak tanımlandı. Bu izolatlar içerisinde etken olduğu belirlenen 83 izolat çalışmaya dahil edildi (Tablo 1). Bakteriler çalışılınca kadar gliserinli buyyon besiyerinde -80°C’de stoklandı. Kontrol kökeni olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

Antimikrobiyal duyarlılıkları:

Etken olduğu saptanan izolatlar ait antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact® otomatize sistemi kullanılarak araştırıldı. Otomatize sistemde elde edilen sonuçlar “Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI)” kriterleri doğrultusunda duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırıldı (7).

Epidemiyolojik tiplendirme:

İzolatların epidemiyolojik ilişkisi “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ERIC-PZR)” ile Tablo 2’de gösterilmiş olan primerler aracılığıyla saptandı. Elde edilen son ürünler %1,5 agaroz içeren jel içerisindeki kuyucuklara yüklenerek elektriksel alana tabi tutuldu. Jel UV ışık altında Fusion FX7 görüntüleme (Vilberlourmat) cihazında görüntülendi. Elde edilen

Tablo 1. Etken olduğu belirlenen izolatların materyal türleri

Materyal	Balgam	Kan-kateter ucu	Doku-biyopsi	Yara Sürüntüsü	İdrar	Kornea sürüntüsü	Kist sıvısı	Dren sıvısı	Batın-ponksiyon sıvısı
Sayı (83)	36	17	11	11	4	1	1	1	1
(%)	(43,4)	(20,4)	(13,3)	(13,3)	(4,8)	(1,2)	(1,2)	(1,2)	(1,2)

Tablo 2. Kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Dizi (5'→3')	Kaynak
ERIC-1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	(8)
ERIC-2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	(8)
<i>lasI-1</i>	ATG ATC GTA CAA ATT GGT CGG C	(9)
<i>lasI-2</i>	GTC ATG AAA CCG CCA GTC G	(9)
<i>lasR-1</i>	ATG GCC TTG GTT GAC GGT T	(9)
<i>lasR-2</i>	GCA AGA TCA GAG AGT AAT AAG ACC CA	(9)
<i>rhII-1</i>	CTT GGT CAT GAT CGA ATT GCT C	(9)
<i>rhII-2</i>	ACG GCT GAC GAC CTC ACA C	(9)
<i>rhIR-1</i>	CTT GGT CAT GAT CGA ATT GCT C	(9)
<i>rhIR-2</i>	GCT TCA GAT GAG GCC CAG C	(9)

bant paternleri baz alınarak %80 benzerlik katsayısına göre MEGA 4 programı aracılığıyla dendrogram çizildi. Aynı klonlarda yer alan bakteriler genotipik olarak aynı özelliği göstereceği için her bir klondan temsilci seçilerek çalışmalara devam edildi.

Virülans faktörlerinin fenotipik olarak saptanması:

DNaz tespiti:

DNaz test agar plaklarına çizgi ekim yapılarak 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plak yüzeyi 1 N HCl ile yıkandı. İzolatların üredikleri alanın etrafında temiz zon oluşumu DNaz varlığı olarak değerlendirildi (10).

Elastaz tespiti:

İzolatların Luria Bertani (LB) sıvı besiyerinde 37°C'de 16 saat inkübasyonunu takiben 4°C'de 15.000 rpm hızda 10 dk. santrifüj uygulandı. Elastin Congo red (ECR) tamponu hazırlandı (20 ml Trisbuffer (100 mMTris + 1 mM CaCl₂ = pH:7,5) + 0,44 gECR).

100 µl bakteri süpernatantı ile 900 µl ECR tamponu ependorfa alınıp karıştırıldı. 37°C'de 3 saat 250 rpm hızda su banyosunda inkübasyona bırakıldıktan sonra çözülme ECR 4°C'de 11.600 rpm hızda 14 dk. santrifüj uygulanarak uzaklaştırıldı. 96 kuyucuklu mikroplaklara 3 tekrarlı olacak şekilde aktarılan absorbe edilmiş süpernatantlar 495 nanometre (nm)'de ölçüldü (11).

Proteaz tespiti:

Proteaz testi için hazırlanan besiyerlerine delikler açıldı. 1 McFarland bulanıklığına ayarlı bakteri süspansiyonundan 50 µl besiyerine ekilip, 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plakta temiz bir zon görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi (10).

Lipaz tespiti:

Lipaz testi için hazırlanan besiyerine çizgi ekim yapıldı. 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda koloni etrafında puslanma görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (12).

Twicthing motilitesinin tespiti:

Bakteri kökenleri %1'lik LB agar plaklarına delik açılarak inoküle edildi. 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda koloni çapları ölçüldü. 10 mm ve üzeri değerler pozitif sonuç olarak kabul edildi (13).

Siderofor tespiti:

"Chrome Azurol S (CAS)" agar besiyerine çizgi ekim yapıldı. 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda mavi olan besiyerinde turuncu renkli üreme görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi (14).

Pigment tespiti:

Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine kökenler ekilip 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaklar görsel olarak değerlendirilerek pigment varlığı saptandı (15).

Biyofilm üretimini belirlenmesi:

Biyofilm üretiminin belirlenmesi amacıyla Stepanovic ve ark. (16) tarafından tanımlanan kristal viyole metodu kullanıldı. Deney sonunda mikropilaya kuyucuklarındaki absorbans değerleri mikropilaya okuyucu spektrofotometre ("Varioskan

Flash, ThermoScientific") ile 570 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirildi. Absorbans değerlerine göre, biyofilm üretimi biyofilm yok, zayıf biyofilm, orta düzey biyofilm ve güçlü biyofilm olarak sınıflandırıldı (16,17).

Çoğunluğu algılama (ÇA, "Quorum sensing") genlerinin tespiti:

Çoğunluğu algılama genleri; *lasI*, *lasR*, *rhII* ve *rhIR* PZR yöntemi kullanılarak Tablo 2'de belirtilen primerler aracılığıyla saptandı. Elde edilen son ürünler %1,5 agaroz içeren jel içerisindeki kuyucuklara yüklenerek elektriksel alana tabi tutuldu. Jel UV ışık altında Fusion FX7 görüntüleme cihazında görüntüledi.

BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda farklı kliniklerden etken olarak izole edilen 83 *P. aeruginosa* izolatının antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına göre, amikasin, sefepim, siprofloksasin ve imipenem direnç oranları sırasıyla %14,5, %22,9, %26,5 ve %43,4 olarak belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Kökenlerin Antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları

Duyarlılık	AK	CN	MEM	TAZ	FEP	CAZ	CIP	IMP
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Duyarlı (S)	83,1	80,7	63,9	72,3	63,8	74,7	72,3	53
Orta Derece Duyarlı (I)	2,4	3,6	7,2	3,6	13,3	8,4	1,2	3,6
Dirençli (R)	14,5	15,7	28,9	24,1	22,9	16,9	26,5	43,4

AK: Amikasin, CN: Gentamisin, MEM: Meropenem, TAZ: Piperasilin-Tazobaktam, FEP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CIP: Siprofloksasin, IMP: İmipenem

Seksen üç izolatın ERIC-PZR sonuçları incelendiğinde, genotipik olarak ilişkisiz 19 klonda yer aldıkları belirlendi. Her bir klondan 24, 35, 50, 67, 70, 72, 74, 79, 83, 85, 100, 111, 127, 135, 144, 160, 164, 171, 177 numaralı izolatlar 19 epidemiyolojik gruba ait temsilciler olarak seçildi. Bu izolatların virülans özellikleri incelendiğinde, elastaz ve siderofor üretimi tüm kökenlerde saptandı. Bakterilerin “twitching” (%78,9), lipaz (%73,7) ve proteaz (%26,3) ürettikleri belirlenirken, DNaz üretimi yapan hiçbir

kökene rastlanmadı. Virülans özellikleri Tablo 4’de özetlenmiştir.

Kristal viyole yöntemine göre belirlenen biyofilm üretme kapasitesi sonuçlarına göre dokuz izolatın güçlü biyofilm üretimi yaptığı tespit edildi. Çalışmaya alınan bakterilerde biyofilm ile ilişkili olabileceği düşünülen ÇA genleri *lasI*, *lasR*, *rhlI* sırasıyla 17, 18, 13 izolatta saptanırken, *rhlI*’nın tüm kökenlerde pozitif olduğu belirlendi.

Tablo 4. Temsilci olarak seçilen izolatların virülans özellikleri

KN	LP	TW	PM	BF	EL	PR	DNaz	SD	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>
24	(+)	(+)	PV	Z	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
35	(+)	(-)	PV	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
50	(-)	(-)	PV	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
67	(-)	(+)	PV	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
70	(+)	(-)	PV	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
72	(+)	(+)	PV	G	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
74	(+)	(+)	PV	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
79	(+)	(+)	PS	Z	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
83	(-)	(+)	PS	G	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
85	(+)	(+)	PV	Y	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
100	(+)	(+)	PV	O	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
111	(+)	(+)	Y	O	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
127	(+)	(+)	PV	O	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
135	(-)	(+)	PS	O	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
144	(+)	(-)	PS	O	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
160	(+)	(+)	Y	O	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
164	(+)	(+)	PV	G	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
171	(-)	(+)	PM	Z	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
177	(+)	(+)	Yok	G	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

KN: köken no, LP: lipaz, TW: twitching, PM: pigment, BF: biyofilm, EL: elastaz, PR: proteaz, SD: siderofor, PV: piyoverdin, PS: piyosiyenin, PM: piyomelanin, Y: yok, Z: zayıf, O: orta düzey, G: güçlü

TARTIŞMA

P. aeruginosa gerek yapısal özellikleri gerekse hastane ortamındaki yoğun antibiyotik stresinin etkisiyle hızlıca direnç geliştiren bir bakteridir. Yurt içinde ve dışında antimikrobiyal duyarlılıkları incelendiğinde direnç oranlarının yıllara ve hatta bölgelere göre değişik dağılımlar gösterdiği dikkati çekmektedir (18). Bu durum farklı genetik atadan gelen klonların dolaşımında olabileceğini düşündürmüştü ve mümkün olduğunca her hastanenin kendi direnç paternini belirleyerek, antimikrobiyal kullanım politikalarını buna göre güncellemesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma kapsamındaki izolatların epidemiyolojik tiplendirme sonuçları yorumlandığında 83 izolatın 19 ayrı klonda yer aldığı dikkat çekmektedir. Tespit edilen 19 klon içerisinde en yüksek sayıda izolat içeren grupta 25 izolat (toplam izolatların % 30,1'i) bulunmakla birlikte diğer klonların temsil oranları %12 ve altında kalmaktadır. Bu durum hastanede etken olarak dolaşımında olan *P. aeruginosa* bakterilerinin pek çok farklı genetik atadan geldiği fikrini destekler niteliktedir.

Direnç durumu özelinde göze alındığında karbapenem direncinin öne çıktığı görülmektedir. Çalışmamızda imipenem (%43) en yüksek direnç oranlarının görüldüğü antimikrobiyal olarak belirlenmiştir. Bir başka karbapenem olan meropenem olan direnç ise imipenem oranla görece daha düşük seviyelerde seyretmektedir. Çalışmamız dahilinde elde edilen bu veri bir başka dikkat çekici noktadır. Benzer gruplara ortak mekanizmalar ile direnç gözükeceği bilinmekle beraber çalışmaya alınan izolatlarda gözüken bu farklılığın oprD (outer membran protein) porin aracılı direnç mekanizmasının varlığı nedeniyle oluşabileceği şeklinde açıklanmıştır. Porin kaybına bağlı olarak oluşan direnç de özellikle imipenem molekülünün sahip olduğu kimyasal yapı nedeniyle daha yüksek oranda etkilendiği bilinmektedir (19). Yurt içinde ve yurt dışında yapılan farklı çalışmalarda da yüksek karbapenem direnci saptanmıştır (18,20). Karbapenemler özellikle

Gram-negatif basillerin tedavisinde beta-laktamları etkileyen direnç mekanizmalarının bir kısmından etkilenmemeleri nedeniyle son savunma hattı olarak adlandırılırlar. Karbapenem dirençli izolatların daha yüksek mortalite oranlarıyla ilişkilendirildiği düşünüldüğünde çalışmamızdan elde edilen verinin oldukça dikkat çekici olduğunu düşünmekteyiz (21). Sadece ülkemizde değil dünya çapında kaygı veren bu duruma karşı aktif süreyans, enfeksiyon kontrol uygulamaları ve akılcı antibiyotik kullanımı gibi maddeler en etkin önleyici uygulamalar olarak öne çıkmaktadır (22,23).

Hastanemizde dolaşımında olan *P. aeruginosa* bakterilerinde aminoglikozid türevlerine olan direncin diğer gruplara oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Son yıllarda yapılmış pek çok farklı çalışmada aminoglikozid direnci görece düşük olarak seyretmektedir (24,25). Antibiyotik reçeteleme eğiliminin bu noktada etkin olan ana faktör olarak ortaya çıkması muhtemeldir (26). Giderek gelişen farmasötik sektörün ortaya koyduğu yeni moleküllerin tercihinin oldukça yüksek toksisite ve yan etki problemlerine sahip olan bu grubun reçetelenme eğiliminin azalmış olmasının bu moleküller özelinde antibiyotik stresini azalttığı düşünülebilir. Yine de toksisite ve yan etkilerine rağmen özellikle beta-laktam gruplarıyla kombine kullanılabilme avantajına sahip olmaları ve belli düzeyde direnç azalışı tedavide bir seçenek olarak unutulmaması gerektiğini hatırlatmaktadır.

Nozokomiyal *Pseudomonas* enfeksiyonlarının büyük bir kısmı medikal cihazların kullanımıyla ilişkilendirilmiştir. Bu cihazların yüzeyine sıkıca tutunmasını sağlayan biyofilm yapısı, enfeksiyonların daha sık görülmelerine ve daha inatçı hal almasına neden olmaktadır. Ayrıca çeşitli yüzeylerde kolonizasyonu kolaylaştıran bu sistemin konak immün yanıt hücrelerinden kaçışta, antibiyotik maruziyetini engelleme gibi noktalarda etkili olduğu bilinmektedir (27). On dokuz temsilci izolatın biyofilm üretme kapasitelerine bakıldığında 9'unun güçlü ve 6'sının orta düzey olmak üzere 15 izolatın (toplamda %78,9)

biyofilm ürettikleri düşünüldüğünde biyofilm oluşturma kapasitelerinin yüksek olması beklenen bir sonuçtur (15). Biyofilm oluşumu için hücrelerin bir grup halinde hareket edebilmesi önemli bir basamaktır. Bakteriler bu durumu yönetebilmek amacıyla ÇA adı verilen bir sistemi kullanırlar. Bu sistemde küçük difüze olabilen açıl homoserin lakton (AHL) moleküllerinin hücre içi konsantrasyonlarının değişmesi, transkripsiyonal regülasyonu sağlayarak bakterilerin birbirlerinin durumundan haberdar olmasını ve grup halinde davranmalarını sağlamaktadır (28). *Pseudomonas aeruginosa*'da las ve rhl sistemi olmak üzere iki temel ÇA sistemi bulunmaktadır (29). Lasl geni biyofilmin olduğu ilk basamakta görev alan ve adeta sistemi başlatan orkestra şefi görevindedir. Lasl ile etkileşen AHL diğer genlerin regülasyonunu sağlayarak ÇA sistemini başlatır. Bu çalışmada 19 izolatta, bu geni bulundurmayan iki kökenden biri zayıf biyofilm üretirken diğerinin biyofilm üretmediği saptanmıştır. Dolayısıyla bu geni bulundurmayan izolatların ÇA davranışında yetersizlik görülebileceği ve buna bağlı olarak biyofilm üretiminin düşük seviyelerde olması beklenen bir sonuç haline gelmektedir. Bazı çalışmalarda lasl'nın çevre koşullarından etkilendiği ve bu durumun genin varlığı söz konusu olsa dahi üretilecek AHL miktarında değişiklik meydana getirerek biyofilm üretiminde azalma gözlemlenebileceği ortaya konulmuştur (28).

Pseudomonas türleri farklı pigment molekülleri oluşturabilmektedir. Virülans ve yaşamsal fonksiyonlarda çeşitli görevleri olduğu bilinen bu moleküllerin üretimi ÇA sistemi üzerinden yönetilebilmektedir. Örneğin rhlR' nin piyosiyanın pigmentinin ana indükleyicisi olduğu belirlenmiştir (30). Bizim çalışmamızda pigment üretimleri açısından değerlendirme yapıldığında rhlR genini içermeyen izolatlarda piyosiyanın pigmentinin bulunmadığı göze çarpmaktadır. Bu veri rhlR' nin piyosiyanın ile ilişkilendirildiği pek çok çalışmayı destekler niteliktedir. Aynı zamanda bir siderofor olan piyoverdin bizim çalışmamızda en yüksek oranda (% 57,9) tespit edilen pigment olarak göze

çarpmaktadır. Çoğunluğu algılama genlerindeki belli mutasyonların piyoverdin üretimine neden olduğu düşünülmektedir. Bu molekülün varlığının fotosensitizerlere olan dayanıklılığı artırdığı düşünüldüğü için, son dönemlerde alternatif tedavi olarak öne çıkmaya başlayan fotodinamik tedavi açısından değerlendirilmesinin önemli veriler ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz (31).

Pseudomonas aeruginosa patojenitesi hücre dışına salınan pek çok farklı enzim aracılığıyla düzenlenmektedir. Elastaz, proteaz, lipaz ve DNaz gibi moleküllerin bu noktada etkin olan faktörlerden oldukları bilinmektedir (32). Özellikle akciğerdeki elastin dokusuna zarar veren, lipit yapıları çözen veya fibrini eriten enzimler enfeksiyonun yayılımını ve ciddiyetini etkilemektedirler. Georgescu ve ark. (33), çalışmalarında, lipaz üretiminin oranını %83, DNaz üretimini ise çalışmada prevalansı en düşük olan faktör olarak %16 oranında belirlemiştir. Genellikle yara bölgesinden yapılan izolasyonlarda artmış DNaz miktarları çalışmalarla gösterilmiş olsa da (34) bizim izolatlarımızda DNaz üretimi saptanmamıştır. Elastaz, proteaz, siderofor gibi virülans faktörlerinin genel olarak yüksek oranlarda üretildiğini gösteren çalışmaların bulunması bizim çalışmamıza ait verileri desteklemektedir (35). Bu noktada farklılıkların, izolatların fazla sayıda klinik örnekten izole edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bakterinin enfeksiyon oluşturduğu bölgeye göre farklı sistemlere ihtiyaç duyduğu bilinmektedir (34).

Pseudomonas 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 tercih edilen antimikrobiallerin oluşturduğu stres nedeniyle değişiklikler gösterebilmektedir. Bu direnç paternlerinin ve durumlarının her bölgede, hatta mümkünse her sağlık kuruluşu tarafından sıkı takibi yapılarak antimikrobiyal kullanım politikalarının buna göre şekillendirilmesi gerekliliği öne çıkmaktadır. Enfeksiyonun seyrini ve ciddiyetini değiştirme

potansiyeli olan virülans faktörlerinin sıklığının ve bu mekanizmaların daha detaylı çalışmalarla incelenmesinin, gen mutasyonlarının bu noktalardaki etkilerinin saptanmasının ve bu mekanizmalar

bütününe hedef alabilecek olası farklı ilaç molekül adaylarının ortaya konulmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Bu proje Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 14/ECZ/041 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Özünel L, Boyacıoğlu Zİ, Güreşer AS, Taylan-Özkan A. Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesinde derin trekeal aspirat örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2014;71(2):81-8.
- Varin A, Valot B, Cholley P, Morel C, Thouverez M, Hocquet D, et al. High prevalence and moderate diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in the U-bends of high-risk units in hospital. *Int J Hyg Environ Health.* 2017;220(5):880-5.
- Witney AA, Gould KA, Pope CF, Bolt F, Stoker NG, Cubbon MD, et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O609-18.
- Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2008;38(1):42-51.
- Mataracı E, Gerçeker AA. Çeşitli dezenfektanların minimum bakterisidal konsantrasyonlarının *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm kültürlerine karşı araştırılması. *Ankem Derg.* 2012;25(4):209-14.
- Kozirog A, Otlewska A, Brycki B. Viability, Enzymatic and Protein Profiles of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Planktonic Cells after Monomeric/Gemini Surfactant Treatment. *Molecules.* 2018;1-13.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Vol. 33, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. 70-71 p.
- Dorneles EMS, Santana JA, Ribeiro D, Dorella FA, Guimarães AS, Moawad MS, et al. Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. *PLoS One.* 2014;9(6):e98758.
- Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, et al. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2004;53(9):841-53.
- Finlayson EA, Brown PD. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Med J.* 2011;60(1):24-32.
- Wang H, Tu F, Gui Z, Lu X, Chu W. Antibiotic Resistance Profiles and Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Microbiol.* 2013;53(2):163-7.
- Muhsin TM, Aubaid AH, Al-Duboon AH. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses.* 1997;40(11-12):465-9.
- Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;323(1):44-51.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ.* 2011;12(1):51-3.
- Lima JL da C, Alves LR, Jacomé PRL de A, Bezerra Neto JP, Maciel MAV, Morais MMC de. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(2):129-36.

16. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40(2):175-9.
17. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *Apmis*. 2007;115(3):891-9.
18. Öztürk C, Albayrak HT, Altinöz A, Ankaralı H. Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotiklere Direnç ve Beta-Laktamaz Oranları. *ANKEM Derg*. 2010;24(3):117-23.
19. Livermore DM. Leading article Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:247-50.
20. Rostami S, Farajzadeh SA, Shoja S, Farahani A, Tabatabaiefar MA, Jolodar A, et al. Investigating of four main carbapenem-resistance mechanisms in high-level carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81(2):127-32.
21. Liu Q, Li X, Li W, Du X, He JQ, Tao C, et al. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with Pseudomonas aeruginosa infection: A meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5(March):1-10.
22. Metan G, Akova M. Reducing the impact of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae on vulnerable patient groups: What can be done? *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(6):555-60.
23. Plüss-Suard C, Pannatier A, Kronenberg A, Mühlemann K, Zanetti G. Impact of antibiotic use on carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa: Is there a role for antibiotic diversity? *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1709-13.
24. Juayang AC, Lim JPT, Bonifacio AF V, Lambot AVL, Millan SM, Sevilla VZJN, et al. Five-Year Antimicrobial Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from a Local Tertiary Hospital in Bacolod City, Philippines. *Trop Med Infect Dis*. 2017;2(3):28.
25. Lucca F, Guarnieri M, Ros M, Muffato G, Rigoli R, Da Dalt L. Antibiotic resistance evolution of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients (2010-2013). *Clin Respir J*. 2018;12:2189-96.
26. Poole K. Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):479-87.
27. Lambert PA. Mechanism of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. *J R Soc Med*. 2002;95(41):S22-26.
28. Smith RS, Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1460-5.
29. de Kievit TR. Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Environ Microbiol*. 2009;11(2):279-88.
30. Mukherjee S, Moustafa D, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. The RhlR quorum-sensing receptor controls Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathog*. 2017;13(7):1-25.
31. Orlandi VT, Bolognese F, Chiodaroli L, Tolker-Nielsen T, Barbieri P. Pigments influence the tolerance of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. *Microbiology*. 2015;161(12):2298-309.
32. Morales E, González-Valdez A, Servin-González L, Soberón-Chavez G. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: The case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;364(12):1-10.
33. Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):3-9.
34. Holban AM, Chifiriuc MC, Cotar AI, Bleotu C, Grumezescu AM, Banu O, et al. Virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. *Rom Biotechnol Lett*. 2013;18(6):7243-54.
35. Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, Kipnis E, Pierre M, Ader F, et al. Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):337-33.