

ÖZGÜN ÇALIŞMA

ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİ VE SOLUNUM YOLU DIŞI
ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
SUŞLARINDA SİDEROFOR, TOTAL MATRİKS PROTEAZ VE ELASTAZ
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI*

ORIGINAL ARTICLE

INVESTIGATION OF SIDEROPHORE, TOTAL MATRIX PROTEASE AND
ELASTASE ACTIVITY IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES FROM
LOWER RESPIRATORY TRACT AND EXTRA-RESPIRATORY TRACT SAMPLES**Melek DEMİR¹, Nural CEVAHİR¹, İlknur KALELİ¹, Umut YILDIRIM¹
Rasim ŞAHİN¹, Ebru ÇEVİK TEPELİ¹**

ÖZET: Önemli fırsatçı patojenler olan *Pseudomonas aeruginosa* suşları, çeşitli genler aracılığı ile virülans faktörü olarak kabul edilen hücre dışı proteinler salgılamaktadırlar. Adezinler, pyosiyanın, proteazlar, hemolizinler, ekzotoksin A ve ekzoenzim S, *P.aeruginosa* suşlarında tanımlanmış virülans faktörleridir. Bu çalışmada, hastanede yatan hastaların alt solunum yolu (n: 81; balgam, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat) ve solunum yolu dışı (n: 76; idrar, yara, kan) örneklerinden izole edilen toplam 157 *P.aeruginosa* suşunun siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktiviteleri ile antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Siderofor aktivitesinin araştırılmasında "Chrome azurol S" (CAS) agar yöntemi; total matriks proteaz aktivitesinin araştırılmasında substrat olarak "hide powder azure"; elastin aktivitesinin araştırılmasında ise "elastin congo red" kullanılmıştır. Enzim aktiviteleri spektrofometrik olarak ölçülmüş, test edilen suşların enzim aktiviteleri *P.aeruginosa* PAO1 pozitif kontrol suşunun aktivitesi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tüm suşlar CAS agarda pozitif reaksiyon vermişlerdir. Total proteaz ve elastaz aktivitesi, test edilen suşlarda PAO1 aktivitesinden ortalama olarak daha düşük saptanmış, ancak PAO1'den daha yüksek aktivite gösteren suşların mevcudiyeti de belirlenmiştir. Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen suşlar ile diğer örneklerden izole edilen suşlar arasında gerek ortalama total proteaz ve elastaz aktivitesi açısından gerekse antibiyotiklere direnç oranları yönünden fark saptanamamıştır (p<0.05). Her iki grupta da en fazla direnç seftazidim (sırasıyla %67.9 ve %57.9) ve sefoperazona (sırasıyla %49.3 ve %48.7) karşı tespit edilmiştir. Sonuç olarak farklı vücut bölgelerden izole edilen suşların virülans özelliklerinin enfeksiyon gelişimindeki rollerinin aydınlatılabilmesi için ileri in vivo çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, virülans faktörü, siderofor, elastaz, total matriks proteaz.

* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenen 2003TFP-03 no'lu projenin bir bölümünü içermektedir.

¹ Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli. (mdemir@pau.edu.tr)

ABSTRACT: *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen. *P.aeruginosa* strains secrete several virulence factors, in the form of extracellular proteins. Adhesins, pyocyanin, proteases, hemolysins, exotoxin A and exoenzyme S are some of the virulence factors found in *P.aeruginosa* strains. In this study, the presence of siderophore, total matrix protease and elastase activities were investigated in a total of 157 *P.aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract (n: 81; sputum, bronchoalveolar lavage, tracheal aspirate) and extrapulmonary sites (n: 76; urine, wound, blood) of hospitalized patients. Chrome azurol S (CAS) agar plates were used for detection of siderophore activity. Hide powder azure was used for the investigation of total matrix protease activity and elastin congo red was used to test elastase activity. All strains gave positive reaction on CAS agar. Enzyme activities of the test strains were compared with the activity of *P.aeruginosa* PAO1 positive control strain. Mean total matrix protease and elastase activities were less than *P.aeruginosa* PAO1 activity in the test strains, however, some strains exhibited activity higher than PAO1. There was no significant difference for mean protease and elastase activities between the strains isolated from lower respiratory tract samples and the others ($p<0.05$), as well as no difference with respect to antibiotic resistance ($p<0.05$). It was found that ceftazidime and cefoperazone were the most resistant agents in both groups (67.9% and 57.9% for ceftazidime and 49.3% and 48.7% for cefoperazone, respectively). It was concluded that further in vivo studies are necessary to clarify the role of virulence factors of *P.aeruginosa* in the establishment of infection in different body sites.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors, siderophore, elastase, total matrix protease.

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa önemli bir fırsatçı patojendir. *P.aeruginosa* suşları hastane kaynaklı pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, cerrahi yara yeri enfeksiyonu, yanık sonrası enfeksiyonları ve bakteriyeminin önemli nedenlerindendir. *P.aeruginosa* entübe hastalarda ventilatörle ilişkili ölümcül seyredebilen pnömonilerde en önemli etken patojen olarak bildirilmiştir^{1,2}.

P.aeruginosa suşları çeşitli genler aracılığı ile hücre dışı proteinler ile ilişkili virülans faktörleri salgırlar. Adezinler, pyosyanin, proteazlar, hemolizinler, ekzotoksin ve ekzoenzim S *P.aeruginosa* suşlarında tanımlanmış virülans faktörleridir^{1,2}. Hemolizin ve siderofor proteinleri, bakterinin konak hücrelerden demir elementini kazanmasını sağlarlar^{3,4}. *P.aeruginosa* suşlarının siderofor ürettikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir^{5,6}. *P.aeruginosa* suşlarında siderofor yapısında olan “pyochelin” ve “pyoverdin”, “pseudobaktin” olarak isimlendirilmektedir⁷.

P.aeruginosa suşlarının kolonizasyonunda ve akut enfeksiyon oluşturmada ekstraselüler virülans faktörlerinin önemli rolü vardır. Proteazlar *P.aeruginosa* suşlarında akut enfeksiyon sırasında temel rol oynamaktadır. *P.aeruginosa*, LasA elastaz, LasB elastaz ve alkalın proteaz gibi çeşitli proteazlar sentezlemektedir¹. Elastaz, elastin ve kollajeni parçalayan klasik bir metalloproteazdır. Elastiyolitik aktivite, olasılıkla enfeksiyonun başlangıç evresinde elastin içeren akciğer dokusunun yapısında bozulmaya ve doku içi kanamaya neden olmaktadır¹. Elastazın *P.aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda önemli rol oynadığı bildirilmiştir^{8,9}. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, Las B elastazın pnömoni oluşumunda önemli bir virülans faktörü olduğu bildirilmiştir^{1,9}.

P.aeruginosa suşlarının kolonizasyonunda virülans faktörlerinin rolünün olduğu bilinmekle birlikte, farklı bölgelere kolonizasyon ve enfeksiyondan sorumlu suşların virülans farklılıkları yeterince ortaya konmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, hastanede yatan hastalara ait alt solunum yolu örnekleri ile diğer enfeksiyon bölgelerinden alınan örneklerden etken olarak izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında total matriks proteaz, elastaz ve siderofor varlığının ve örnekler arasındaki farklılığın araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Çalışmaya, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yatan hastalara ait örneklerden izole edilen ve *P.aeruginosa* olarak tanımlanan suşlar alındı. Tüm suşların daha önceden antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile ve CLSI standartlarına göre belirlenmişti. Hastaların tekrarlayan örnekleri çalışma dışında tutuldu ve aynı hastadan farklı bölgelerden gönderilmiş olan örneklerden sadece biri çalışmaya alındı. Toplam 157 *P. aeruginosa* suşu siderofor, total matriks proteaz ve elastaz üretimi yönünden araştırıldı. Total matriks proteaz ve elastaz araştırmasında pozitif kontrol suş olarak *P.aeruginosa* PAO1 suşu (Dr.AN Hamood, Dr.JC Hamood; Texas Tech University Health Sciences Center Department of Microbiology and Immunology) kullanıldı.

Siderofor saptanması: "Chrome azurol S (CAS) agar plate" yöntemi ile araştırıldı¹⁰. Bu amaçla 60.5 mg CAS, 50ml distile su ile karıştırıldı ve 10 ml FeIII solüsyonu (1 mM FeCl₃-6H₂O, 10 mM HCL) buna eklendi. 72.9 mg HDTMA (hexadecyltrimethylammonium) 40ml distile suda çözündürüldü ve yukarıdaki solüsyon bu solüsyona yüksek sıcaklıkta yavaşça eklendi. Solüsyonlar iyice çözündürülerek karıştırıldı ve 50°C'ye soğutuldu. Aynı bir yerde 750 ml distile su, 100 ml 10xMM9 solüsyonu, 30.24 g Pipes karıştırıldı ve Pipes'in pH'sı, NaOH ile 6.8'ya ayarlandı. Bu karışım yukarıda 50°C'ye soğutulmuş olan karışım ile karıştırılıp 15 g agar ilave edilerek otoklavlandı. Otoklavlanmış besiyeri 50°C'ye soğutuldu. Filtre edilerek 30 ml (%10) casamino asit, 10ml (%20) glukoz, 1ml thiamine HCl (%0.2) eklendi ve petri kutularına döküldü. Hazırlanmış olan mavi renkli bu besiyerine araştırılan suşların hazırlanmış olan süspansiyonlarından 5 µl olacak şekilde nokta ekimi yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Araştırılan suşların kolonileri etrafında sarı renkte halo'ların görülmesi siderofor üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Total matriks proteaz aktivitesi: Bu amaçla Petermann ve arkadaşları¹¹ tarafından daha önce tanımlanan yöntem uygulandı. Tüm klinik suşlar ve *P.aeruginosa* PAO1, "Luria-Bertani broth" (LBB) içinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Bir gecelik üremeden sonra suşların kültürleri LBB içinde 0.5 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı ve erken durağan faza kadar yeniden inkübe edilerek yoğunlukları değerlendirildi. Daha sonra sıvı besiyerindeki bu bakteri süspansiyonları 20,800xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Total matriks proteaz araştırması için her suş için ayrı bir tüp içinde 20 mg "hide powder azure blue" (HPAB) 2ml 10 mM sodyum HEPES (pH 7.5)-0.5 mM CaCl₂

solüsyonu içinde süspanse edildi. HPAB içeren bu tüpler içine santrifüj edilmiş bakteri süspansiyonlarının süpernatant kısmından 2 µl eklendi. Tüm tüpler çalkalayıcı üzerinde 2 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra tüm tüpler çözünmemiş HPAB partiküllerini çöktürmek için 150xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerin süpernatant kısımlarının absorbansları spektrofotometrede 595 nm'de okutuldu. Bakteri süpernatantı yerine 2 µl distile su ile hazırlanan tüpler negatif kontrol, PAO1 süpernatantından hazırlanan tüpler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Klinik suşların absorbansları *P.aeruginosa* PAO1'den elde edilen absorbanslarla karşılaştırılarak yorumlandı. Sonuçlar *P.aeruginosa* PAO1'in aktivitesinin yüzdesi olarak verildi^{11,12}.

"Skim milk" agarda proteaz aktivitesi: Bu yöntemde "Brain Heart Infusion broth" içinde %3 "skim milk", %1.5 agar olacak şekilde hazırlanan "skim-milk" agar (SMA) kullanıldı. Klinik örneklerden elde edilen süpernatantın 20 µl'si SMA'da steril pastör pipeti aracılığı ile hazırlanmış olan kuyucuklar içine kondu ve plaklar 25°C'de 18 saat inkübe edildi. Kuyucukların etrafında şeffaflaşma zonu görüldüğünde proteaz aktivitesi pozitif olarak yorumlandı^{13,14}.

Elastaz aktivitesi: Elastiyolitik aktivitenin araştırılmasında daha önce tanımlanan "Elastin Congo red" (ECR) ölçüm yöntemi uygulandı¹¹. Tüm klinik suşlar ve *P.aeruginosa* PAO1 suşu, LBB içinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra 0.5 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde suşların LBB içinde kültürleri hazırlandı ve erken durağan faza kadar yeniden inkübe edilerek yoğunlukları değerlendirildi. Bu bakteri süspansiyonları 20,800xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, elastaz araştırması için her suş için ayrı bir tüp içinde 20 mg ECR 2 ml 10 mM sodyum fosfat tampon (pH 7.0) solüsyonu içinde süspanse edildi. ECR içeren bu tüpler içine santrifüj edilmiş bakteri süspansiyonlarının süpernatant kısmından 2 µl eklendi. Tüm tüpler çalkalayıcı üzerinde bir gece 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tüm tüpler çözünmemiş partikülleri çöktürmek için 150xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede 495 nm'de absorbansları okutuldu. Bakteri süpernatantı yerine 2 µl distile su konarak hazırlanan tüpler negatif kontrol, PAO1 süpernatantından hazırlanmış olan tüpler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Klinik suşların absorbansları PAO1'den elde edilen absorbanslarla karşılaştırılarak yorumlandı. Sonuçlar *P.aeruginosa* PAO1'in aktivitesinin yüzdesi olarak verildi^{11,12}.

İstatistiksel değerlendirme: Tüm suşlar PAO1'den elde edilen absorbansın yarısından daha az absorbans vermişse düşük aktiviteli, yarısından fazla absorbans vermişse normal-yüksek aktiviteli olarak değerlendirildi. Düşük ve yüksek aktivite gösteren suş oranlarının ve antibiyotiklere direnç oranlarının karşılaştırılmasında ki-kare; gruplar arasında proteaz ve elastaz aktivitesinin karşılaştırılmasında parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı; p<0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 157 *P.aeruginosa* klinik suşunun 81'i alt solunum yolu örneklerinden (balgam, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat), 76'sı solunum yolu dışı örneklerden (idrar, yara, kan) izole edilmiştir. Alt solunum yolu

örneklerinin çoğu yoğun bakım ünitesinden gönderilen örneklerdir. Tüm suşların siderofor ürettikleri saptanmış, proteaz aktivitesi suşların 150'sinde pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P.aeruginosa* PAO1 ile test edilen suşların total matriks proteaz ve elastaz aktiviteleri karşılaştırmalı olarak Tablo I-III ve Şekil 1, 2'de gösterilmiştir. Düşük ve yüksek aktiviteli izolatlar örnek tiplerine göre değerlendirildiğinde, gruplar arasında total matriks proteaz ve elastaz üreten suş sayısı açısından fark saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0.516$ ve $p=0.141$). Alt solunum yolu izolatları ve diğer izolatlar arasında elastazolitik aktivite karşılaştırıldığında diğer örneklerde ortalama aktivite daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.06$). Total matriks proteaz aktivitesi açısından da gruplar arasında fark yoktur ($p=0.179$).

Tablo I. Klinik Suşların Total Matriks Proteaz ve Elastaz Aktivitesinin PAO1 Aktivitesi İle Karşılaştırılması

Suşlar	Total matriks proteaz aktivitesi *ortalama-ortanca (min-max)	Proteaz aktivitesi	Elastaz aktivitesi* ortalama-ortanca (min-max)
Pozitif kontrol suş (PAO1)	100	+	100
Alt solunum yolu izolatları (n=81)	62-31.8 (1-277)	77	41.7-27.9 (0-153)
Diğer izolatlar (n= 76)	77.2-36.6 (4-365)	73	50.7-41.9 (0-185)
Toplam (n=157)	69-34 (1-365)	150	46-34 (0-185)

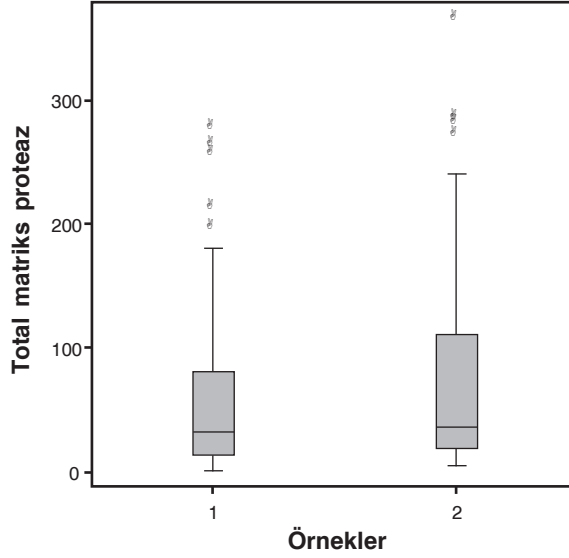
* Sonuçlar PAO1 aktivitesinin yüzdesi olarak verilmiştir. PAO1 aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

Tablo II. Klinik Suşların Total Matriks Proteaz Aktivitesinin PAO1 Aktivitesi Yüzdelik Dilimlerine Göre Dağılımı

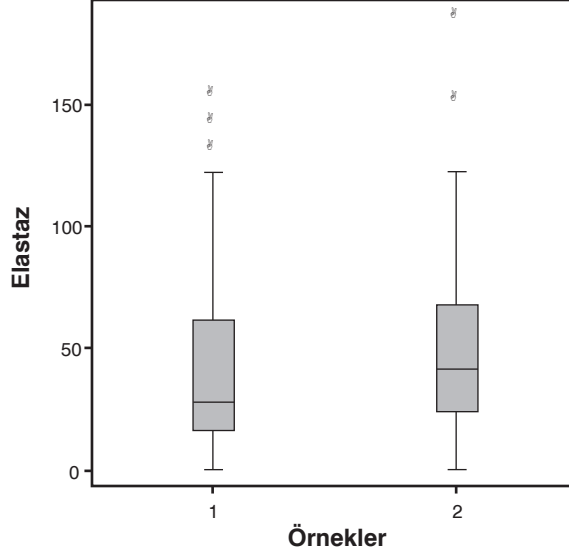
Suşlar	PAO1 Aktivitesine göre yüzdelik dilimler					Toplam
	Düşük aktivite sayı (%)	25-50	Yüksek aktivite sayı (%)	101-200	>200	
	<25		51-100			
Alt solunum yolu izolatları (n=81)	35 (43)	16 (20)	12 (15)	13 (16)	5 (6)	81 (100)
Diğer izolatlar (n=76)	27 (35)	17 (22)	10 (13)	11 (14)	11 (14)	76 (100)
Toplam (n=157)	62 (39)	33 (21)	22 (14)	24 (15)	16 (10)	157 (100)

Tablo III. Klinik Suşların Elastaz Aktivitesinin PAO1 Aktivitesi Yüzdelik Dilimlerine Göre Dağılımı

Suşlar	PAO1 Aktivitesine göre yüzdelik dilimler				Toplam
	Düşük aktivite sayı (%)		Yüksek aktivite sayı (%)		
	<25	25-50	51-100	101-200	
Alt solunum yolu izolatları (n=81)	34 (41)	24 (30)	14 (17)	9 (11)	81 (100)
Diğer izolatlar (n=76)	23 (30)	24 (32)	17 (22)	12 (15)	76 (100)
Toplam (n=157)	57 (36)	48 (31)	31 (20)	21 (13)	157 (100)



Şekil 1. Suşların total matris proteaz aktivitesinin PAO1 aktivitesine göre dağılımı. 1: Alt solunum yolu izolatları, 2: Diğer izolatlar (PAO1 aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir).



Şekil 2. Suşların elastaz aktivitesinin PAO1 aktivitesine göre dağılımı. 1: Alt solunum yolu izolatları, 2: Diğer izolatlar (PAO1 aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir).

Çalışılan suşların çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları Tablo IV ve V'de görülmektedir. Alt solunum yolu izolatları ile diğer izolatlar arasında antibiyotiklere direnç oranları yönünden fark bulunmamıştır. Total proteaz aktivitesi düzeyi ile

direnç oranlarına bakıldığında, piperasilin-tazobaktam dışında ($p=0.037$) anlamlı bir fark saptanamamıştır. Elastaz aktivitesi düzeyi ile antibiyotiklere direnç oranları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.005$).

Tablo IV. Klinik İzolatların Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotikler	Alt solunum yolu izolatları	Diğer izolatlar (n: 76)	Toplam (n:157)
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Seftazidim	55 (67.9)	44 (57.9)	99 (63.1)
Sefoperazon	40 (49.3)	37 (48.7)	77 (49.0)
Sefepim	32 (39.5)	20 (26.3)	52 (33.1)
Piperasilin	29 (35.8)	18 (23.7)	47 (29.9)
Piperasilin/tazobaktam	21 (25.9)	11 (14.5)	32 (20.4)
Aztreonam	33 (40.7)	40 (52.6)	73 (46.5)
Gentamisin	31 (38.3)	24 (31.6)	55 (35.0)
Amikasin	28 (34.6)	20 (26.3)	48 (30.6)
Tobramisin	25 (30.9)	26 (34.2)	51 (32.5)
Netilmisin	30 (37.0)	23 (30.2)	53 (33.7)
Siprofloksasin	9 (11.1)	13 (17.1)	22 (14.0)
İmipenem	24 (29.6)	17 (22.3)	41 (26.1)

Tablo V. Klinik İzolatların Enzim Aktivitesi Düzeylerine Göre Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotikler	Proteaz aktivitesi		Elastaz aktivitesi		Toplam (n: 157)
	Düşük (n: 95)	Yüksek (n: 62)	Düşük (n: 105)	Yüksek (n: 52)	
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Seftazidim	55 (57.8)	44 (71.0)	69 (65.7)	30 (57.6)	99 (63.1)
Sefoperazon	45 (47.4)	32 (51.6)	57 (54.2)	20 (38.5)	77 (49.0)
Sefepim	28 (29.5)	24 (38.7)	33 (31.4)	19 (36.5)	52 (33.1)
Piperasilin	29 (30.5)	18 (29.0)	34 (32.3)	13 (25.0)	47 (29.9)
Piperasilin/tazobaktam	25 (26.3)	7 (11.3)	21 (20.0)	11 (21.1)	32 (20.4)
Aztreonam	45 (47.4)	28 (45.1)	50 (47.6)	23 (44.2)	73 (46.5)
Gentamisin	33 (34.7)	23 (35.5)	33 (31.4)	19 (36.5)	55 (35.0)
Amikasin	28 (29.5)	20 (32.3)	31 (29.5)	17 (32.6)	48 (30.6)
Tobramisin	31 (32.6)	20 (32.3)	34 (32.3)	17 (32.6)	51 (32.5)
Netilmisin	33 (34.7)	20 (32.3)	36 (34.2)	17 (32.6)	53 (33.7)
Siprofloksasin	11 (11.6)	11 (17.7)	12 (11.4)	10 (19.2)	22 (14.0)
İmipenem	29 (30.5)	12 (19.3)	26 (24.7)	15 (28.8)	41 (26.1)

TARTIŞMA

Pseudomonas aeruginosa insanda farklı bölgelerde ve farklı koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan bir patojendir. Enfeksiyonların şiddetinde konak hücre yanıtının öneminin yanında bakteriye ait virülans faktörleri de son

derece önemli rol oynamaktadır. *P.aeruginosa*'nın virülansı birçok faktöre bağlıdır. Bakterinin üreme ortamının koşulları ve bakteri tarafından salgılanan elastaz, proteaz, siderofor, ekzotoksin A ve ekzoenzim S virülansı belirleyen önemli faktörlerdir^{8,9,15}. Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *P.aeruginosa* suşlarının siderofor, proteaz ve elastaz üretimlerinin belirlenmesi ve alt solunum yolu ile diğer örneklerden izole edilen suşlar arasında enzim üretimi yönünden farklılık olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Özellikle ventilatör ile ilişkili solunum yolu enfeksiyonları ve kistik fibrozisli olguların akciğer enfeksiyonlarından *P.aeruginosa* sıklıkla izole edilmektedir. *P.aeruginosa* suşları, siderofor aracılı demir kazanma sistemleri ile konak hücrenin demir bağlayan transferin ve laktoferrin gibi yapılarından demiri koparır ve üremeleri için serbest demiri kullanırlar. *P.aeruginosa* için çeşitli demir transport ve kazanım sistemleri tanımlanmıştır. Kimyasal olarak "pyoverdin (hidroksamat tip)" ve "pyochelin (fenolat tip)" yüksek afiniteli siderofor olarak tanımlanmıştır^{6,7}. Bu sideroforların enfeksiyonun oluşumundaki rolleri deneysel enfeksiyon modellerinde çalışılmıştır¹⁵⁻¹⁷. Çalışmamızda da siderofor varlığı CAS agar yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntemde tip tayini yapılmaksızın, ortamdaki bağlı demirin koparılması temeline dayanarak siderofor varlığı araştırılabilmektedir. Bizim çalışmamızda tüm suşların siderofor üretimleri pozitif olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, ülseratif keratit ile ilişkili 63 *P.aeruginosa* suşunun hepsinin CAS agarda siderofor ürettikleri bildirilmiştir⁶.

Pseudomonas aeruginosa suşlarında virülans faktörlerinin rolü çeşitli klinik ve deneysel çalışmada araştırılmıştır^{15,18-24}. *P.aeruginosa* suşları çeşitli yapıda proteaz sentezlemektedir. LasA, LasB ve alkalin proteaz bunlardan bazılarıdır. Tüm bu proteazların varlığı total proteaz aktivitesini oluşturur. Çalışmamızda da total matriks proteaz aktivitesi araştırılmış ve hem alt solunum yolu (ASY) hem de diğer örneklerden izole edilen suşların çoğunda pozitif bulunmuştur. PAO1 aktivitesi ile karşılaştırıldığında, ASY örneklerinin ortalama olarak PAO1 aktivitesinin %62'si kadar; diğer örneklerin ortalama olarak PAO1 aktivitesinin %77'si kadar total matriks proteaz aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. Ancak gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın ASY örneklerinden PAO1'in aktivitesinin %277'si kadar, diğer örneklerden %365'i kadar yüksek aktivite gösteren suşlar da tespit edilmiştir (Tablo I). Matar ve arkadaşları²¹, hem klinik hem de çevresel örneklerden izole ettikleri suşların hepsinde (%100) proteaz aktivitesi saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda proteaz aktivitesi SMA yöntemi ile yedi suшта negatif olarak bulunmuş, buna karşın suşların %95'inde farklı düzeylerde olmakla birlikte pozitif olarak saptanmıştır.

Elastin damar duvarının ve akciğer dokusunun önemli bir yapı elemanıdır. *P.aeruginosa* suşları suşlarında hem LasA hem de LasB elastiyolitik aktiviteden sorumludur. LasB elastaz sadece elastini değil, fibrin ve kollajeni de parçalar; aynı zamanda IgG, IgA, hava yollarındaki lizozim ve kompleman proteinleri gibi bağışıklık sisteminde rol alan molekülleri inaktive ederek konak savunmasının zayıflamasına neden olur¹. Elastaz üretiminin *P.aeruginosa* suşlarında çeşitli faktörlerle düzenlendiği ve üreme oranının elastaz üretiminde rol aldığı

bildirilmiştir⁸. Bizim çalışmamızda, tüm suşların aynı üreme ortamında olmalarına ve test edilecek yoğunluğun aynı olmasına özellikle dikkat edilmiştir. Bu çalışmada, iki suş dışında araştırılan tüm suşların elastaz aktivitesi gösterdiği, ancak bazı suşların kontrol suşuna göre daha az, bazılarının daha fazla elastaz aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır (Tablo III, Şekil 2). PAO1 aktivitesi ile karşılaştırıldığında, ASY izolatlarının %71'inin, diğer izolatların ise %62'sinin PAO1 aktivitesinin yarısından daha az aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Ancak PAO1'e göre göreceli olarak az aktivite göstermiş olsalar da, suşların çoğunluğunun elastaz aktivitesinin pozitif olması önemlidir. Çalışmamızda ASY suşları ve diğer suşlar arasında elastiyolitik aktivite yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır. Hamood ve arkadaşları⁸ yaptıkları çalışmada, trakeal, üriner ve yara örneklerinden izole edilen suşlar arasında elastaz üretimi açısından fark bulamadıklarını, ancak yüksek miktarda elastaz ve fosfolipaz C üretiminin bu enfeksiyonlarda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Yağcı ve arkadaşları¹⁴, *P.aeruginosa* izolatları arasında elastaz ve alkali proteaz oranını anlamlı bir şekilde yüksek saptadıklarını bildirmişlerdir. Çıragil ve Söyletir²⁴ çalışmalarında, farklı vücut bölgelerinden izole edilen suşlar arasında elastaz üretimi yönünden fark bulamadıklarını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, klinik ve çevresel *P.aeruginosa* suşlarında proteaz ve elastaz aktivitesi araştırılmış ve klinik izolatların %87'sinde elastaz aktivitesi pozitif bulunmuştur²¹.

Pseudomonas aeruginosa suşları bazı antimikrobiyal maddelere karşı doğal olarak dirençlidir. Ancak *P.aeruginosa* suşları başlangıçta duyarlı oldukları bazı antimikrobiyal maddelere karşı plazmid aracılı enzimler üzerinde değişim, indüklenebilir beta-laktamaz üretimi, "multidrug efflux" pompası gibi çeşitli mekanizmalar ile sonradan direnç geliştirmektedir²⁵. Özellikle hastane enfeksiyonu ile ilişkili suşlarda direnç gelişimi daha fazladır. Bu çalışmada araştırılan suşların antibiyotiklere direnç oranları Tablo IV'de görülmektedir. Suşlarda en yüksek direnç seftazidim (%63.1), sefoperazon (%49) ve aztreonam (%46.5) karşı saptanmıştır. ASY suşları ile diğer suşlar arasında direnç oranları açısından fark bulunmamıştır. Ülkemizde *P.aeruginosa* suşlarında antibiyotik direncine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır²⁶⁻²⁸. Çalışmamızda PAO1'e göre enzim aktivitesi daha düşük ve yüksek olan suşlarda antibiyotik direnç oranları Tablo V'de verilmiştir. ASY suşları ile diğer suşlar arasında enzim aktiviteleri açısından fark bulunmadığından, araştırılan tüm suşlar içinde düşük aktiviteli ve yüksek aktiviteli suşlar antibiyotiklere direnç oranları yönünden karşılaştırılmıştır. Total proteaz aktivitesi ile direnç oranlarına bakıldığında, piperasilin-tazobaktam (PIP/TAZ) dışında ($p=0.037$) anlamlı bir fark bulunamamıştır. Elastaz aktivitesi düzeyi ile antibiyotiklere direnç oranları arasında da fark saptanmamıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, *P.aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimi ile virülans faktörlerinin ve virülans genlerinin ilişkisinin olup olmadığı araştırılmıştır²⁹⁻³⁰. Yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* suşlarında beta-laktamaz regülasyon mekanizmasında rol alan *ampR* geninin, antibiyotik direnci ve ekstraselüler proteaz ve pyosyanin gibi virülans faktörlerinin üretimi ile ilişkili bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir²⁹. *AmpR* genindeki bir mutasyonun hem Las A proteaz hem de Las B proteaz üretimi üzerine etkisi olduğu, *ampR* yokluğunda

Las A proteaz üretiminin arttığı, *ampR* geninin LasA proteaz üretimini negatif olarak düzenlediği ve ayrıca indükleyicilerin varlığında Las B proteaz üzerine pozitif düzenleyici olduğu bildirilmiştir²⁹. Diğer bir çalışmada çoklu antibiyotik direnci olan iki suşta “wild” tipe göre pyosiyanin, pyoverdin, kazeinaz ve elastaz gibi “quorum-sensing” genleri ile düzenlenen bileşiklerin aktivitesi daha düşük bildirilmiştir³⁰. Bizim çalışmamızda, toplam proteaz düzeyi PAO1’den yüksek olan suşlarda PIP/TAZ direnci daha düşük saptanmış ve aradaki fark anlamlı bulunmuştur. Bu farklılığın, PIP/TAZ direnci olan suş sayısının toplam suşlar içinde daha az olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha çok sayıda PIP/TAZ dirençli suşta enzim aktivitelerinin çalışılması ve benzer sonucun bulunması durumunda bu ilişkinin tesadüfi olmadığı düşünülebilir. Bütün bu değerlendirmelerin ışığında PIP/TAZ direnci ile virülans genleri arasında gerçek anlamda bir ilişkinin olup olmadığının ileri fenotipik ve moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Hem çoklu antibiyotik direnci olan hem de PIP/TAZ direnci olan *P.aeruginosa* suşlarında virülans genlerinin çalışılması yararlı olacaktır.

Bizim çalışmamızda, ASY izolatları ile diğer izolatlar arasında araştırılan virülans faktörleri açısından fark bulunmamıştır. Ancak *P.aeruginosa* suşlarının özellikli konakta ve özellikle belli bölgelerde enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir. Kistik fibrozis gibi klinik durumlarda akciğer enfeksiyonlarının önemli bir nedeni *P.aeruginosa*’dır³¹. Özellikle akciğer dokusuna yerleşme ve yayılımı, elastaz üretiminin önemli bir virülans faktörü olduğu bilinmektedir. Proteaz üretiminin tüm suşlarda belli düzeyde bulunmuş olması nedeniyle bakterinin yerleştiği bölgede elastin, kollajen veya laminin gibi yapıların varlığında daha fazla yayılım göstereceği ve buna bağlı olarak daha şiddetli enfeksiyon gelişeceği düşünülebilir. Suşların virülans faktörlerinin mi yoksa elastin, kollajen ve laminin varlığı gibi enfeksiyon bölgesinin özelliklerinin mi enfeksiyonun şiddetinde belirleyici olduğu üzerine ileri deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışmada suşların virülans özellikleri açısından farklılık bulunmamış olmakla birlikte, kendi hastanemizdeki suşların virülans özelliklerinin ve antibiyotiklere direnç oranlarının bilinmesinin, özellikle sürekli ventilatöre bağlı ve pnömoni riski taşıyan süregen hastalarda, kistik fibrozisli ve immün sistemi bakılanmış hastalarda tedavinin düzenlenmesinde fikir verebileceği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda kullandığımız *P.aeruginosa* PAO1 pozitif kontrol suşunu gönderen Prof. Dr. Abdul N. Hamood ve Dr. Jane Colmer Hamood’a (Texas Tech University Health Sciences Center Department of Microbiology and Immunology) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Delden CV, Iglewski BH. Cell-to-cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 551-9.
2. Salyers AA, Whitt DD. *Pseudomonas aeruginosa*, pp: 260-70. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. 1994, ASM Press. Washington DC.

3. Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 1993; 12: 325-48.
4. Gueriot ML. Microbial iron transport. Annu Rev Microbiol 1994; 48: 743-72.
5. Cox CD, Adams P. Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1985; 48: 130-8.
6. Winstanley C, Kaye SB, Neal TJ, Chilton HJ, Miksch S, Hart CA. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. J Med Microbiol 2005; 54: 519-26.
7. Crosa JH. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of regulated genes in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 1997; 61: 319-33.
8. Hamood AN, Griswold JA, Duhan CM. Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. J Surg Res 1996; 61: 425-32.
9. Yanagihara K, Tomono K, Kaneko Y, et al. Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. J Med Microbiol 2003; 52: 531-5.
10. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 1987; 160: 47-56.
11. Petermann SR, Doetkott C, Rust L. Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 632-6.
12. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, et al. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2004; 53: 841-53.
13. Burke V, Robinson JO, Richardson CJ, Bundell CS. Longitudinal studies of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Pathology 1991; 23:145-8.
14. Yagci A, Tuc Y, Soyletir G. Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comparison of two procedures. New Microbiol 2002; 25: 223-9.
15. Mittal R, Khandwaha RK, Gupta V, Mittal PK, Harjai K. Phenotypic characters of urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their association with mouse renal colonization. Indian J Med Res 2006;123: 67-72.
16. Cox CD. Effect of pyochelin on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1982; 36: 17-23.
17. Takase H, Nitani H, Hoshino K, Otani T. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. Infect Immun 2000; 68: 1834-9.
18. Lanotte P, Mereghetti L, Lejeune B, Massicot P, Quentin R. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: correlation between exoenzyme production and patient's state. Ped Pulmonol 2003; 36: 405-12.
19. Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carrere J, Chazalotte JP, Galabert C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1995; 33: 924-9.
20. Rumbaugh KP, Colmer JA, Griswold JA, Hamood AN. The effects of infection of thermal injury by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on the murine cytokine response. Cytokine 2001; 16: 160-8.
21. Matar GM, Chaar MH, Araj GF, Srour Z, Jamaledine G, Hadi U. Detection of a highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas aeruginosa* from nosocomial infections in a medical center. BMC Microbiol 2005; 5: 29.
22. Howe TR, Iglewski B. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo and in mouse eye model. Infect Immun 1984; 43: 1058-63.

23. Zhu H, Thuruthyl SJ, Willcox MD. Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from contact lens-induced microbial keratitis. J Med Microbiol 2002; 51: 1063-70.
24. Çıragil P, Söyletir G. Çeşitli vücut bölgelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aljinat, elastaz ve alkali proteaz üretimleri. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 341-7.
25. Kanchanapoom T, Khardori N. Management of infections in patients with severe burns: impact of multiresistant pathogens. J Burns Surg Wound Care 2002; 1:17.
26. Demirbakan H, Dağlar D, Yıldırım Ç ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005; 35: 183-8.
27. Çetin BD, Özcan N, Oktar M, Hamsan H, Gül M. Yara ve abse örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarındaki üç yıllık değişim. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 244-7.
28. Kılıç A, Küçükaraaslan A, Senses Z, Baysallar M, Doğancı L. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı ertapenemin in-vitro etkinliğinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 355-62.
29. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4567-75.
30. Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B, et al. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 657-64.
31. Şener B. Kistik fibroziste mikrobiyal patogeneze. Hacettepe Tıp Derg 2002; 33: 49-57.