ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ENFEKSİYON KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARI ARASINDAKİ MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE VİRÜLANS GENLERİNİN TANIMLANMASI

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD tarafından hazırlanan **"Farklı Enfeksiyon Kaynaklarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları Arasında Moleküler ve Biyokimyasal Yöntemlerle Virulans Genlerinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması 05/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Eş Danışman : Dr. Najeeb Muhammed HUSEYIN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Farklı Enfeksiyon Kaynaklarından İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları Arasında Moleküler ve Biyokimyasal Yöntemlerle Virulans Genlerinin Belirlenmesi"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (05/01/2022).

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ENFEKSİYON KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARI ARASINDAKI VİRÜLANS GENLERİN MOLEKÜLER VE BİYOKİMYASAL YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Eş Danışman: Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN

Pseudomonas aeruginosa, çubuk şeklinde, kutup kamçıya sahip, tek kamçılı, asporojen, gram negatif bir bakteridir. Bu bakteri mikroskop altında parlak ve küçük küreler halinde görüntü vermektedir. *P. aeruginosa* hastane kaynaklı bileşenlerinin %10-14'ünden sorumludur. Bu bağlamda hastane enfeksiyonlarının en sık nedeninin *P. aeruginosa* olduğunu söylemek mümkündür. Çünkü *P. aeruginosa* mikrobu dünya çapında yaygın bir yayılışa sahiptir. Bu çalışma, yara ve yanık enfeksiyonuna sahip bireylerden *P. aeruginosa*'yı izole etmek için yürütülmüştür. Hastalardan alınan toplam 200 örnek; 100 yara ve 100 yanık olarak ayrılarak kültürlenmiş ve izole edilmiştir.Tüm numuneler için genetik materyal çıkarılmış ve PCR kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır. Virülans faktör genleri (fabD ve nadB), yaralardan izole edilen *P.aeruginosa*'da, yanıklardan izole edilen *P.aeruginosa*'ya göre daha fazla gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları yaradan izole edilen *P. aeruginosa* sayısının 52 %52) olduğunu, diğer yara örneklerinin ise negatif olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlara ek olarak, yanıktan izole edilen *P. aeruginosa* sayısının 59 (%59) olduğunu, diğer yanık örneklerinde ise negatif olduğunu göstermiştir. PCR kullanılarak fabD gen izolatlarının tespitinde, yara izolatlarında 9 (%30) ve yanık izolatlarında 10 (%33), nadB geni ise yara izolatlarında 8 (%27), yanık izolatlarında 10 (%34) olarak tespit edilmiştir.

2022, 63 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa*, fabD ve nadB genleri, Virülans faktörleri, Irak

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL STUDY OF IDENTIFICATION AND DETECTION OF VIRULENCE GENES AMONG *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM DIFFERENT INFECTIOUS ORIGINS

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlkay ÇORAK ÖCAL
Co-Advisor: Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN

Pseudomonas aeruginosa is a rod-shaped, polar flagella, uniflagellate, asporogenous, gram-negative bacterium. This bacterium appears as bright and small spheres under the microscope. *P. aeruginosa* is responsible for 10-14% of hospital-acquired (nosocomial) components. In this context, it is possible to say that the most common cause of nosocomial infections is *P. aeruginosa*. Because *P. aeruginosa* microbe has a widespread distribution worldwide. This study was conducted to isolate *P. aeruginosa* from individuals with wound and burn infections. A total of 200 samples taken from patients; 100 wounds and 100 burns were cultured and isolated. Genetic material was extracted for all samples and their identification was done using PCR. Virulence factor genes (fabD and nadB) were observed more in *P.aeruginosa* isolated from wounds than in *P.aeruginosa* isolated from burns. The results of this study showed that the number of *P. aeruginosa* isolated from the wound was 52 (52%), while the other wound samples were negative. In addition to these results, it was shown that the number of *P. aeruginosa* isolated from the burn was 59 (59%), while it was negative in other burn samples. In the detection of fabD gene isolates using PCR, 9 (30%) wound isolates and 10 (33%) burn isolates, nadB gene was detected in 8 (27%) wound isolates and 10 (34%) burn isolates.

2022, 63 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, fabD and nadB genes, Virulence factors, Iraq

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımdaki tüm zorluklara göğüs geren, hayatımın her aşamasında bana destek olan, en değerlilerim olan annem ve babama, çalışmalarımın her aşamasında yakın ilgi ve önerileriyle bana rehberlik eden, büyük bir anlayış gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca destekleri için Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD
Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Pseudomonas aeruginosa ve Genel Özellikleri **3**
2.2 Epidemiyoloji **4**
2.3 Pseudomonas aeruginosa'nın Neden Olduğu Hastalıklar **6**
2.3.1 P. aeruginosa'nın neden olduğu hastane (nosokomial) enfeksiyonları **7**
2.4 Kistik Fibroz (KF) ve P. aeruginosa Enfeksiyonu **8**
2.5 P. aeruginosa'nın Sebep Olduğu Enfeksiyon ve Hastalıkların Tedavisi **10**
2.6 Pseudomonas aeruginosa'nın Patogenezi: Virülans Faktörleri **11**
2.6.1 Virülans faktörleri **11**
2.6.2 Yapışkanlığı etkileyen virülans faktörleri **13**
2.6.3 Flagella / kamçı (kırbaç) **13**
2.6.4 Tip 4 pilus **14**
2.6.5 Fimbria tipi bağlantı faktörü **14**
2.6.6 Lipopolisakkarit (LPS) **14**
2.7 Kolonizasyonda Etkili Virülans Faktörleri **14**
2.7.1 Çekirdek algılama ile ilişkili virülans faktörleri **15**
2.7.2 Çekirdek algılama ile ilişkili olmayan virülans faktörleri **18**
2.8 Kronik Enfeksiyonda Etkili Virülans Faktörleri **20**
2.8.1 Aljinatlar ve biyofilm oluşumu **20**
2.9 Çalışmamızda Kullanılan Gen Bölgeleri **21**
2.9.1 fabD gen bölgesi **21**

2.9.2 nadB gen bölgesi 22
3. MATERYAL VE METOT 24
3.1 Hasta Seçimi 24
3.2 Yöntem 25
3.2.1 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması 25
3.2.2 DNA hazırlama: izolasyon ve ekstraksiyonu 28
3.2.3 PCR yöntemi ile virülans genlerinin belirlenmesi 31
3.3 Kültür Ortamı Hazırlama 32
3.3.1 Reaktifler ve çözelti hazırlama süreçleri 32
3.3.2 Kullanılan agarlar 33
4. BULGULAR 35
4.1 Deney Sonuçları 35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 39
KAYNAKLAR 42
EKLER 57
ÖZGEÇMİŞ 63

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

ETA	Ekzotoksin A
KF	Kistik fibrozis
KFTİD	Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici
LPS	Lipopolisakkarit
MRSA	Metisiline dirençli S. aureus
O-Ag	O antijeni
QS	Çekirdek tespiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *P. aeruginosa* acpP bölgesi (A) Fab gen kümesi ve yan genler içeren plazmit haritaları (Kutchma et al. 1999)..... 22
Şekil 3.1 Milimetrik cetvel ile inhibisyon zonu çaplarının ölçümü..... 28
Şekil 3.2 Besin agarı..... 33
Şekil 3.3 Beyin kalp infüzyon suyu..... 34
Şekil 3.4 Macconkey agar..... 34
Şekil 4.1 Macconkey agarında *P. aeruginosa* ve oksidaz testi..... 36
Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'nın mikroskop görüntüsü x50..... 36
Şekil 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi..... 36
Şekil 4.4 *P. aeruginosa* izolatlarının fabD gen ürünü..... 38
Şekil 4.5 *P. aeruginosa* izolatlarının nadB gen ürünü..... 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *P. aeruginosa'*nın başlıca virülans faktörleri, etki şekli ve klinik sonuçlar. 12
Çizelge 3.1 Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler ve araçlar..... 25
Çizelge 3.2 Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler..... 26
Çizelge 3.3 Uluslararası antibiyotikler EUCAST sınır değerleri..... 27
Çizelge 3.4 Çalışmamızda kullanılan kültür besiyerleri..... 28
Çizelge 3.5 *P. aeruginosa* elde etmek için kullanılan primerler ve sekans dizileri..... 31
Çizelge 4.1 Yara ve yanıklardan elde edilen *P. aeruginosa* izolatları..... 35
Çizelge 4.2 Yara ve yanık enfeksiyonlarından *P. aeruginosa'da* fabD ve nadB genlerinin tespiti..... 37

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa hemen hemen her organı enfekte edebilen fırsatçı bir patojendir. Kistik fibrozlu bireylerde, mukoid *P. aeruginosa* kolonizasyonu birincil hastalık ve ölüm kaynağıdır (de Oliveira *et al.* 2018). Hastanelerde, *P. aeruginosa* enfeksiyonları öncelikle yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören yanık ve kronik hastalığı olan hastaları etkilemektedir (Yetkin *et al.* 2006).

Klinik ve çevresel örneklerden *P. aeruginosa'*yı saptamak için geleneksel mikrobiyolojik teknikler güvenilirdir, ancak tamamlanması uzun zaman alır. Hastane enfeksiyonlarına neden olan izolatların hızlı teşhisi hastaların tedavi kararları için kritik öneme sahiptir. Belirli bir organizmaya özgü dizilerin amplifikasyonu ile PCR, mikrobiyal türleri hızlı bir şekilde tanımlama yeteneği sağlamaktadır (Khan and Cerniglia 1994).

P. aeruginosa L ve I lipoproteinleri, bakterinin antibiyotiklere ve antiseptiklere karşı doğal direncinden sorumlu olan iki dış zar proteinidir. Bu proteinler yalnızca *P. aeruginosa'*da saptandığından, klinik örneklerde *P. aeruginosa'*nın tanımlanmasında güvenilir bir faktör olabilirler (Nikaido 1994).

Ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz ve sialidaz, tümü hücreden hücreye sinyal ağları tarafından yakından kontrol edilen *P. aeruginosa'*da bulunan virülans faktörlerinden sadece birkaçıdır. Ekzotoksin A, protein üretimini engeller ve virülans faktörü ekzoenzim S, tip III bölüm sistemi yoluyla salınır. Akciğer dokusunda, Las B olarak bilinen bir çinko metalloproteaz, elastolitik aktivite gösterir. Nan1 geni, solunum yoluna yapışmadan sorumlu olan bir sialidaz enzimi üretir (Yahr *et al.* 1995).

Dirençli ve aşırı derecede patojenik hastalıkların yayılması da dünya çapında epidemiyolojik araştırmalarda önemli bir sorun olarak tanımlanmıştır. rRNA dizileri öbakteriler arasında büyük ölçüde korunduğu için, rRNA genlerinin kromozomal DNA kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi (ribotipleme) türler içindeki ve türler arasındaki suşları ayırt etmek için etkili bir yöntemdir (Key 2000).

P. aeruginosa, patojenitesine katkıda bulunabilecek çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Bu çalışmada, farklı enfeksiyon kaynaklarından izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının fabD ve nadB virülans genleri ile değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Moleküler ve biyokimyasal yöntemlerle yapılacak olan tanımlamalarda *P. aeruginosa* enfeksiyonları ile virülans faktörler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığını PCR testleri ile tespit edilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* ve Genel Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa, hastane enfeksiyonlarına neden olan ve birçok moleküle dirençli, gram negatif, fermentatif olmayan bir bakteridir. Özellikle yoğun bakım ünitesinde birçok farklı klinikten izole edilmektedir (Moradali *et al.* 2017). Sadece kliniklerde değil hastanenin genel hijyeni açısından da oldukça önemli sonuçları olan bu bakterinin su kaynaklarını kirlettiği ve salgınlara neden olduğu bilinmektedir (LaBauve and Wargo 2012). Bu sistemler bakterilerin hareketini artırıp besinlere daha kolay ulaşmalarını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda enzimler (Elastaz, Proteaz, DNaz) vasıtasıyla dokulara daha kolay nüfuz etmelerini veya kolonize ettikleri dokuya daha fazla zarar vermelerini sağlar. Ancak bakterilerin en önemli virülans faktörü biyofilm üretimidir (Guentzel 1996).

Pseudomonas cinsi bakteriler doğada yaygındır ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olur. *P. aeruginosa,* çoklu antibiyotik direnci gösterebilir, bu da tedavilerde sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle, seftazidim, gram pozitif ve negatif bakteriler tarafından üretilebilen ve klinik olarak önemli beta-laktamazlara karşı oldukça dirençli olan üçüncü kuşak bir antipsödomonal sefalosporinleri kullanımda antibiyotiklere karşı duyarlılığı izlemek gereklidir. (Caldwell *et al.* 2009).

Pseudomonadaceae familyasına ait *Pseudomonas* cinsinin bakterileri gram negatif çubuklardır. Bu gruptaki *P. mallei,* insanlarda ve hayvanlarda Ruam olarakta bilinen *Malleus* etkeni olmaktadır. Hayvanlarda hastalık etkeni ve sebep oldukları başlıca hastalıklar, köpeklerde, aslanlarda ve kaplanlarda, özellikle atlarda (at, katır, eşek) *Malleus* veya *Ruam* enfeksiyonuna neden olur. *P. mallei* ise insanlarda karşımıza çıkmaktadır (Cigana *et al.* 2009).

2.2 Epidemiyoloji

Malleus özellikle tek toynaklılarda (at, katır, eşek), etoburlarda, keçilerde ve insanlarda görülür. Atlar, enfekte akarsularla kontamine suyu içmesi, sindirim sistemi yoluyla ot yemesi veya bulaşıcı damlacıkları soluması ve vücuttaki yaralarını bulaşması ile enfekte olur. Ayrıca, koşu takımı gibi malzemelere deri lezyonlarından gelen akıntıların kontaminasyonu ve diğer hayvanlar tarafından kullanılması da kontaminasyon nedenleri arasında sayılmaktadır. Hayvanat bahçelerindeki köpekler ile özellikle yırtıcı kedilere (aslanlar, kaplanlar vb.) enfekte hayvanların etleriyle beslenmeleri sayesinde bulaşmaktadır.

Pseudomonas mallei gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, kamçısız, hareketsiz, düz veya hafif kavisli çubuk şeklindedir. Aerobik veya fakülltatif mikroorganizma grubunda bulunmaktadır. Dokulardan yapılan preparatlarda çiftler ve gruplar halinde bulunmasına rağmen, kültürlerde filamentli formlar şeklinde bulunabilirler (Pittet *et al.* 1999, Kim *et al.* 1999). Aynı zamanda, 22-41°C arasında çoğalma özelliğine sahiptirler. 37°C'de 24-48 saat içinde küçük, yuvarlak, dışbükey, yarı saydam ve sarımsı koloniler oluştururlar. Kültür yaşlandıkça zamanla koloni rengi koyu kahverengiye dönüşür. Kanlı agarda hemolize neden olmaz ve glikoz dışındaki karbonhidratları fermente etmez veya zayıf bir etki gösterir. *P. mallei* protein antijenine karşı hazırlanmış olan antiserumlar bazı bakteriler (*A.lignieresi*) ile çapraz reaksiyona girerler fakat spesifik bir ekzotoksin göstermezler. Isıya, ışığa ve dezenfektanlara tepki direnci zayıftır. Et suyu ve agar kültürleri oda sıcaklığında 2-3 ay yaşayabilir. Öte yandan, 60°C sıcaklıkta 30 dakikada ölmektedirler. Soğuk, nemli ve karanlık alanlarda uzun süre hayatta kalabilirler. Ayrıca, Sülfonamid, aminoglikozit, kloramfenikol, tetrasiklin ve eritromisine karşı duyarlı olmaktadırlar (Weinstein *et al.* 2005, Lizioli *et al.* 2003, Kim *et al.* 1999, Erbay *et al.* 2003).

Pseudomonas aeruginosa sporsuz, polar flagellalı, hareketli, gram negatif, genel olarak kapsülleşme olmamış bir mikroorganizma çeşitidir (Murray *et al.* 2003). *P. aeruginosa* karbonhidratları fermente olmaz. Oksidasyon-fermantasyon ortamında glikozdan oksidasyon ile asit oluşturmaktadır (Cunha *et al.* 2010). *Pseudomonas pseudomallei*

faktörü birçok özelliği ile malleus ajanına benzer ancak hareketlidir. R tipinden M tipi boyunca koloniler oluşturmaktadır. Et suyu üzerinde ince bir zar oluşturmaktadır. Glikoz, maltoz, sukroz ve mannitolden asit oluştururlar, jelatini etkilerler ve oksidaz pozitiftir. Bazı suşlar hemolitiktir ve dezenfektanlara karşı dayanıklıdırlar (Ostroff *et al*. 1990).

Yeteri kadar nem olduğunda, küçük bir besin kaynağı beraberinde uzun süre hayatta kalabilir. Tabiatta toprakta ve suda yoğun olarak bulunabilen *P. aeruginosa* bitki, hayvan ve insanlarda patojen olarak varolmaktadır. Sağlıklı kişilerde boğaz, burun mukusu, deri ve dışkıda özdeş küme olmasına rağmen bağışıklık sisteminin baskılandığı hallerde fırsatçı bir patojen olarak enfeksiyona sebep olmaktadır. Hastanelerde; solunum cihazı, yataklar, çarşaflar, gazlı bezler, tamponlar, duşlar, banyolar, tuvaletler ve zeminlerden izolasyon mümkün olmaktadır. Hastanelerden kaynaklı kan, üriner sistem ve akciğer enfeksiyonlarının önemli faktörlerinden biridir. Yanık, mekanik ventilasyon, kemoterapi veya cerrahi müdahale uygulanan hastalarda enfeksiyon sebebi olabilmektedir. Kistik fibrozis akciğer enfeksiyonuna neden olması ve çoklu antibiyotik direncine sahip olması bu bakterinin önemini artırmaktadır (Valles *et al.* 2004, Weber *et al.* 2007, Nseir *et al.* 2002, Rello *et al.* 2002).

P. aeruginosa suşları besiyerinde büyütüldüklerinde çeşitli renklerdedir. En önemli özelliklerinden biri pigment oluşturmalarıdır. Piyosiyanin mavisi; piyoverdin yeşil-sarı; pyorubin kırmızısı ve pyomelanin, siyah-kahverengi pigment oluşumundan sorumlu olan pigmentler olmaktadır (Weinstein 1998). *P. aeruginosa* suşları, oksidaz ve katalazlar pozitif olmakla beraber oksidasyonla karbonhidratları parçalara ayırarak asit oluştururlar. Alkali reaksiyon verirler ve üç şekerli demirli ortamda gaz oluşumu yapamazlar. Aynı zamanda, çok sayıda nitrat ve nitritlerden nitrojen gazı oluşturmaktadırlar (Safdar *et al.* 2005, Edwards *et al.* 2009).

P, aeruginosa türü bakteriler gram negatif, sporsuz, basil, aerobik, kapsülsüz veya kokobasildir. 0,5-1,0 μm ile 1,5-5,0 μm boyutlarındadırlar ve kutup kamçılarıyla hareket ederler. En uygun üreme sıcaklık dereceleri 30-37°C'dir. Ancak, *P.putida* ve *P.florescens* türleri 42°C'de üreme gösterebilirler (Berthelot *et al.* 2001, Bonten *et al.* 1999). *P. Aeruginosa* çeşitli besi ortamlarında morfolojik olarak gözlemlendiğinde koloni alanları

oluşturabilirler. Çeşitli türler tarafından sentezlenen bir tür ekzopolisakkarit olan aljinat, bakterilere mukoid durum kazandırmaktadır. Kistik fibroz hastalarından izole olan suşlar, süreğen obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda sıklıkla mukoid koloniler (M kolonileri) şeklinde görülmektedir. Genellikle, çevreden veya diğer enfeksiyonlardan yalıtılmış olan beta hemoliz yapmış S tipi koloniler veya düşük aljinat üretimleri sebebiyle R tipi koloniler olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanlı agar üzerinde yeşil metalik parlaklık üretirler. MacConkey Agar'da ise Mavi-yeşil bir renk alarak çoğalırlar (Agodi *et al.* 2007, Kropec *et al.* 1993).

2.3 *Pseudomonas aeruginosa'nın* Neden Olduğu Hastalıklar

Asemptomatik kolonizasyondan şiddetli nekrotizan bronkopnömoniye kadar değişkenlik göstermektedir. Enfeksiyon genellikle konağın savunması bozulduğunda veya kistik fibroz gibi anormal salgılar olduğunda gelişir. Hastaneden elde edinilen gram negatif bakteriyemilerin başında *P. aeruginosa* gelmektedir. *P. aeruginosa'*ya bağlı olan endokardit daha fazla intravenöz ilaç kullanımı yapan hastalarda görülmektedir. *P. aeruginosa'ya* bağlı üriner enfeksiyonlar genellikle hastanede tedavi edilmektedir. Bunlar, edinilmiş enfeksiyonlardır ve uzun süreli üriner kateterizasyon, cerrahi veya böbrek nakli ile ilişkilidir. *P. aeruginosa* yanık yaralarında enfeksiyona neden olan en yaygın bakteridir. Vasküler hasar dokuları nekrozu ve bakteriyemi ile sonuçlanmaktadır. *P. aeruginosa* bakteriyemsi tipik ektima gangrenozum adı konan lezyonlar gelişebilmektedir. Özellikle derin apseler, selülit ve büller oluşabilmektedir. Diğer cilt enfeksiyonları arasında suyla temastan sonra gelişen folikülitler (havuz, jakuzi, sıcak su muslukları), sık sık maniküre dayalı tırnak enfeksiyonları bunlar arasında sayılabilmektedir. *P. aeruginosa* sıklıkla "yüzücü kulağı" olarak da adlandırılan dış kulak iltihabının nedeni olabilir. Diyabetik veya yaşlı hastalarda sık görülen kötü huylu dış kulak iltihabı zararlı ve ölümcül bir enfeksiyon türüdür. Altta yatan doku üzerine yayılarak kemik yıkımına veya kraniyal sinir hasarına neden olabilir. Ayrıca kronik otitis media nedeni de olabilir.

2.3.1 *P. aeruginosa'nın* neden olduğu hastane (nosokomial) enfeksiyonları

2.3.1.1 Bakteriyemi

Kronik hemodiyaliz hastalarında bakteriyemi prevalansı %3,8-20 arasında değişim olmaktadır. Arteriyovenöz greftli hastalarda serum albümin düzeyi 3,0 g/dL'nin altında olan hastalarda bakteremi riski artar. Hastalarda genellikle ateş, titreme ve toksik bir tablo bulunur, ancak bazen bulgular çok silik olabilmektedir. Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmalar çoğunlukla gram pozitif bakterilerdir (%50-74) (özellikle *Staphylococcus aureus*). Bakterilerin giriş yolu damar yolu, gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem, deri gibi yerlerdir. Bakteriyemi tanısı için kan kültürü gereklidir, bu nedenle bakteriyemiden şüphelenilen hastalarda kan kültürü alınmalıdır. Bakteriyemi, endokardit, osteomiyelit, artrit, metastatik apse ve pulmoner emboli gibi komplikasyonlara yol açabilir. Bakteriyemik hastalarda tedavi süresi, özellikle etken madde *Staphylococcus aureus* ise, genellikle 4 haftadır. Antibiyotik seçiminde kültür ve antibiyogram sonuçlarının dikkate alınması idealdir ancak bakteriyemi şüphesi olan hastalarda kültür sonucu beklenmeden antibiyotik tedavisine başlanmalıdır. Genellikle gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili kombinasyon tedavisine hemen başlanır. Tedavide gecikme morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır (Kurahashi *et al.* 1999). Bakteriyemi gelişimine neden olabilecek durumlar HIV enfeksiyonu, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar, yetersiz beslenme ve kanser için kemoterapi olarak sıralanmaktadır.

2.3.1.2 Zatürre

Halk arasında pnömoni olarak bilinen zatürre, klinik ve radyolojik olarak saptanan akciğerlerin iltihaplanmasıdır. Yüksek riskli bir hastalık olan pnömoni, Irak'ta ölümlerde beşinci, bulaşıcı hastalıklarda ise ilk sırada yer almaktadır (Hidron *et al.* 2008). Titreme ve titreme ile yükselen ateş, öksürük, sarı-yeşil veya pas rengi koyu balgam, nefes alırken oluşan ağrılar ve akciğer zarı tutulmuşsa oluşan nefes darlığı tipik pnömoninin ilk belirtileri arasındadır. Akciğer grafisinde lober tutulum varsa solunum yetmezliği tipik bir pnömoni semptomu olarak yaşanabilir. Kanda lökositlerde (WBC-Beyaz kan

hücreleri) ve CRP'de artış olmasında, etken ajanlar olarak *Streptococcus pneumoniae, Hemophilus influenza,* gram negatif aeroblar ve anaerobik basiller sıralanmaktadır. Bunların neden olduğu hastalıklarda, subakut ve sinsi bir başlangıç ile eklem ve kas ağrıları, halsizlik, iştahsızlık gibi ön belirtiler görülür. Akciğer dışı organların tutulumuna bağlı kuru öksürük, hırıltılı solunum, baş ağrısı ve karın ağrısı gibi şikayetler tipik pnömoni semptomları arasındadır (Chastre *et al.* 2002). Radyolojide yamalı infiltrasyon ve parakardiyak tutulum görülmektedir. Kandaki lökositler (WBC) normal veya düşük olduğunda neden olan faktörler *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae* (TWAR), *Legionella pneumoniae* virüsleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Grip, RSV, Adenovirus, Coronavirüs). Zatürrenin ana nedenleri bakteri, virüs ve mantarlar olarak tespit edilmiştir. En yaygın patojen *Streptococcus pneumoniae* adı verilen bakteridir. *Mycoplasma pneumoniae* okul çağındaki çocuklarda görülebilir. Çocuklarda ve gençlerde pnömoninin nedeni çoğunlukla viral pnömonidir (%66). Yetişkinlerde bu oran %13 civarındadır. Bakteriyel pnömoni yetişkinlerde daha yaygındır. Viral ve bakteriyel pnömoni arasında ayrım yapmak zordur. Bu nedenle ilk dört saat içinde antibiyotik başlanmalıdır. Faktörler, laboratuvar ve radyolojik bulgular ve klinik duruma göre doktor tipik ve atipik ayrımı yaparak tedaviyi bu bulgulara göre düzenler (Freytes *et al.* 2006, Shime *et al.* 2001).

2.3.1.3 Yanık yara enfeksiyonları

Yanıklar; termal, elektriksel, kimyasal veya elektromanyetik enerjinin neden olduğu ağrılı yaralardır. Sigara ve açık alev, yetişkinlerde yanık yaralanmalarının önde gelen nedenleridir. Hem bebekler hem de yaşlılar yanık yaralanması açısından en büyük risk grubunu oluşturmaktadır (Church *et al.* 2006, Barrow *et al.* 2004, Barret *et al.* 2003, Kobayashi *et al.* 2008).

2.4 Kistik Fibroz (KF) ve *P. aeruginosa* Enfeksiyonu

Kistik fibroz (KF) beyaz ırkta her 2500-3000 kişiden biri en sık görülen otozomal çekinik hastalıklardan biri olmaktadır. Irak'ta yapılan çalışmalar, edogami evliliği sıklığı ve küçük yaş çocuk ölümlerinin yüksek oranda olması toplumumuzda KF çoğunluğunun

3000'de 1 olduğunu göstermektedir. Altta yatan sebep bilinmeden ishal ve solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle ölümcül çocuk hastalığı olarak bilinmesine karşın, 1946 yılında ilk erişkin vakasının bildirilmesinden sonra, bildirilen erişkin hasta sayısı giderek artmıştır. Günümüzde hastalıkla ilgili elde edilen bilgiler ışığında uygun bakım ve tedavi ile erken yaşta teşhis konulan hastaların ortalama yaşam süreleri belirlenmektedir. KF genetiğine ilişkin artan verilerle birlikte erişkin dönemde teşhis edilen atipik görünüm ve hafif mutasyonlara sahip hastalar tanımlanabilmektedir (Bobadilla *et al.* 2002).

Bu hastalık, ilk olarak 1938'de Dorothy Andersen tarafından tanımlanmıştır. Andersen, beslenme yetersizliğine karşın büyüyen karınları sert, soluk renkli ve pis kokulu ishal atıkları olan çocukların varlığını tespit etmiştir. Bu çocukların tümü ikinci yıllarında bronşiyal ve akciğer enfeksiyon hastalığına yakalanmışlardır. Ayrıca, patolojik anotomilerde enfeksiyonun daha fazla solunum yollarında ortaya çıktığı ve solunum yolu lümenlerinin gri-yeşil yapışkan bir inflamasyonla kapatıldığı görülmüştür (Döring *et al.* 2014, Gibson *et al.* 2003, Hodson 2000). Bu durum kistik fibroz hastalarında karşılaşılan önemli sorunlardan biridir. 1950'lerin başında bu hastalık epitel hücrelerde tuz taşınmasına neden olmuştur. Di Sant'Agnese vd. (1953) yapmış oldukları çalışmada, hasta çocukların terinin çok fazla oranda tuz kaybına neden olduğunu göstermiştir (Gibson *et al.* 2003).

Bilim adamları, yaptıkları çalışmalar sayesinde bakterilerin enfeksiyon davranışlarının daha iyi anlaşılacağını ve böylece KF hastalarında sık görülen bu enfeksiyonlarla gelecekte daha iyi mücadele edileceğini belirtmişlerdir (Doggett *et al.* 1971, Hancock *et al.* 1983, Häußler *et al.* 2003, Oliver *et al.* 2000, Henrichfreise *et al.* 2007). Çalışmalar, mevcut antifibrotik ilaçların, nihayetinde ölümcül olan hastalığın ilerlemesini yavaşlatmasına rağmen, akciğer transplantasyonu ile elde edilebilecek normal akciğer fonksiyonlarını geri getiremediklerini göstermiştir (Puchelle *et al.* 2002, Mall 2008).

Belçika'da üçüncül bir IPF merkezinde fenomenolojik nitel bir çalışma yürütülmüştür. Kronik Bakım Modeli (CCM) entegre bir bakım çerçevesi olarak kullanılmıştır. Hastalar ve sağlık çalışanları ile bireysel görüşmeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Veri tematik analiz kullanılarak yorumlanmıştır (Schroder *et al.* 2002, Bals *et al.* 1999).

Gerekli bilgiler, 9 IPF hastası (57-83 yaş) ve 9 sağlık çalışanından elde edilmiştir. Hastaların tamamı semptomlarını tanımanın ve tanı koymanın zorluğundan bahsetmiştir (Matsui *et al.* 1998). Sağlık uzmanları, deneyimli bir ekiple hastanın klinik verilerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesinin öneminden bahsetmiştir (Salunkhe *et al.* 2005, Speert *et al.* 2002). Hastalara tanı süreçleri sorulduğunda, biri hariç tümü yerel sağlık hizmetlerinde tanı aldıklarını, bazıları ise memnuniyetsizliklerini bildirmiştir. Ayrıca iki katılımcı sağlık uzmanlarının tanıyı açıklama biçiminin çok önemli olduğunu ifade etmiştir. Hastalar tedaviden çok prognoza odaklanma konusunda olumsuz deneyimler paylaşmışlardır (Grimwood 1992, Starner and McCray 2005).

2.5 *P. aeruginosa*'nın Sebep Olduğu Enfeksiyon ve Hastalıkların Tedavisi

P. aeruginosa enfeksiyon örneklerinden, enfeksiyon bölgesine göre bakteri izolasyonu için alınacak; balgam, idrar, irin, beyin omurilik sıvısı, sürüntü örnekleri bulunmaktadır. *P. Aeruginosa*, gram negatif olması, çubuk şeklindeki görünümü, üzüm gibi benzeri bir yapı göstermesi, koku, koloni tipi ve pigment oluşması ile kolayca ayırt edilebilmesine rağmen, oksidaz pozitifliği, üç şekerli demirli alanlarda mayalanma yapmaması ile de tanımlanabilir. 42 °C'de büyümesini sağlamak için, konvansiyonel ve biyokimyasal testlere ek olarak kullanılabilen otomatik sistemler, yüksek doğrulukta tanımlama yaparak kısa sürede olumlu sonuç verebilmektedir (Smith *et al.* 2016).

KF hastalarının yaşam beklentisinin artması ile bu hastaların yaklaşık %70-90'ında *P. aeruginosa* ile kolonizasyon ve enfeksiyonları gelişmektedir. Çalışmalar, KF hastalarında *P. Aeruginosa* ile birlikte akciğer enfeksiyonlarının, epitel hücrelerinde KFTR proteininin kaybı ile bağlı olduğunu göstermektedir (Nixon *et al.* 2001). *P. aeruginosa*'nın dış olan zarında var olan oligosakkarit, akciğer epitel hücrelerinde KFTR proteinİ ile bağlanabilir. *P. Aeruginosa*, almaçlı hale gelen KFTR ile bakteriyi kendisine kanalize eden epitel hücresi endositozla bakteriyi iç kısma alır ve bakteri ile birlikte doku yüzeyinden ayırır. KF hastalarında KFTR proteini bozulduğu için epitel hücresi bakterileri içine alamamaktadır. Bu nedenle de inflamatuar cevap oluşturmamaktadır. Bu şekilde bakteriler, enfeksiyon karşısında savunmanın öncü adımı olan tabii bağışıklık

tepkisinden kurtulabilir. Solunum yolundaki temizlenemeyen bakteriler kolonize halinde oluşmaya başlamaktadır (Frederiksen *et al.* 1997, Ratjen *et al.* 2001).

P. aeruginosa yalnızca akciğerleri organize eder ve kroniktir. Enfeksiyon esnasında eksik bağışıklık, mikroaerofilik/anaerobik alan oluşumu ve iyileştirmede kullanılan antibiyotiklerin mevcudiyet gibi stres durumları türlü fenotipik değişikliklere (mukoid koloniler, minik koloni varyantlarının oluşması, flagella olmaması, lipopolisakkarit eksikliği ve antibiyotiğe dirençli suşlar) neden olur (Mendelman *et al.* 1985). İlk kolonizasyon özellikle mukoid olmayan suşlarla olur, yalnız kolonizasyon süreklileştikçe suş mukoid fenotipe dönüşür ve akciğerlerde üstün hale gelmektedir. KF hastalarının akciğerlerindeki süreyle değişen alanlar, bakterilerin bir mukoid fenotipe çevrilmesi için şartlı olan aljinat sentezini uyarır. Aljinat ayrıca biyofilm meydana gelişimine de katkıda bulunur. *P. aeruginosa'*daki mucA geni, anti sigma faktörünü kodlar. Normal ortamlarda, anti sigma etmeni, aljinat sentezini elde eden algT genini baskılamaktadır. Ancak KF hastalarında süreğen inflamasyonun oluşturduğu oksijen köklü mucA geninde mutasyonlara neden olarak aljinat sentezinde artışa sebep olur. Aljinat sentezi ile oluşan biyofilm, bakterilerin antibiyotik ürünlere karşı ve imumite sisteminin korunmasında rol oynamaktadır (MacLeod *et al.* 2000).

2.6 *Pseudomonas aeruginosa'nın* Patogenezi: Virülans Faktörleri

2.6.1 Virülans faktörleri

*P. aeruginosa'*nın patogenezi, enfeksiyon sırasında farklı düzeylerde etki gösteren ve hem konakçı organizmada hem de çevresel ortamda hayatta kalmasını sağlayan virülans faktörlerine bağlı olarak gelişir. *P. aeruginosa'*nın bu etkili virülans faktörleri hem hücre içinde hem de dışında etkilidir (Lazdunski 1998). Çizelge 2.1'de *P. aeruginosa'*nın başlıca virülans faktörlerine, etki şekli ve klinik sonuçları verilmektedir.

Çizelge 2.1 *P. aeruginosa'*nın başlıca virülans faktörleri, etki şekli ve klinik sonuçlar

Hastalık oluşturma faktörü	**Virülans Mekanizması (Eylem Modu)**	**İndüklenmiş Patojenik Etki (Klinik Sonuçlar)**
Lipopolisakkarit (LPS)	Sitokin üretiminin uyarılması	Şok
Pili / pilus	Solunum epitel hücrelerine yapışma (yapışma)	Solunum yolu patojenitesi
Kamçı / kırbaç	Müsinlere yapışma Hareketlilik: patojenin konak dokulara doğru hareketi	Bakteri yayılımı
Aljinat	Mukozal fenotip Trakeal hücrelere yapışma Fagositozun inhibisyonu, antibiyotik etkisinin inaktivasyonu ve immün yanıt	Solunum patojenitesi Konak bağışıklık sistemi ve antibiyotiklere karşı direnç (fagositoz) Suşların mukoid karakterinin belirlenmesi
Ekzotoksin A	Hedef hücrelerin protein sentezinin inhibisyonu	Hücre ölümü: doku nekrozu (virülansta çok önemli rol)
Ekzoenzim S	Sitotoksik Etki, LT proliferasyonu	Doku nekrozu glikopeptitlere zarar vererek vimentin, ıgg ve ıga'ya zarar verir.
Ekzoenzim U	Antifagositik rol	Epitel hücre hasarı Bakteriyemi Septik şok
Ramnolipid	Deterjan etkisi	Yüzey aktif madde hidrolizi
Elastazlar (lasa + lasb)	Elastin, fibrin, interferon, kompleman ve kollajenin bozulması	Elastin içeren dokuların yok edilmesi ve yok edilmesi (Virülansta çok önemli rolü vardır)
Alkali proteaz	Proteoliz	Kornea enfeksiyonları
Piyosiyanin ve Pyoverdin	Diğer bakteriler üzerinde bakterisidal etki, elastaz salınımını arttırma, kirpiklerin hareketini engelleme, demir alımı (tutum), serbest radikal sentezini arttırma.	Piyosiyanik basil sentezini teşvik edin, basil klirensini azaltın, Pulmoner arter vasküliti oluşumu
Çözünür lektinler	Pulmoner (akciğer) hücrelerinin siliyer aktivitesinin inhibisyonu	Solunum yolu patojenitesi Kronik enfeksiyonlar
Fosfolipaz C	Lokal sitolitik etki	Hedef hücrelerin bozulması (pulmoner atelektazi) Akut ve kronik enfeksiyonlar

Özel işlevlere ve değişen aktivite seviyelerine sahip bu virülans faktörler, Akut enfeksiyonlarda invazyon, yayılma, kolonizasyon ve doku hasarı bakımından baskındır. Öte yandan, *P. aeruginosa* kronik enfeksiyonlarda ve özellikle KF hastalarında adaptasyonu farklı düzeylerde gelişebilir. Öyle ki, kronik vakalarda *P. aeruginosa,* fimbria ve flagellum gibi daha immünojenik özelliklerini kaybederek ve solunum yollarının epitel dokusu üzerinde bir biyofilm oluşturarak konağın bağışıklık sisteminden kendini izole edebilmekte ve böylece immünolojik baskılanmayı önlemektedir. Kronik enfeksiyonlarda, hücre dışı virülans faktörlerinin salgılanmasıyla kalıcı inflamasyon oluşur ve *P. aeruginosa* virülans faktörleri akut enfeksiyonda önemli rol oynamaktadır (Lazdunski 1998, Köhler *et al.* 2000, Bardy *et al.* 2003).

2.6.2 Yapışkanlığı etkileyen virülans faktörleri

Yüzeye yapışmadan sorumlu olan birçok yapıştırıcı vardır. Bakterilerin yüzme hareketinden sorumlu olan polar flagella, güçlü bir immünojendir. Toll-like reseptör (TLR) ile etkileşime girerek adezyon sağlar ve bağışıklık tepkisini uyarır. Polar flagella çevreden izole edilen izolatlarda bulunurken, hastane enfeksiyonlarında sık görülmez. Bu, mutant izolatların seçimi ile ilişkilidir. Kısa, filamentli yüzey yapılarına sahip pili, birçok bakteride hareketten sorumlu değilken, seğirmeden sorumlu olmaktadır. Solunum yollarında kolonizasyona destek olan pili biyofilm oluşmasında rol oynar. TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanır ve KFTR'ye bağlanarak virülans açısından önemlidir. Ayrıca, Kistik fibroz hastalarında çeşitli lipid A mutantları bulunmaktadır (Wu *et al.* 2015).

2.6.3 Flagella

Kirpikler Toll aynı reseptörler (TLR5 ve TLR2) birlikte etkileşime girerek NFib'ye bağlı inflamatuar cevabını uyarır ve kalsiyuma özgü olmayan kinaz yolunun aktivasyonu ile IL-8 sentezini başlatır (Köhler *et al.* 2000). Bakteriler kısa, ipliksi yüzey yapılarıdır (DiMango *et al.* 1995). Genel olarak pili prokaryotik hücrelerde hareketten sorumlu değildir. (Feldman *et al.* 1998, Bryan *et al.* 1998, Adamo *et al.* 2004).

2.6.4 Tip 4 pilus

Tip 4 pilus, *Yersinia, Salmonella, Shigella* ve *Pseudomonas* gibi bakteri türlerinde saptanmaktadır. Bakterinin hedef hücre üzerinde bir gözenek açtığı, pilus benzeri oluşumla iki hücre arasında bir köprü yaptığı ve bu köprü yardımıyla efektör proteinleri ökaryotik hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistem olmaktadır (Hahn 1997, Valet *et al.* 2001). Akciğer enfeksiyonlarında direkt doku hasarına neden olan ve rol oynayan bir toksindir. *Pseudomonas'*ın içselleştirilmesinde, ExoT'nin, ExoS gibi ikili bir etkisi vardır.

2.6.5 Fimbria tipi bağlantı faktörü

En son tanımlanan *P. aeruginosa* virülans faktörü, fimbria tipi bağlanma faktörüdür.

2.6.6 Lipopolisakkarit (LPS)

O-spesifik polisakkarit bağları, antijenik özelliklerine dayalı olarak *P. aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında karşımıza çıkmaktadır (Rocchetta *et al.* 1999). TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptör tanıma özellikleri ve KFTR'ye bağlanarak virülans üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kistik fibroz hastaları, bazıları konakçı antimikrobiyal peptitlere dirençli olan ve TLR4 aktivasyonunun artmasına neden olan *P. aeruginosa'*nın farklı lipid A mutantlarına sahiptir (Lynn and Golenbock 1992, Lang *et al.* 2004, Pier 2003).

2.7 Kolonizasyonda Etkili Virülans Faktörleri

*P. aeruginosa'*nın konak hücrelerde kolonizasyonunda etkili olan virülans faktörlerini QS ile ilişkilerine göre ayırarak incelemek mümkündür. Quorum algılama yeni bir keşif olarak değerlendirilebilir ve bazı kaynaklarda çekirdek tespiti, bazı kaynaklarda çoğunluk tespiti ve bazı kaynaklarda nisap tespiti olarak sıralanmaktadır.

2.7.1 Çekirdek algılama ile ilişkili virülans faktörleri

Çoklu ilaç direncine sahip izolatlardaki artış, enfeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu hale getirmektdir. *P. aeruginosa'*da biyofilm üretimi de dahil olmak üzere çok fazla virülans faktörünün QS tarafından düzenlenmesi, yeni antimikrobiyaller geliştirmek için dikkatleri QS'ye odaklamıştır. QS'nin bakteri üremesi üzerine direkt etkisinin olmaması, antibiyotiklerde gözlenen QS inhibisyonunun direnc, kendi gelişimine benzer dirençli suşların seçimine neden olmaması bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Parsek and Greenberg 2000, Smith and Iglewski 2003).

QS inhibitörlerini (QSI) tanımlamak için birçok doğal ve sentetik kimyasal taranarak inhibitör etkileri olan birçok bileşik bulunmuştur. Bu bileşikler üç farklı düzeyde etkiye sahiptirler: (i) AHL sentezinin inhibisyonu, (ii) AHL sinyal molekülünün inaktivasyonu ve (iii) AHL reseptör proteininin inhibisyonudur.

Holo-ACP, L/DS-adenosilhomosistein, sinefungin, butiril-S-adenosilmetiyonin (butiril-SAM) gibi bazı maddelerin AHL üretimini engellediği gösterilmiş olmasına rağmen, bunların bakteriler üzerindeki etkileri in vivo çalışılmamıştır. Ayrıca bakteri metabolizmasında önemli rol oynayan bu moleküllerin diğer hücre fonksiyonlarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir (Mattmann *et al.* 2008).

2.7.1.1 Ekzotoksin A

Enfeksiyöz ajanların çoğu ekzotoksin A'yı sentezleyen *P. aeruginosa* kökenlidir. Tip 2 salgılama sistemi tarafından hücre dışı olarak salgılanan bir toksindir. ExoA, *P. aeruginosa'*nın virülansında önemli bir rol oynar (Iglewski and Sadoff 1979). ADP-ribozil transferaz özelliği ile uzama etkeni 2 (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini engelleyerek hücre ölümüne neden olarak difteri toksinine benzer etkisini göstererek, invazyon ve bölgesel doku hasarından sorumludur. ExoA üretimi olmayan mutant ile yabani tip *P. aeruginosa* suşunu karşılaştıran bir çalışmada, hayvan deneyi ile toksin üretmeyen suşun 20 kat daha az öldürücü olduğu gösterilmiştir (Bell and Eisenberg 1996, Fitzgerald *et al.* 1980, Foley *et al.* 1995, Wick *et al.* 1990).

2.7.1.2 Elastazlar

Elastin, akciğerlerin genişlemesini ve büzülmesini sağlayan bir proteindir ve akciğerlerdeki proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa'*nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumlu olmaktadır (Matmann *et al.* 2008, Chugani *et al.* 2001, Ledgham *et al.* 2003). Enzimler sinerjik bir etki ile elastini parçalar. LasA, *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında var olan penta glisin peptidoglikan köprülerini parçalayan bir serin metalloproteinazdır. LasA proteaz elastini parçalayamaz, ancak lasB elastazın elastolitik aktivitesini artırmaktadır. LasB, LasA proteaz tarafından parçalanan elastini parçalayan 33 kDa'lık bir çinko metalloproteinazdır. LasB elastazın proteolitik gücü oldukça yüksektir (Galloway 1991).

Ekstrasellüler tip 2 salgılama sistemi tarafından salgılanan elastaz, enfeksiyonun başlangıç evresinde akciğerde zarara sebep olarak, kompleman bileşenlerini ve serum α1-proteinaz inhibitörünü parçalara bölerek patogenezde önemli rol oynamaktadır (Hong and Ghebrehiwet 1992). Damar duvar yapısında fazla miktarda elastin varolduğunda elastinin bölünmesinde kanamalara neden olur. IgG, fibrin, kollajen, sürfaktan proteinleri A ve D'yi parçalar. Ayrıca solunum yolu epitelindeki sıkı bağlantıları kırarak epitel geçirgenliğini arttırır ve enfeksiyon bölgesindeki nötrofil sayısının artmasına neden olur. Elastaz IL-8 üretimini uyararak proinflamatuar bir etkiye sahiptir (Calfee *et al.* 2001, Pesci *et al.* 1999).

2.7.1.3 Fosfolipaz C

Hemolitik aktiviteleri ile ayırt edilen iki tip fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolin ve sfingomiyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C, fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder (Zückert *et al.* 1998). Fosfolipaz C, tip 2 salgılama sistemi ile hücre dışına salınır. Ökaryotik hücre zarının bileşenleri olan fosfolipidleri hedef alarak akut akciğer hasarının patogenezinde rol oynar. Elastazda olduğu gibi, patojenik etkisinin bir kısmını sürfaktan inaktivasyonuna borçlu olmaktadır. Ayrıca konağın nötrofil oksidatif yanıtını da baskılamaktadır (Stonehouse *et al.* 2002).

2.7.1.3 Ramnolipidler

Hemolitik etkiye sahip hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etkisi vardır (Hauser and Karnocsky 1957, Liu 1974). Deterjan benzeri etkisi ile akciğer yüzey aktif madde fosfolipitlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin hareket etmesine yardımcı olur. Aynı zamanda mukosiliyer taşıma ve kirpik fonksiyonlarını da inhibe etmektedir (Köhler *et al.* 2000, Davey *et al.* 2003).

2.7.1.4 Piyosiyanin

*P. aeruginosa'*nın mavi pigment metabolitidir. phzABCDEFG operonu ve phzH, phzM, phzS genleri, öncü molekülü olan korismik asitten son formu olan üç halkalı piyosiyaninin sentezlenmesinde rol oynar (Lau *et al.* 2004a, 2004b). *P. aeruginosa* enfeksiyonları hastalık oluşturan birçok faktör içeren çok faktörlü süreçlerdir, in vitro hücre kültür çalışmaları ve akciğer enfeksiyonları tek başına piyosiyanin etkilerini belirlemek için saflaştırılmış piyosiyanin ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda piyosiyaninin hücre solunumunu engellediği, siliyer fonksiyonlarını bozduğu, epidermis proliferasyonunu durdurduğu, prostasiklin salınımına neden olduğu ve kalsiyum homeostazını koruduğu bulunmuştur. Piyosiyanin ayrıca a1-proteaz inhibitörünü deaktive ederek, proteaz-antiproteaz dengesini bozmakta ve akciğerlere zarar vermektedir (Nikaido 1994, O'Malley *et al.* 2004).

2.7.1.5 Pyoverdin

Bu bir siderofordur. Ortamdaki demiri bağlayarak *P. aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlamaktadır. Ekzotoksin A üretimini düzenleyerek virulansta rol oyna maktadır (Kipnis *et al.* 2006, Lamont *et al.* 2002, Meyer *et al.* 1996, Takase *et al.* 2000).

2.7.1.6 Alkali proteaz

*P. aeruginosa'*nın fibrinoliz etkin bir metalloproteazıdır. 49-kDa enzimi apr geni tarafından kodlanmakta ve enzim en iyi alkalin pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarının erken döneminde alveollerde oluşan yoğun fibrinin alkalin proteaz ile çözülmesinin enfeksiyonun ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir. Alkalin proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte kornea enfeksiyonlarının patogenezinde önemli bir rolü olduğu gösterilmektedir (Guzzo *et al.* 1991).

2.7.1.7 Proteaz IV

Yakın zamana kadar genellikle *P. aeruginosa* keratitinin patogenezindeki rolü ile bilinirken, son zamanlarda yapılan çalışmalar proteaz IV'ün sürfaktan olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, A, D ve B proteinlerini yok ettiği ve akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde rol oynadığı belirtilmiştir (Malloy *et al.* 2005).

2.7.2 Çekirdek algılama ile ilişkili olmayan virülans faktörleri

2.7.2.1 Tip III salgı sistemi (T3SS)

TIIISS (T3SS) salgı sistemi patogenezde en iyi çalışılan sistemdir ve bu konuda çok sayıda makale bulunmaktadır. Bazı uç örnekler dışında, bitki patojeni Gr(-) bakterileri konakçılarını TIIISS ile enfekte eder. Sistem sadece virülans faktörleri için değil, aynı zamanda bitki ve kommensalist mikroorganizmalar için de kullanılmaktadır. Sistemin en önemli özelliği bakteriyel Tip III efektörlerini (T3E'ler) doğrudan konakçı hücreye enjekte etmeleridir (Berthelot *et al.* 2003, Dacheux *et al.* 1999, Shen *et al.* 2006, Dacheux *et al.* 2001, Holder *et al.* 2001). TIIISS'nin anatomik yapısı (şekli) ve konak hücre ile temas ederek proteini taşıma şekli nedeniyle Tip III salgılama sistemine “injectisome” veya “moleküler iğne” de denir. Karmaşık bir supramoleküler yapıya sahip olan Tip III salgılama sistemi, konak hücrenin iç zarını, periplazmik boşluğu, dış zarı, hücre dışı

boşluğu ve hücre zarını geçerek tek adımda (5 adımda) konak hedefine ulaşır. Tip IIISS'nin yapısal ve evrimsel olarak bakteriyel flagella sistemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Tip III salgı sistemi olmadan, fitopatojenik bakteriler bitkinin bazal savunmasını ve büyümesini, konakçı hastalık oluşumunu veya konakçı olmayanlarda aşırı duyarlı (aşırı duyarlılık) reaksiyon tepkisini ortaya koymamaktadır. Bilindiği gibi fitopatojenik bakteriler, patojenezde önemli rolleri olan virülans efektör proteinleri konakçı bitkinin hücre sitoplazmasına Tip IIISS yardımıyla ulaştırmaktadır. Bu nedenle, Fitopatojenik bakterilerden yüzlerce Tip III efektör (T3E) protein tanımlanmıştır (Epelman *et al.* 2004, Lee *et al.* 2005).

2.7.2.2 Çözünür lektinler

Hücre zarlarına bağlanan bir protein türü olan lektin, tüm yaşam formlarında ve tükettiğimiz besinlerde bulunur. Aynı şekilde, lektinler şekere bağlanabilir. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı besinlerde bulunan lektin, tüketilen besinlerin sadece %30'unda bulunur. Lektinler sindirilemedikleri için bağırsaklarda değişmeden hareket ederler. Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve hücrelerin büyümesi gibi birçok farklı alanda önemli bir yere sahip olan hayvan lektinlerinin yanı sıra, kanser tedavisinde bitki lektinleri kullanılmaktadır.

En yüksek lektin içeriği baklagiller, tahıllar üzümü gibi sağlıklı gıdalarda bulunur. Lektinlerin bir kısmı türlerine göre reaksiyonlara neden olurken, bir kısmı da sağlığımız için faydalıdır, bu nedenle besinleri bilinçli tüketmemiz gerekmektedir (Chemani *et al.* 2009). Yiyecekleri suda bekletmek, suda çözünür oldukları için lektinlerin çoğunu yok edebilir. Lektin içeren gıdalar doğru pişirildiğinde sorun yaratmaz. Özellikle gıda hassasiyeti, gıda alerjisi veya mide-bağırsak rahatsızlıklarına sahip bireylerde, lektin içeren gıdalardan uzak durulması gerektiği önerilmektedir.

Protein kaynağı olan soya, kaliteli ve bitkisel kaynaklı proteinler arasındadır. Bu, bitkisel protein tüketmeyi tercih eden vejetaryenler için büyük önem taşımaktadır. Kolesterolü düşürmeye yardımcı olan soya, kanseri önlemede de etkili bir besindir. Araştırmalar, soya fasulyesinin hem fermantasyonu hem de filizlenen lektinleri azaltmak için kanıtlanmış

bir yöntem olduğunu göstermiştir. Glisemik indeksi düşük olan barbunya, bilinen bir karbonhidrat kaynağıdır. Bitki bazlı proteinlerin zengin kaynaklarından biri olan barbunya, kan şekerinde de kademeli bir artışa neden olur. Bağırsak sağlığına faydaları olan barbunya fasulyesi ise; demir, potasyum, folat ve K1 vitamini açısından da zengindir. Glisemik indeksi düşük olan buğday, kan şekerinin yükselmesine neden olabilir. Ortalama bir temel gıda olan buğday, tüm besin maddelerinden arındırılmıştır. Bağırsak sağlığına faydalı olan buğday, zengin lif içeriği ile oldukça sağlıklı bir besindir. Selenyum, bakır ve folat gibi birçok vitamin ve mineralin güçlü bir kaynağı olan buğdayın lektin içeriği, pişirme ve işleme sırasında neredeyse tamamen ortadan kalkar (Adam *et al.* 1997).

2.8 Kronik Enfeksiyonda Etkili Virülans Faktörleri

Normalde bu bakterilerin çoğu sahip olduğumuz konak savunma mekanizmaları nedeniyle zararsızdır. Duyarlı hastalarda bu konak savunması zayıflar ve floradaki bakteriler içeri girdiğinde sıklıkla fırsatçı bulaşıcı hastalıklara neden olurlar. Normal florada bulunan bazı yaygın bakteriler; *Staphylococcus aureus* (ciltte bulunur), *S. epidermidis, Propionibacterium acnes* ve bağırsaklarda *Bacteroides* ve *Enterobacteriaceae* çok az sayıda bulunur (Pierre *et al.* 2008).

2.8.1 Aljinatlar ve biyofilm oluşumu

P. aeruginosa, Aljinat biyofilm oluşumunda primer rol oynar. Biyofilm, kendisini oluşturan mikroorganizmanın içine gömülü, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye veya birbirine yapışmasını sağlayan hücre dışı polimerik maddeden oluşan bir matristir. *P. aeruginosa* abiyotik yüzeylerde ve önemli olarak kistik fibrozlu hastaların akciğerleri için biyofilm oluşturur. Biyofilmdeki bakteriler hem fenotipik hem de metabolik değişikliklere uğradığından antibiyotiklere dirençli hale gelirler ve konak savunmasından korunabilirler (Friedman and Kolter 2004, Jackson *et al.* 2004, Matsukawa and Greenberg 2004, Vasseur *et al.* 2005).

Mantarlarda gösterilen "Çorap Algılama (QS) Yöntemlerde" (çoğunluk algılama yöntemi) tarafından üretilen türlü sinyal moleküllerinin rol aldığı ileri sürülmektedir. Mikroorganizmalar, üretilen moleküllerin çokluğunu ölçerek etraftaki mikroorganizma miktarını belirler ve fazla geni düzenleyerek uyaranlara yanıt verir (Cobb *et al.* 2004, Hentzer *et al.* 2001, O'Toole and Kolter 1998).

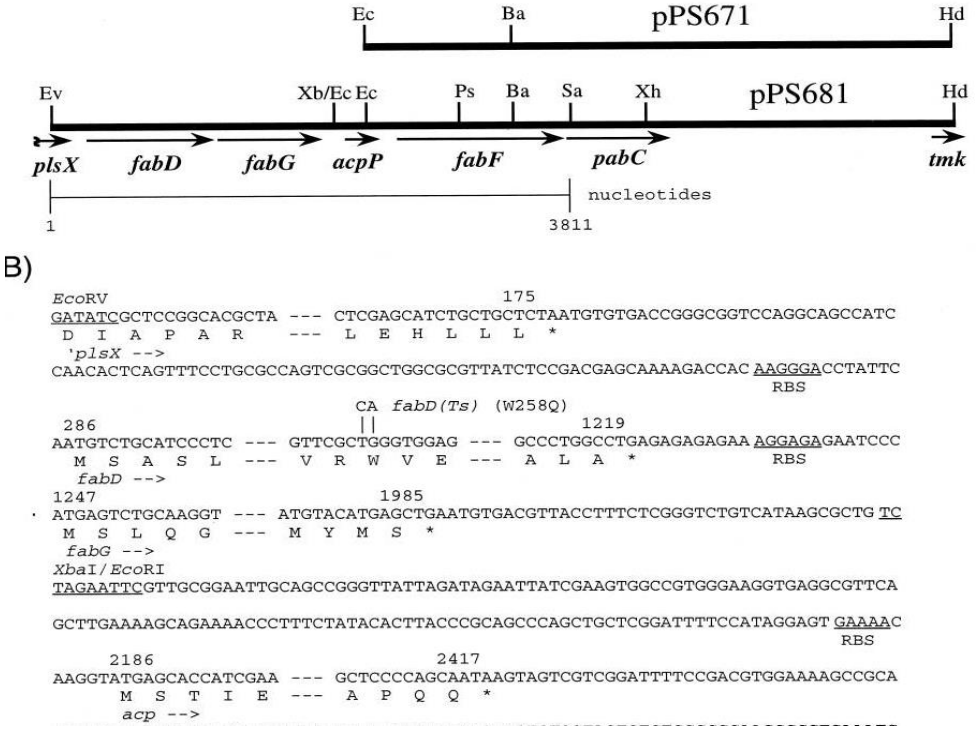
Gram pozitif bakterilerde, sistemin alarm molekülleri küçük peptitlerdir, gram negatif bakterilerde ise "oto-indükleyici" olarak adlandırılır. Bu otostimülatörler acil homoserin lakton (AHL) ve LuxI tipi ve LuxR tipi otostimülatör sentazdır. Hücre çokluğunun düşük olduğu durumlarda, oto-uyarıcı bazal düzeyde sentezlenmekte ve ortama girdikçe yoğunluğu azalmaktadır (Toutain *et al.* 2004).

P. aeruginosa'da tanımlanmış iki QS sistemi olmaktadır. Las ve rhl sistemleri ile ilişkili olan bu sistemler birbirleri ile ilişkilidir. Las sistemi, lasB geninin ekspresyonunu düzenleme yapar ve hücre dışı virülans faktörleri LasA elastaz ve eksotoksin A'nın sentezi için gerekli olmaktadır (Wingender *et al.* 1999, Stapper *et al.* 2004). Rhl QS sistemi ise, ramnolipid sentezini (Mattick 2002, Sharma and Anand 2002) ve flagellum'u (O'Toole and Kolter 1998, Rashid and Kornberg 2000) kontrol eder.

2.9 Çalışmamızda Kullanılan Gen Bölgeleri

2.9.1 fabD gen bölgesi

Şekil 2.1'de *P. Aeruginosa'*nın acpP bölgesi (A) Fab gen kümesi ve yan genler içeren plazmit haritalarını göstermektedir. Ökaryotlarda, yağ asidi biyosentezi, tip I sistem olarak bilinen tek bir gen tarafından kodlanan bir multienzim kompleksi tarafından katalize edilir. Buna karşılık, öbakteriler, reaksiyonların çoklu genler tarafından kodlanan proteinler tarafından gerçekleştirildiği bir tip II veya ayrışmış Fab (yağ asidi biyosentezi) sistemi içerir. Bakteriyel yağ asidi biyosentezi, asetil-CoA karboksilazın etkisiyle asetil-CoA'dan türetilen üç karbonlu bir öncü olan malonil-koenzim A'yı (CoA) gerektirir. Malonil-CoA, malonil-CoA: ACP açiltransferaz (FabD) tarafından açil taşıyıcı proteine (ACP) aktarılır.



Şekil 2.1 *P. aeruginosa* acpP bölgesi (A) Fab gen kümesi ve yan genler içeren plazmit haritaları (Kutchma et al. 1999)

Yağ asidi uzaması dört reaksiyonu içerir: (i) üç β-ketoasil-ACP sentaz, FabB, FabF veya FabH tarafından katalize edilen bir yoğunlaştırma reaksiyonu; (ii) NADPH'ye bağlı bir p-ketoasil-ACP redüktaz (FabG) içeren bir indirgeme; (iii) her ikisi de geniş, örtüşen zincir uzunluğu özgüllüklerine sahip β-hidroksiasil-ACP dehidratazlar olan FabA veya FabZ tarafından katalize edilen bir dehidrasyon reaksiyonu; (iv) NADH'ye bağlı enoil-ACP redüktaz (FabI) tarafından katalize edilen ikinci bir indirgeme reaksiyonu (Allemann *et al.* 2021).

2.9.2 nadB gen bölgesi

NAD'ın metabolizma için merkezi önemine rağmen, biyokimyası ve de novo oluşumunun düzenlenmesi hala tam olarak açıklanamamıştır. Bugüne kadar incelenen tüm bilinen organizmalarda, NAD molekülünün piridin halkası, kinolinat (piridin-2,3-dikarboksilat) aracılığıyla sentezlenir. Kinolinat oluşumu organizmaya bağlı olarak dört farklı şekilde gerçekleşir. Kinolinat sentetaz kompleksi, nadA ve nadB genlerinin gen ürünleri olan iki enzim kinolinat sentetaz A ve B'den oluşur. Kinolinat sentetaz B, FAD'ye bağımlı L-

aspartat oksidaz olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Kinolinat sentetazın etkisi altında dihidroksiaseton fosfat ile kinolinata yoğunlaştırılan L-aspartatın iminoaspartata oksidasyonunu katalize etmektedir (Kotecka *et al.* 2021).

3. MATERYAL VE METOT

Irak / Al-Anbar Eyaleti, Ramadi şehrinde bulunan Ramadi Hastanesi'nde deneysel ve uygulamalı çalışmalar yapılmıştır (Ek 2: Onay belge no 3050).

3.1 Hasta Seçimi

Ramadi Genel Hastanesi'nde yara ve yanık yeri enfeksiyonu olan hastalardan (her biri 100 kişi) 200 sürüntü örneği alındı. Örnekler steril transport besiyeri ile transfer edildi ve bakteri izolasyonuna kadar 4 ºC'de saklandı. Ramadi Devlet Hastanesi'nde enfeksiyon hastalıkları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, göğüs hastalıkları ve dahiliye servislerinde yatarak tedavi gören hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan imzalı onamlarını belirten belgeler alındı. Onam formları ile hastane etik komisyonuna başvuruldu ve çalışma onayı alındı. Her hasta yazılı ve sözlü olarak bilgilendirildi.

Çalışma sırasında COVID-19 salgını nedeniyle çeşitli kısıtlamalar ve zorluklarla karşılaşılsa da gerekli önlemler alınarak çalışmaya devam edildi. Hasta seçiminde çeşitli hususlar dikkate alındı. İlk olarak tüm hastalar 18 yaşın üzerindedir. İkinci olarak hastaların çalışmayı etkileyebilecek başka bir hastalığının olmaması dikkate alınmıştır (Sorumlu hekimin teşhisi ve onayı için yardım alınmıştır). Üçüncü olarak hastanede tedavi gören hastalardır. Son olarak hastaların çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir.

Alınan örneklerin cinsiyete göre dağılımı dikkate alınarak 100 hastadan (50 erkek ve 50 kadın hasta) yara enfeksiyonu örneği, 100 hastadan (50 erkek ve 50 kadın) yanık enfeksiyon örneği alındı. Ayrıntılı bilgiler Ek 1'de gösterilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması

P. aeruginosa, beyin kalp infüzyonu (BHI) ortamı kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra zenginleştirme kültürü kullanılarak 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Daha sonra, krom agar üzerine ekim yapılmıştır. 1 gece inkübasyondan sonra saf izolasyonlar seçilmiştir. Çizelge 3.1'de kullanılan kimyasal maddeler ve araçları; Çizelge 3.2'de ise antibiyotikler göstermektedir. Ayrıca, uluslararası antibiyotiklerin EUCAST sınır değerleri Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler ve araçlar

Kullanılan kimyasallar ve aletler	**Şirket/Marka**	**Kullanılan kimyasallar ve aletler**	**Şirket/Marka**
Primerler	Biyoneer Şirketi	DNA'nın RNA'sının serbest suyu	Boom
Netampon 4	New England Biyolab	Sıcak Yıldız Taq DNA polimeraz	Qiagen
Pcr tamponu, 10x	Qiagen	Proteinaz k	Fermenteler
Dntp Karışımı	Fermenteler	100 bp merdiven	Fermenteler
Agaroz	Prona	Üçlü	Merck
Etidyum bromür	Sigma	Edta	Sigma
6X yükleme çözümü	Fermenteler	Jel görüntüleme cihazı	Singen
Saf etanol	Sigma	Termal döngü pcr cihazı	Bioneer, kore
Mutlak etanol (%99)	Scharlau	Soğutmalı santrifüj	Hettich
Asetik asit	BDH-İngiltere	Exispin girdap santrifüjü	Bioneer, Kore
Alkol	BDH-İngiltere	Triptik Soya Agar	Merck
KH2PO4 Potasyum dihidrojen fosfat	CDH – İngiltere	Accupower® PCR premix kiti	Bioneer, Kore
Koh	Bdh-ingiltere	Otoklav	Çekirdek
Mcfarland çözümü	Biomerieux	Su banyosu	Çekirdek
Metanol	BDH-İngiltere	Ph ölçer	Mettler Toledo
Metil kırmızısı	Bdh-ingiltere	Yatay elektroforez cihazı	Bilim-plas
Na2Hpo4.2H2O	BDH-İngiltere	Güç kaynağı	Biyo-rad
Nacl	BDH-İngiltere	Eppendorf tüpleri (1,5 mL ve 0,2 mL)	Axygen Orijinal
Naoh	BDH-İngiltere	Otomatik mikro pipetler	Rainen
Potasyum iyodür	GCC İngiltere	Pipet uçları (100 µL, 1000 µL, 5 mL, 10 mL)	Fin ucu
Resazurin (Alamer mavisi)	BDH-İngiltere		

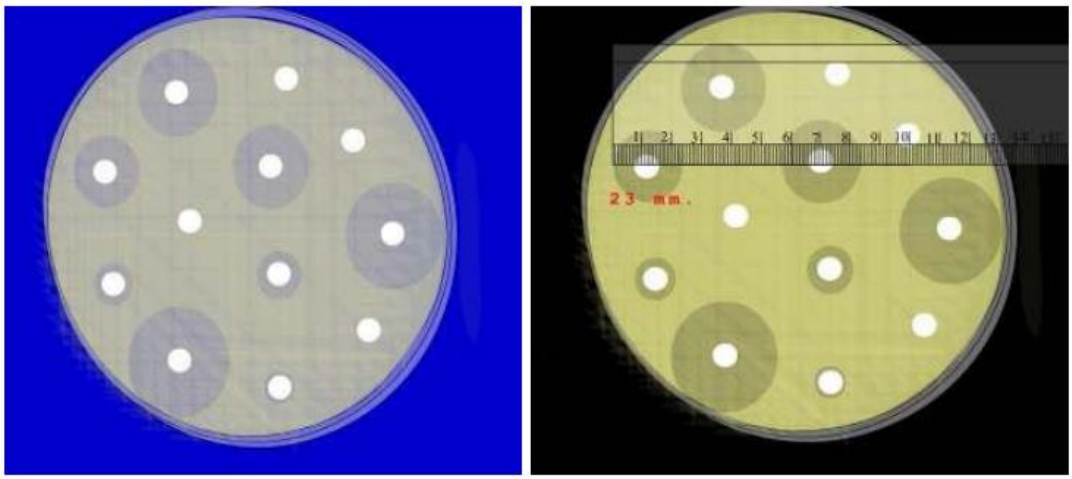
Çizelge 3.2 Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler	**Uluslararası kısa antibiyotik kodlaması**	**Disk (mg/tablet)**
Ampisilin	NS	10
Amoksisilin/Klavulanik asit	AMC	30
Aztreonam	ATM	30
Karbensilin	PY	100
Seftazidim	CAZ	30
Seftriakson	CRO	10
Siprofloksasin	CIP	10
İmipenem	IPE	10
Sefapim	FEP	30
Sefotaksim	CTX	10
Norfloksasin	NOR	10
Piperasilin	PRL	100
Sefaleksin	CL	30
Antibiyotik	CN	10
Kanamisin	K	30
Ofloksasin	OFX	5
Meropenem	MEM	10
Tobramisin	TOB	10
Kolistin	BT	10

Çizelge 3.3 Uluslararası antibiyotikler EUCAST sınır değerleri

No	Antibiyotik adı	Disc code	Dayanıklı (R) ≤ mm	Ben mm	Duyarlı (S) ≥mm
1	Amoksisilin (diğer)	AMC	<13	14-17	>18
2	Amoksisilin (Staph)	AMC	19		20
3	Amipisilin (diğer)	AM	11	12-13	14
4	Amipisilin(Staph)	AM	28		29
5	Basitrasin	B	8	9-11	13
6	Karbenisilin(diğer)	CB	17	18-22	23
7	Karbenisilin(Pseudomnas)	CB	13	14-16	17
8	Sefoksitin	FOX	14	15-17	18
9	Sefalotin	CF	14	15-17	18
10	Kloramfenikol	C	12	13-17	18
11	Siprofloksasin	CİP-5	15	16-20	21
12	Klindamisin	CC-2	14	15-20	21
13	Eritromisin	E	13	14-22	23
14	Antibiyotik	GM	12	13-14	15
15	Kanamisin	K-30	13	14-17	18
16	Metisilin (Staph)	M (or DP)	9	10-13	14
17	Oksasilin (Staph)	OX	10	11-12	13
18	Penisilin G(Enteroococcus)	P	14		15
19	Penisilin G (Staph)	P	28		29
20	Streptomisin	S-10	14	15-20	21
21	Sülfametoksazol-trimetoprim	SXT	10	11-15	16
22	Tetrasiklin	TE-30	14	15-18	19
23	Tobramisin	NN-10	12	13-18	15
24	Vankomisin	Va-30	9	10-11	12

Şekil 3.1, milimetrik cetvel ile inhibisyon zonu çaplarının ölçümünü göstermektedir. Tablo, bölge çapının tanımına dayanmaktadır. Duyarlı (S): Enfeksiyonun önerilen miktarda o ilaçla başarılı şekilde tedavi edilebileceğini göstermektedir. Orta derecede duyarlı (Orta, I): Normalin üzerinde dozlar kullanıldığında ilacın klinik olarak etkin olacağını göstermektedir. Dayanıklı (Dirençli, R): Tedavide güvenilir bir faaliyet yoktur. Çizelge 3.4 çalışmada kullanılan besiyerleri göstermektedir.



Şekil 3.1 Milimetrik cetvel ile inhibisyon zonu çaplarının ölçümü

Çizelge 3.4 Çalışmamızda kullanılan kültür besiyerleri

Kültürel çevre	Şirket (köken)
Kanlı agar tabanı	Şirket (köken)
beyin-kalp infüzyonu	Mikro medya (AB)
MacConkey agarı	Mastdiagnostics (ABD)
Metil kırmızı-Vogesproskauer suyu (MRVP)	Mikro medya (AB)
Müller-Hinton agarı	Oksoid (İngiltere)
pepton suyu	Oksoid (İngiltere)
Simmon sitrat agar	Himedia (Hindistan)
Luria bertani suyu	Mikro medya (AB)
Triptikas soya suyu	Himedia (Hindistan)
Mueller-Hinton Et suyu (MHB)	Oksoid (İngiltere)
üre agar bazı	Oksoid (İngiltere)
(Üçlü Şeker- Demir agar) TSI	Himedia (Hindistan)
Pseudomonas agar tabanı	Himedia (Hindistan)

3.2.2 DNA hazırlama: izolasyon ve ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu:

Genomik DNA, üretici firma (Geneaid, Kore) talimatına bağlı olarak Mini Kit ekstraksiyonu ile saflaştırma yapılarak, yanık ve yara örneklerinden olmak üzere toplam12 bakteri izolatının kültüründen elde edilmiştir.

• DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce aktivasyon:

Kültür, 10 mL besleyici et suyu ortamına aşılanmış ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

• Hücre toplama-ön liziz:

1. Bir mL kültür bakteri hücresi (1.5 x 10^8 hücre/mL)) 1.5 mL Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

2. Daha sonra hücreleri peletlemek ve süpernatantı atmak için 13500 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir.

3. Tüplere 180 µL GT Buffer (lizis solüsyonu) eklenmiş ve hücre peleti kuvvetlice çalkalanarak veya pipetlenerek yeniden süspanse edilmiştir. Ardından soğutma inkübatöründe (24°C) 5 dakika inkübe edilmiştir.

• Hücreleri parçalama:

1. Numuneye 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve ardından 60˚C'de su banyosunda her 3 dakikada bir tüp ters çevrilerek 10-15 dk inkübe edilmiştir.

2. Numuneye 200 µL GB Buffer eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır.

3. Daha sonra numune lizatının berrak olduğundan emin olmak için 70°C'de su banyosunda en az 10 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında tüp her 3 dakikada bir alt üst edilmiştir.

• DNA bağlanması:

1. Berrak lizata 200 µL mutlak etanol eklenmiş ve 10 saniye santrifüj ile karıştırılmıştır. Bunun sonucunda çökelti oluşumuna bakılmıştır. Eğer çökelti görünmüyorsa, pipetleyerek ayırma işlemi yapılmıştır.

2. GD Kolonu (polipropilen tüp) 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

3. Karışımın tamamı (çökeltide dahil olmak üzere) GD sütununa aktarılmıştır.

4. Daha sonra 13500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Santrifüj edilen 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, GD sütunu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

• Yıkama:

1. 400 ul W1 Tamponu GD Sütununa eklenmiştir, ardından 30 saniye 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir.

2. Çökelti üstünde kalan kısım atılarak GD Sütunu 2 ml'lik toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir.

3. Daha sonra GD Sütununa 600 µL yıkama tamponu eklenerek 30 saniye süreyle 13500 rpm'de santrifüjlenmiştir.

4. Tekrar elde edilen çökelti üstü kısım atılarak GD Sütunu 2 ml'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

5. Kolon matrisini kurutmak için 13500 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

• DNA elüsyonu:

1. Kurutulmuş GD Sütunu, temiz bir 1.5 mL Eppendorff tüpüne aktarılmıştır.

2. Kolon matrisinin merkezine 100 µL önceden ısıtılmış Elüsyon Tamponu eklenmiştir.

3. Ardından, Elüsyon solüsyonunun matris tarafından emildiğinden emin olmak için en az 5 dakika bekletilmiştir.

4. En son işlem olarak saflaştırılmış DNA'yı ayrıştırmak için 13500 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Elde edilen materyal kullanıma kadar -20˚C'de temiz bir Eppendorff tüpünde saklanmıştır.

DNA konsantrasyonu ve saflığının tahmini:

Numunelerin DNA konsantrasyonu, 1 µL ekstrakte edilen DNA Nano damla Spektrofotometresi cihazına yerleştirilmiştir ve örneklerin ng/µL cinsinden konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra, 260/280 nm dalga boyunda absorbans oranı fark edilerek saflıkları belirlenmiştir.

3.2.3 PCR yöntemi ile virülans genlerinin belirlenmesi

PCR Metodu uygulamasında Yetkin vd. (2006) tarafından yapılan çalışma referans olarak alınmıştır. PCR reaksiyon karışımının içerikleri aşağıdaki gibidir:

- 0.5 µL of 10 mM dNTP
- 0.5 µL of 10 pmol primer.
- 1.5 µL 25 mM $MgCl_2$
- 0.2 µL 5 u / µL Taq DNA Polimeraz

Her biri ayrı ayrı büyütüldükten sonra,

Pozitif Kontrol Geni, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Schroeter) Miguladır.

Negatif Kontrol Geni, *E.coli* ATCC 25922 Miguladır.

Elektroforez görüntüleri için tüm PCR ürünleri Etil Bromür ile boyanarak, %1 Agaroz Jel kullanılmıştır. Çizelge 3.5'de *P. aeruginosa* elde etmek için kullanılan primerler ve sekans dizileri gösterilmektedir.

Çizelge 3.5 *P. aeruginosa* elde etmek için kullanılan primerler ve sekans dizileri

Primer	Sekans Dizileri	Amplikon Boyutu
nadB	F 5-AGAGCGAGGTCAGCAGAGTA-3 R 5-ATCCCGCTGACATCGATTC-3	527 bp
fabD	F 5-CGTTCGCACATTCACCACTC-3 R 5-ACCATGGAGTAGTGCAGCAC-3	302 bp

3.3 Kültür Ortamı Hazırlama

MacConkey agar, Beyin kalp infüzyonu, Muller hinton agar, Luria bertani suyu, Tripticas soya suyu, Pepton suyu, Muller hinton suyu, Kanlı agar, Simmon's sitrat agar slant, Üre agar bazı ve Üçlü Şekerli Demir (TSI) ortamları üretim yapan şirketlerin prosedürlerine uygun olarak hazırlanmıştır. Tüm ortamlar için, bileşenlerinin tamamen çözünmesi işlemi su banyosunda kaynatılması ile sağlanmıştır. Daha sonra, 121 ºC'de 15 pound/inch^2'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. En son olarak elde edilen ortam petri kaplarına dökülerek kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır.

3.3.1 Reaktifler ve çözelti hazırlama süreçleri

3.3.1.1 Katalaz reaktifi

Bakterilerin katalaz enzimini üretme yeteneğini test etmek için, stok solüsyonundan (%15), %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak hazırlanmıştır. Reaktif koyu renkli bir şişede saklanmıştır.

3.3.1.2 Oksidaz reaktifi

500 mg N, N, N, N-tetrametil-P-fenilen-diamin dihidroklorürün 50 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanarak oksidaz testinde kullanılmıştır.

3.3.1.3 Gram boyama

Tanımlamadaki en önemli adım, hücre morfolojisinin; hücrelerin şekli, boyutu, düzeni,tepkisi gibi özelliklerinin belirlenmesidir. Bunun için elde edilen tüm bakteri izolatları ışık mikroskobunda incelendikten sonra gram boyama ile aşağıdaki aşamaları takip ederek boyanmıştır. Kristal menekşe solüsyonu, lugo iyot çözeltisi, alkol aseton solüsyonu ve safran çözeltisi şeklindedir

3.3.1.4 Kovac reaktifi

İndol testi için, 10 g Para-dimetil-amino benzaldehit 150 mL izoamil alkol içinde 50 °C'de su banyosunda ısıtılarak eritilmiş ve yavaş yavaş 50 mL (1M) HCl eklenmiştir. Reaktif küçük miktarlarda hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

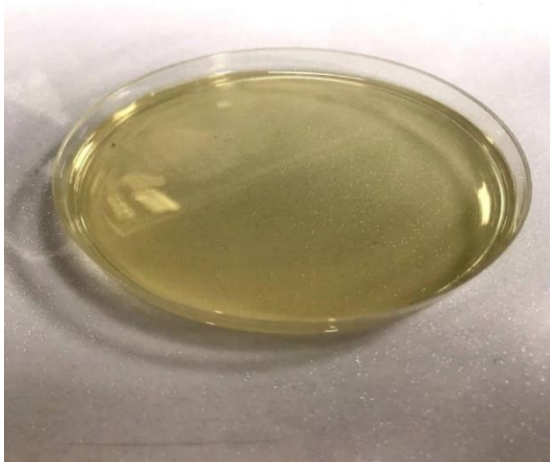
3.3.1.5 Voges-proskauer reaktifi

Bu reaktif, %96 etanol içinde %40 potasyum hidroksitin %5 a-naftol ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti kullanımdan önce koyu renkli şişede saklanıp ve karıştırılır.

3.3.2 Kullanılan agarlar

3.3.2.1 Besin Agarı

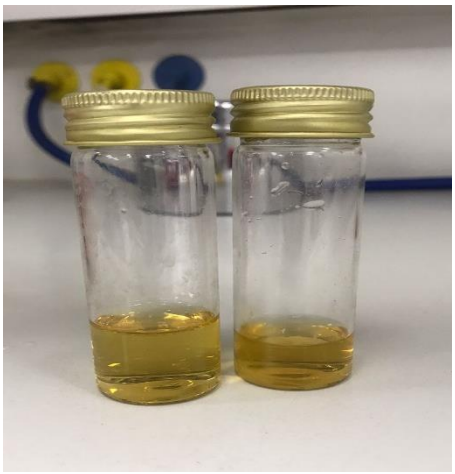
13,6 g et suyu besin maddesinin, 121 °C/15 pound basınçta çözülmesiyle hazırlanan ortam 45 °C'ye kadar soğutulmuş ve üreme için bakteri eklenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Besin agarı

3.3.2.2 Beyin kalp infüzyon suyu

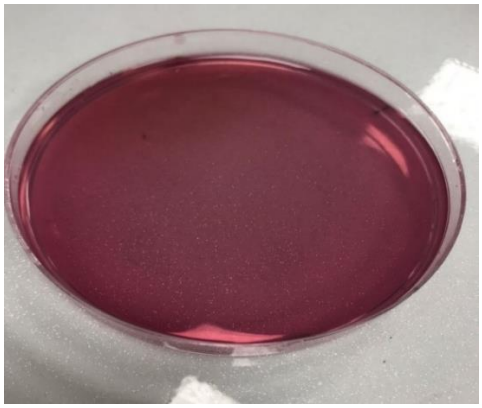
34,5 g besiyerinin, 1 L suda 121 °C'de ve 15 pound basınçta çözülerek basınç altında sterilize edilmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra soğumaya bırakılarak tüplere dökülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Beyin kalp infüzyon suyu

3.3.2.3 Macconkey agarı

51,53 g besiyeri, 1 L suda çözülerek pH 7,4'e ayarlanmıştır. 121 °C / 15 psi'de 15 dakika sterilize edilip 45 °C ortam sıcaklığına kadar soğutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Macconkey agar

3.3.2.4 *Pseudomonas* Agar

Pseudomonas türlerinin in vitro (canlı hücreler dışında) yapılan aynı ölçüde mikrobiyolojik analizlerinde piyosiyanin ve/veya pyorubin veya floresein oluşumuna göre izolasyonu ve sınıflandırılması için kullanılan seçici bir besiyeridir. BAM ve USP talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır.

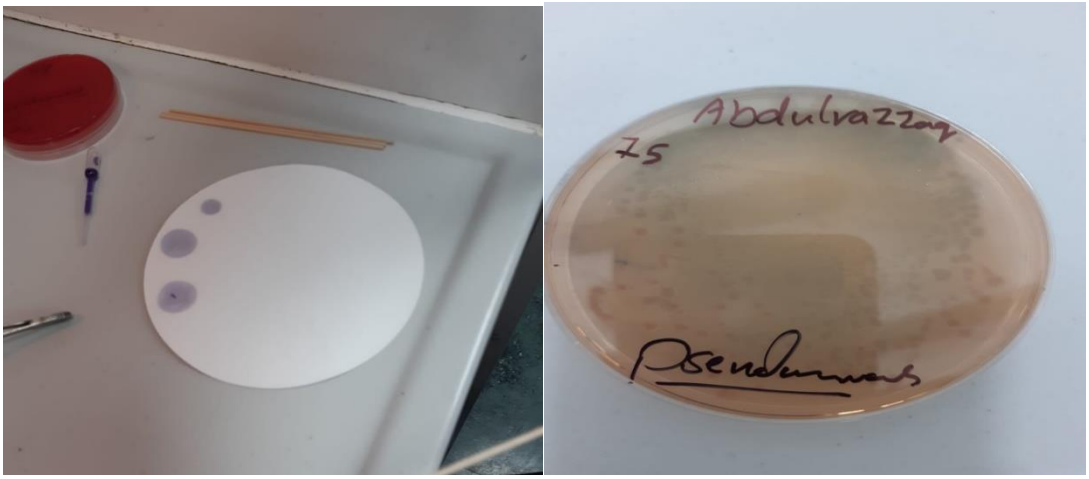
4. BULGULAR

4.1 Deney Sonuçları

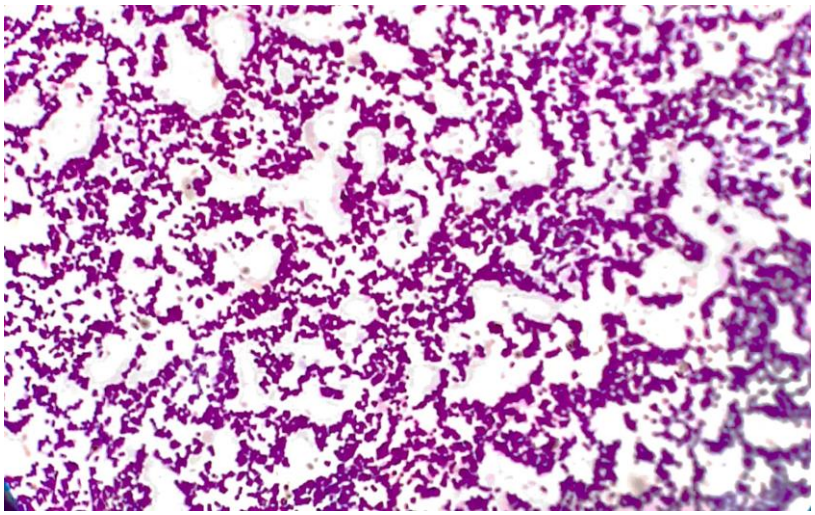
Bu çalışma sonucunda yaralardan izole edilen *P. aeruginosa* sayısının 52 olduğu görülmektedir. Bu da örneklerin %52'sine tekabül etmektedir. Yanıklardan izole edilen *P. aeruginosa'*nın ise 59 olduğu görülmektedir. Bu da örneklerin %59'una tekabül etmektedir (Çizelge 4.1). Ayrıca Macconkey agar ortamında *P. aeruginosa* ve oksidaz testi Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Şekil 4.2'de *P. Aeruginosa*'nın mikroskop görüntüsü bulunmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları ise Şekil 4.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Yara ve yanıklardan elde edilen *P. aeruginosa* izolatları

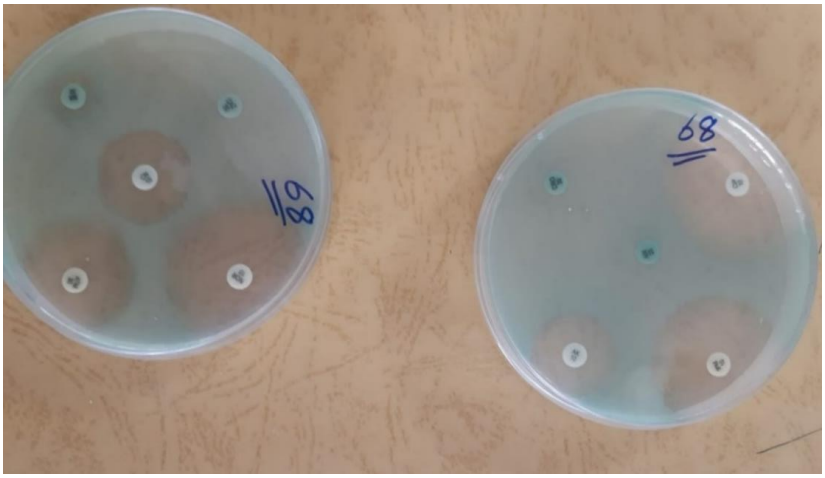
Örneklem	Toplam Örnek	Pozitif izole	%
Yara	100	52	52
Yanık	100	59	59



Şekil 4.1 Macconkey agarında *P. aeruginosa* ve oksidaz testi



Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'nın mikroskop görüntüsü x50



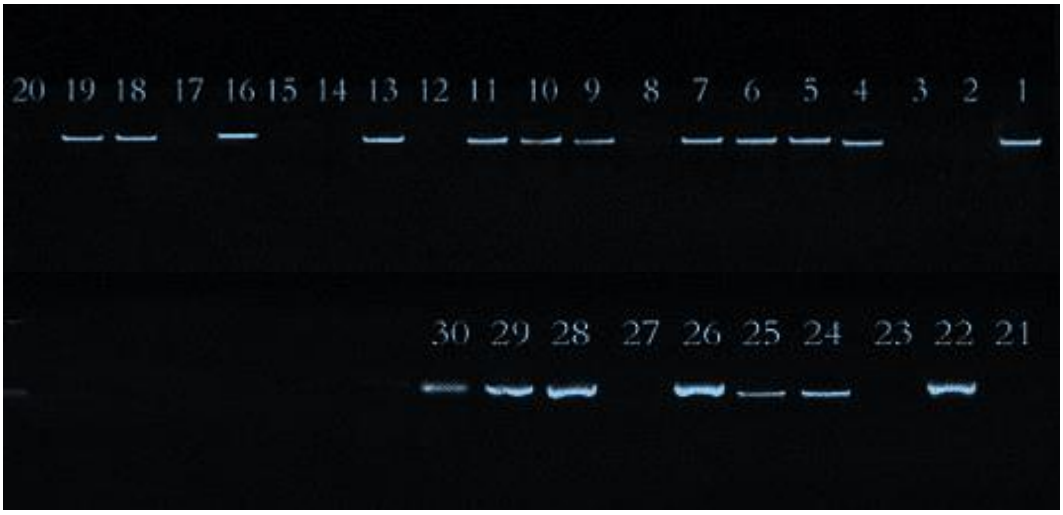
Şekil 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi

DNA'nın varlığını (30 örnek) tespit etmek ve doğrulamak için yapılan elektroforez sonucuna göre, PCR çalışması sonucunda yarada saptanan fabD geni 9 (%30) iken yanıkta 10 (%33) olarak saptanmıştır. NadB geni yarada 8 (%27) bulunurken yanıkta 10 (%34) bulunmuştur (Çizelge 4.2). Şekil 4.4'de *P.aeruginosa* izolatlarının fabD geninin tipik amplikonunu gösteren agaroz jel elektroforezi (%1.5) görüntüsü bulunmaktadır. Buna göre, DNA'nın amplifikasyonu, merdiven benzeri bir model olarak görünmektedir. Burada, Şerit (M) DNA işaretçisi (100 bp), Şerit 1,4, 5,6, 7, 9,10, 11,16,18,19, 22, 24, 25, 26, 28 ve 30) pozitif izolatları temsil eder. Şerit (2, 3, 8, 12, 14, 15, 17, 20, 21, 23, ve 27) negatif izolatları temsil eder.

Şekil 4.5. *P.aeruginosa* izolatlarının gen nadB ürününün tipik amplikonunu gösteren agaroz jel elektroforezi (%1.5). DNA'nın amplifikasyonu, merdiven benzeri bir model olarak görünür. Burada, Şerit (M) DNA işaretçisi (100 bp), Şerit (1, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27 ve 29) pozitif izolatları, Şerit (2, 3, 8, 9, 10, 13, 16, 17, 23, 24, 28, ve 30) ise negatif izolatları temsil etmektedir.

Çizelge 4.2 Yara ve yanık enfeksiyonlarından *P. aeruginosa'da* fabD ve nadB genlerinin tespiti

Virülans geni	***P. aeruginosa* yara enfeksiyonundan izole edilen toplam örnek yüzdesi**	***P. aeruginosa* yanık enfeksiyonundan izole edilen toplam örnek yüzdesi**
fabD	30	33
nadB	27	34



Şekil 4.4 *P. aeruginosa* izolatlarının fabD gen ürünü



Şekil 4.5 *P. aeruginosa* izolatlarının nadB gen ürünü

Bu çalışmada yarada saptanan fabD gen izolatları %30 ve yanık izolatları ise %33 olarak bulunmuştur. NadB geni, yara izolatlarının %27'sinde, yanık izolatlarının ise %34'ünde buunmaktadır. Elde edilen verileri değerlendirdiğimizde, fabD geni ve nadB geni virülans faktörü tarafından eksplante edilebilir olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, klinik vakalarda etkisinin nasıl olduğu konusunun ayrıntılı olarak belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada toplam 200 hasta üzerinde çalışılmıştır. Bu hastaların 100'ü yara, 100'ü yanık hastasıdır. Tüm örneklerin PCR çalışmaları yapılmıştır. Yanık hastalarından alaınan izolatlarda, fabD ve nadB virülans faktörleri daha yüksek belirlenmiştir. PCR, akıllı ilaçların moleküler hedeflerini bulmak için; genetik tanı, testleri ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanılmasıyla birlikte genetik biliminde önemli bir adım olarak kendini geliştirmektedir. Biyolojik bilimler, sıfırdan bir şey var etmek yerine, genellikle önceki keşiflerden yararlanmaktadır. Mendel'in kalıtımın temellerini, DNA'nın keşfine atfetmesi ile birçok hastalığın nedenlerinin anlaşılmasını sağlayan PCR gibi DNA dizileme tekniklerinin keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Prunier vd. (2007), yaptıkları çalışmada bazı bakirelerde 14 referans gen nadA ve nadB'nin karşılaştırılmasında, en az bir lokusun değiştiğini göstermiştir. Bu gözlemler, organizmaların karakteristik nikotinik asit oksotrofisini açıklayarak, bunlar için bu genlerin daha önce tanımlanmış antivirülans doğası ile tutarlı olduğunu ortaya koymuştur (Prunier *et al.* 2007).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), stabil bir referans gen tarafından normalleştirildiğinde mRNA seviyelerini ölçmek için güvenilir bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Varsayılan birçok referans gen, besin sınırlaması gibi fizyolojik streslerden etkilenmektedir. Bu nedenle normalizasyon için uygun olmayan durumlar meydana gelmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan 13 referans gen nadB ve fabD'nin ekspresyonu, karbon açlığı ve besin bolluğu koşulları altında ekspresyondaki değişiklikleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, çalışmamız sırasında nadB ve fabD'nin kararlı şekilde eksprese edilen tek temizlik geni olduğunu göstermektedir (Alqarni *et al.* 2016). Daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bazı çalışmalar incelenen izolatların %89'unda nadB ve fabD genlerinin bulunduğunu göstermektedir (Fadhil *et al.* 2016).

Genellikle *P. aeruginosa* tarafından doku istilası, proteazlar ve fabD uzlaşma faktörlerinin üretimi ile desteklenmektedir, bu nedenle bu gen, *P. aeruginosa*'nın virülansında kritik bir rol oynamaktadır (Yu *et al.* 2014). Buna karşılık, bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçların aksine, Fazeli ve Momtaz (2014) ve Garallah

(2015), *P. aeruginosa* izolatlarının sırasıyla %17.6 ve %30.76'sının proteaz fabD barındırdığını belirtmişlerdir.

Melican vd. (2011), bazı *P. aeruginosa* izolatlarının genetik olarak tespit edildiklerinde sorumlu genin varlığına rağmen bu özelliği tespit etmediğini veya direnç özelliği üretme kabiliyetine sahip olmadığını göstermiştir. Bunun nedeni, genin sonuçları bazı izolatların bu gene sahip olduğunu göstermesine rağmen, *P. aeruginosa*'nın fenotipik özelliklerinin sonuçlarının gösterdiği genetik bileşimdeki genetik çeşitliliktir. Bu muhtemelen iki ana nedenden kaynaklanmaktadır. Birincisi protein fenotipini bozan enzimi kodlayan genin etkisiz olması nedeniyle fenotipte proteoliz gösterilmemiştir. İkinci neden, bakterilerin biyosenteziyle ilgili olabilir. Bu özelliği dış etkiye ihtiyaç duymadan genetik olarak ifade edebilir ya da *P. aeruginosa*'nın başka genlere sahip olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca, direnç özelliği, yüksek seviyelerde Ekzotoksin A ve Ekzoenzim S'nin varlığına ek olarak iç vücut koşullarından etkilenir (Al-Mashhadani 2016).

Sonuç olarak, *P. aeruginosa'*nın moleküler tanımlaması için yalnızca tek bir gen hedefinin kullanılması, bu organizmanın biyokimyasal tanımlamasını zorlaştıran bir durum olarak değerlendirilir. PCR prosedürü, fabD genini amplifiye ederek *P. aeruginosa'*yı saptamak için geliştirilmiştir. *P. aeruginosa'*nın patojenitesi çok faktörlüdür ve *P. aeruginosa* izolatları genellikle nadB'nin varlığı ile bağlantılı sitotoksisite veya istila fenotiplerini ifade etmektedir. Çalışmamızda yara enfeksiyonlu *P. aeruginosa* izolatları ile yanık enfeksiyonlu *P. aeruginosa* izolatlarında nadB prevalansı arasında fark bulunmaktadır. Çalışmamızda, yara enfeksiyonlarından nadB geni sergileyen izolatların oranı daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında oranın daha düşük olduğu görülmektedir. Bu değerlerin farklı olması , değişik bölgelerden elde edilen klinik izolat sayılarındaki farklılıklardan veya farklı klinik ve fizyolojik koşullara sahip hastalardan elde edilen izolatlardan elde edilmesinden dolayı kaynaklandığını düşündürmektedir. Yanık enfeksiyonlarından izole edilenlerde bu faktörün düşük prevalansı, bu genin yanık enfeksiyonlarındaki rolünün yara enfeksiyonlarından daha az önemli olduğunu göstermektedir. Popülasyonlardaki virülans faktör genlerinin dağılımlarındaki farklılıklar, bazı *P. aeruginosa* suşlarının belirli enfeksiyon bölgelerinde bulunan spesifik koşullara daha iyi adapte olma olasılığını

güçlendirmektedir. Yapılan bir çalışmada, ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), transkripsiyonel varyasyonları araştırmak için altın standart olarak kabul edilen çok hassas ve yaygın bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. 29 aday arasından uygun referans genlerin (RG'ler) seçimi dört farklı yöntem (GeNorm, NormFinder, BestKeeper ve Delta-Ct yöntemi) kullanılarak yapılmıştır. Bu metodolojiler ile, farklı sıcaklıklar ve büyüme durumları altında, antimikrobiyal direnç veya virülans faktörleri gibi fizyolojik yönlerde yer alan iki akış pompası geninin önemli transkripsiyonel değişikliklerini belirlememize izin vermiştir. Daha genel olarak bu metodlar, transkripsiyonel varyasyonları incelemek için diğer bakterilerdeki uygun RG'leri belirlemek ve doğrulamak için de uygulanabilmektedir (Koch *et al. 2019*). Bu yöntemlerde, genlerin eş zamanlı kullanımının, *P. aeruginosa'*nın PCR ile daha güvenli bir şekilde saptanmasını sağladığı görülmektedir. Bu araştırmada elde edilen bazı virülans genleri ile enfeksiyon kaynağı arasında tespit edilen korelasyonlar, bu genlerin *P. aeruginosa'*nın neden olduğu farklı klinik enfeksiyözdeki gerçek rolünü bulmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ribotipleme, benzer virülans genlerine sahip suşların mutlaka benzer ribotip modellerine sahip olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, yüksek derecede virülans *P. aeruginosa* izolatlarının hastanelerde klonal yayılımı için klinik ortamlarda ek önlemler alınması gerektiğini ortaya koymuştur (Nikbin *et al.* 2012).

Elde edilen tüm bu bilgiler doğrultusunda, Genetik keşif, *Pseudomonas aeruginosa*'nın bazı izolatlarının proteaz genlerine (fabD ve nadB) sahip olduğunu göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*, güçlü direnç mekanizmalarının bir sonucu olarak birçok antibiyotiğe dirençli olmuştur ve örnekler izolasyon kaynaklarına göre dağıtıldığında yanık vakalarında bulunma yüzdesi yüksek olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuç olarak, bu bakterilere karşı direncin nedenlerini belirlemek için aynı bakterinin farklı genleri üzerinde ve antibiyotiğe dirençli patojenler için tedavi olarak uçucu yağlar ile antibiyotik kullanımı hakkında başka çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Al-Mashhadani, A. M. Y. 2016. Phenotypic and molecular variation in some virulence and characteristics features genes for clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Master Thesis. College of Science. 76 pages. University of Anbar.

Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. and Schumacher, U. 1997. Pseudomonas Aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. American journal of respiratory and critical care medicine, 155(6): 2102-2104.

Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I. and Prince, A. 2004. Pseudomonas Aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. American journal of respiratory cell and molecular biology, 30(5): 627-634.

Agodi, A., Barchitta, M., Cipresso, R., Giaquinta, L., Romeo, M. A. and Denaro, C. 2007. Pseudomonas Aeruginosa carriage, colonization, and infection in ICU patients. Intensive care medicine, 33(7): 1155-1161.

Allemann, M. N. and Allen, E. E. 2021. Genetic suppression of lethal mutations in fatty acid biosynthesis mediated by a secondary lipid synthase. Applied and Environmental Microbiology, 87(12): e00035-21.

Alqarni, B., Colley, B., Klebensberger, J., McDougald, D. and Rice, S. A. 2016. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of Pseudomonas aeruginosa. Journal of microbiological Methods, 127: 182-187.

Azerado, J., Sillankorva, S. and Pires, D. P. 2014. Pseudomonas bacteriophage isolation and production. In Pseudomonas Methods and Protocols, eds Filloux A., Ramos J.-L. Humana Press, pp. 23–32, New York.

Bals, R., Weiner, D. J. and Wilson, J. M. 1999. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. The Journal of clinical investigation, 103(3): 303-307.

Bardy, S. L., Ng, S. Y. and Jarrell, K. F. 2003. Prokaryotic motility structures. Microbiology, 149(2): 295-304.

Barret, J. P., Gescheider, G. A. and Herndon, D. N. 2003. Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. Plastic and reconstructive surgery, 111(2): 744-50.

Barrow, R. E., Spies, M., Barrow, L. N. and Herndon, D. N. 2004. Influence of demographics and inhalation injury on burn mortality in children. Burns, 30(1): 72-77.

Bell, C. E. and Eisenberg, D. 1996. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. Biochemistry, 35(4): 1137-1149.

Berthelot, P., Attree, I., Plésiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B. and Grattard, F. 2003. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas Aeruginosa bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. The Journal of infectious diseases, 188(4): 512-518.

Berthelot, P., Grattard, F., Mahul, P., Pain, P., Jospe, R., Venet, C. and Pozzetto, B. 2001. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to Pseudomonas Aeruginosa in mechanically ventilated patients. Intensive care medicine, 27(3): 503-512.

Bobadilla, J. L., Macek Jr, M., Fine, J. P. and Farrell, P. M. 2002. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. Human mutation, 19(6): 575-606.

Bonten, M. J., Bergmans, D. C., Speijer, H. and Stobberingh, E. E. 1999. Characteristics of polyclonal endemicity of Pseudomonas Aeruginosa colonization in intensive care units: implications for infection control. American journal of respiratory and critical care medicine, 160(4): 1212-1219.

Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P. and Prince, A. 1998. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased Pseudomonas Aeruginosa binding by epithelial cells. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 19(2): 269-277.

Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J. and Lau, G. W. 2009. Pseudomonas Aeruginosa exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. The American journal of pathology, 175(6): 2473-2488.

Calfee, M. W., Coleman, J. P. and Pesci, E. C. 2001. Interference with Pseudomonas quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by Pseudomonas Aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(20): 11633-

11637.

Chastre, J., Fagon, J. Y. and Moreira, D. C. 2002. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med, 165(7): 867-903.

Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B. P. and Faure, K. 2009. Role of LecA and LecB lectins in Pseudomonas Aeruginosa-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. Infection and immunity, 77(5): 2065-2075.

Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. and Greenberg, E. P. 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in Pseudomonas Aeruginosa. Proceedings of the national academy of sciences, 98(5): 2752-2757.

Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B. and Lindsay, R. 2006. Burn wound infections. Clinical microbiology reviews, 19(2): 403–434.

Cigana, C., Curcurù, L., Leone, M. R., Ieranò, T., Lorè, N. I., Bianconi, I. and Bragonzi, A. 2009. Pseudomonas Aeruginosa exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. PloS one, 4(12): e8439.

Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J. and López-Boado, Y. S. 2004. Pseudomonas Aeruginosa flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. The Journal of Immunology, 173(9): 5659-5670.

Cunha, T. M., Roman-Campos, D. and Lotufo, C. M. 2010. Morphine peripheral analgesia, depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. Proc Natl Acad Sci, 107(9): 4442–7.

Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. and Toussaint, B. 1999. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas Aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. Infection and immunity, 67(11): 6164-6167.

Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. and Attree, I. 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of Pseudomonas Aeruginosa-infected macrophages. Molecular microbiology, 40(1): 76-85.

Davey, M. E., Caiazza, N. C. and O'Toole, G. A. 2003. Rhamnolipid surfactant

production affects biofilm architecture in Pseudomonas Aeruginosa PAO1. Journal of bacteriology, 185(3): 1027-1036.

De Oliveira, R. F., Quackenbush, J. and Venter, J. C. 2018. Enhanced Reader. Nature, 388: 539–547.

Di Sant'Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A. and Shea, E. 1953. Pediatrics, 12: 549-555.

DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R. and Prince, A. 1995. Diverse Pseudomonas Aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. The Journal of clinical investigation, 96(5): 2204-2210.

Doggett, R., Harrison, G. M. and Carter, R. E. 1971. Mucoid Pseudomonas Aeruginosa in patients with chronic illnesses. The Lancet, 297(7692): 236-237.

Downes, F. P. and Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods Washington, American Public Health Association, p. 676. USA.

Döring, G., Bragonzi, A., Paroni, M., Aktürk, F. F., Cigana, C., Schmidt, A. and Ulrich, M. 2014. BIIL 284 reduces neutrophil numbers but increases P. Aeruginosa bacteremia and inflammation in mouse lungs. Journal of Cystic Fibrosis, 13(2): 156-163.

Edwards, J. R., Peterson, K. D. and Mu, Y. 2009. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: Data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. Am J Infect Control, 37: 783-805.

Epelman, S., Stack, D., Bell, C., Wong, E., Neely, G. G., Krutzik, S. and Mody, C. H. 2004. Different domains of Pseudomonas Aeruginosa exoenzyme S activate distinct TLRs. The Journal of Immunology, 173(3): 2031-2040.

Erbay, H., Yalcin, A. N., Serin, S., Turgut, H., Tomatir, E., Cetin, B. and Zencir, M. 2003. Nosocomial infections in intensive care unit in a Turkish university hospital: a 2-year survey. Intensive care medicine, 29(9): 1482-1488.

Fadhil, L., Al-Marzoqi, A. H., Al Taee, Z. M. and Shalan, A. A. 2016. Molecular and Phenotypic Study of Virulence Genes in a Pathogenic Strain of Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical origins by PCR: Profiles of genes and Toxins. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 7(1): 590-598.

Fazeli, N. and Momtaz, H. 2014. Virulence gene profiles of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian hospital infections. Iranian Red Crescent Medical Journal, 16(10): 45-52.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A. 1998. Role of flagella in pathogenesis ofpseudomonas Aeruginosa pulmonary infection. Infection and immunity, 66(1): 43-51.

Fitzgerald, D., Morris, R. E. and Saelinger, C. B. 1980. Receptor-mediated internalization of Pseudomonas toxin by mouse fibroblasts. Cell, 21(3): 867-873.

Foley, B. T., Moehring, J. M. and Moehring, T. J. 1995. Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and Pseudomonas exotoxin A: genetic and biochemical analyses. Journal of Biological Chemistry, 270(39): 23218-23225.

Frederiksen, B., Koch, C. and Høiby, N. 1997. Antibiotic treatment of initial colonization with Pseudomonas Aeruginosa postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatric pulmonology, 23(5): 330-335.

Freytes, D. O., Tullius, R. S. and Badylak, S. F. 2006. Effect of storage upon material properties of lyophilized porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 78(2): 327-333.

Friedman, L. and Kolter, R. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the Pseudomonas Aeruginosa biofilm matrix. Journal of bacteriology, 186(14): 4457-4465.

Galloway, D. R. 1991. Pseudomonas Aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments. Molecular microbiology, 5(10): 2315-2321.

Garallah, E. T. 2015. Molecular analysis of some virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis sources. Master thesis. College of Science. 65 pages. Al-Mustansiriyah University.

Gibson, R. L., Burns, J. L. and Ramsey, B. W. 2003. Pathophysiology and management

of pulmonary infections in cystic fibrosis. American journal of respiratory and critical care medicine, 168(8): 918-951.

Grimwood, K. 1992. The pathogenesis of Pseudomonas Aeruginosa lung infections in cystic fibrosis. Journal of paediatrics and child health, 28(1): 4-11.

Guentzel, M. N. 1996. Escherichia, klebsiella, enterobacter, serratia, citrobacter, and proteus. Medical Microbiology. 4th edition, University of Texas Medical Branch, Galveston.

Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A. and Murgier, M. 1991. Pseudomonas Aeruginosa alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. Journal of bacteriology, 173(17): 5290-5297.

Hahn, H. P. 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas Aeruginosa–a review. Gene, 192(1): 99-108.

Hancock, R. E., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P. and Pier, G. B. 1983. Pseudomonas Aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. Infection and immunity, 42(1): 170-177.

Hauser, G. and Karnovsky, M. L. 1957. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by Pseudomonas Aeruginosa. Journal of Biological Chemistry, 224(1): 91-105.

Häußler, S., Tümmler, B., Weißbrodt, H., Rohde, M. and Steinmetz, I. 2003. Small-colony variants of Pseudomonas Aeruginosa in cystic fibrosis. Clinical infectious diseases, 29(3): 621-625.

Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. and Wiedemann, B. 2007. Resistance mechanisms of multiresistant Pseudomonas Aeruginosa strains from Germany and correlation with hypermutation. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51(11): 4062-4070.

Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M. R. 2001. Alginate overproduction affects Pseudomonas Aeruginosa biofilm structure and function. Journal of bacteriology, 183(18): 5395-5401.

Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A. and Fridkin, S. K. 2008. NHSN annual update: antimicrobialresistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and

Prevention, 2006 2007. Infect Control Hosp Epidemiol, 29(11): 996–1011.

Hodson, M. E. 2000. Treatment of cystic fibrosis in the adult. Respiration, 67(6): 595-607.

Holder, I. A., Neely, A. N. and Frank, D. W. 2001. Type III secretion/intoxication system important in virulence of Pseudomonas Aeruginosa infections in burns. Burns, 27(2): 129-130.

Hong, Y. and Ghebrehiwet, B. 1992. Effect of Pseudomonas Aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. Clinical immunology and immunopathology, 62(2): 133-138.

Iglewski, B. H. and Sadoff, J. C. 1979. Toxin Inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of Pseudomonas Aeruginosa toxin A. Methods in enzymology, 60: 780-793.

Jackson, K. D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M. R. and Wozniak, D. J. 2004. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for Pseudomonas Aeruginosa PAO1 biofilm formation. Journal of bacteriology, 186(14): 4466-4475.

Key, T. R. 2000. Calculation of Background Radiation. The Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 40: 275–281.

Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 1994. Detection of Pseudomonas Aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60(10): 3739–3745.

Kim, J. M., Park, E. S., Jeong, J. S., Kim, K. M., Kim, J. M., Oh, H. S. and Pai, C. H. 1999. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. American journal of infection control, 28(6): 454-458.

Kipnis, E., Sawa, T. and Wiener-Kronish, J. 2006. Targeting mechanisms of Pseudomonas Aeruginosa pathogenesis. Medecine et maladies infectieuses, 36(2): 78-91.

Kobayashi, M., Yoshida, T., Takeuchi, D., Jones, V. C., Shigematsu, K., Herndon, D. N. and Suzuki, F. 2008. Gr-1+ CD11b+ cells as an accelerator of sepsis stemming from Pseudomonas Aeruginosa wound infection in thermally injured mice. Journal of leukocyte biology, 83(6): 1354-1362.

Koch, L., Poyot, T., Schnetterle, M., Guillier, S., Soulé, E., Nolent, F. and Biot, F. 2019.

Transcriptomic studies and assessment of Yersinia pestis reference genes in various conditions. Scientific Reports, 9(1): 1-11.

Kotecka, K., Kawalek, A., Kobylecki, K. and Bartosik, A. A. 2021. The MarR-type regulator PA3458 is involved in osmoadaptation control in Pseudomonas Aeruginosa. International Journal of Molecular Sciences, 22(8): 3982-88.

Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C. and Pechère, J. C. 2000. Swarming of Pseudomonas Aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. Journal of bacteriology, 182(21): 5990-5996.

Kropec, A., Huebner, J., Riffel, M., Bayer, U., Benzing, A., Geiger, K. and Daschner, F. D. 1993. Exogenous or endogenous reservoirs of nosocomial Pseudomonas Aeruginosa and Staphylococcus aureus infections in a surgical intensive care unit. Intensive care medicine, 19(3): 161-165.

Kurahashi, K., Kajikawa, O., Sawa, T., Ohara, M., Gropper, M. A., Frank, D. W. and Wiener-Kronish, J. P. 1999. Pathogenesis of septic shock in Pseudomonas Aeruginosa pneumonia. The Journal of clinical investigation, 104(6): 743-750.

Kutchma, A. J., Hoang, T. T. and Schweizer, H. P. 1999. Characterization of a Pseudomonas aeruginosa fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A: ACP transacylase (FabD). Journal of bacteriology, 181(17): 5498-5504.

LaBauve, A. E. and Wargo, M. J. 2012. Growth and laboratory maintenance of Pseudomonas Aeruginosa. Current protocols in microbiology, 6: e.1535445.

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonas Aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(10): 7072-7077.

Lang, A. B., Horn, M. P., Imboden, M. A. and Zuercher, A. W. 2004. Prophylaxis and therapy of Pseudomonas Aeruginosa infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. Vaccine, 22: 44-48.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. and Kong, F. 2004a. The role of pyocyanin in Pseudomonas Aeruginosa infection. Trends in molecular medicine, 10(12): 599-606.

Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. and Mavrodi, D. 2004b. Pseudomonas Aeruginosa pyocyanin is critical for lung infection in mice. Infection and immunity,

72(7): 4275-4278.

Lazdunski, A. 1998. Regulation of virulence factors in Pseudomonas Aeruginosa. Medecine Et Maladies Infectieuses, 28: 109-118.

Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. and Lazdunski, A. 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of Pseudomonas Aeruginosa LasR and RhlR. Molecular microbiology, 48(1): 199-210.

Lee, V. T., Smith, R. S., Tümmler, B. and Lory, S. 2005. Activities of Pseudomonas Aeruginosa effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. Infection and immunity, 73(3): 1695-1705.

Liu, P. V. 1974. Extracellular toxins of Pseudomonas Aeruginosa. Journal of Infectious Diseases, 130(Supplement): 94-99.

Lizioli, A., Privitera, G., Alliata, E., Banfi, E. A., Boselli, L., Panceri, M. L. and Carreri, V. 2003. Prevalence of nosocomial infections in Italy: result from the Lombardy survey in 2000. Journal of Hospital Infection, 54(2): 141-148.

Lynn, W. A. and Golenbock, D. T. 1992. Lipopolysaccharide antagonists. Immunology today, 13(7): 271-276.

MacLeod, D. L., Nelson, L. E., Shawar, R. M., Lin, B. B., Lockwood, L. G., Dirks, J. E. and Garber, R. L. 2000. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis Pseudomonas Aeruginosa isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. The Journal of infectious diseases, 181(3): 1180-1184.

Mall, M. A. 2008. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery, 21(1): 13-24.

Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J. and Wright, J. R. 2005. Pseudomonas Aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 288(2): 409-418.

Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzy, J. T., Davis, C. W. and Boucher, R. C. 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. Cell, 95(7):

1005-1015.

Matsukawa, M. and Greenberg, E. P. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence Pseudomonas Aeruginosa biofilm development. Journal of bacteriology, 186(14): 4449-4456.

Mattick, J. S. 2002. Type IV pili and twitching motility. Annual Reviews in Microbiology, 56(1): 289-314.

Mattmann, M. E., Geske, G. D., Worzalla, G. A., Chandler, J. R., Sappington, K. J., Greenberg, E. P. and Blackwell, H. E. 2008. Synthetic ligands that activate and inhibit a quorum-sensing regulator in Pseudomonas Aeruginosa. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 18(10): 3072-3075.

Melican, K., Sandoval, R. M., Kader, A., Josefsson, L., Tanner, G. A., Molitoris, B. A. and Richter-Dahlfors, A. 2011. Uropathogenic Escherichia coli P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. PLoS pathogens, 7(2): e1001298.

Mendelman, P. M., Smith, A. L., Levy, J., Weber, A., Ramsey, B. and Davis, R. L. 1985. Aminoglycoside penetration, inactivation, and efficacy in cystic fibrosis sputum. American Review of Respiratory Disease, 132(4): 761-765.

Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. and Holder, I. A. 1996. Pyoverdin is essential for virulence of Pseudomonas Aeruginosa. Infection and immunity, 64(2): 518-523.

Moradali, M. F., Ghods, S. and Rehm, B. H. 2017. Pseudomonas Aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in cellular and infection microbiology, 7: 39-45.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A. and Yolken, R. H. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed. Washington Dc: ASM Press.

Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science, 264(5157): 382-388.

Nikbin, V. S., Aslani, M. M., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F. and Ebrahimipour, G. H. 2012. Molecular identification and detection of virulence genes among Pseudomonas aeruginosa isolated from different infectious origins. Iranian Journal of Mcrobiology, 4(3): 118-125.

Nixon, G. M., Armstrong, D. S., Carzino, R., Carlin, J. B., Olinsky, A., Robertson, C. F.

and Grimwood, K. 2001. Clinical outcome after early Pseudomonas Aeruginosa infection in cystic fibrosis. The Journal of pediatrics, 138(5): 699-704.

Nseir, S., Di Pompeo, C., Pronnier, P., Beague, S., Onimus, T., Saulnier, F. and Durocher, A. 2002. Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. European Respiratory Journal, 20(6): 1483-1489.

Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. and Blázquez, J. 2000. High frequency of hypermutable Pseudomonas Aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. Science, 288(5469): 1251-1253.

O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M. and Britigan, B. E. 2004. Pseudomonas Aeruginosa pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 287(1): 94-103.

Ostroff, R. M., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology, 172(10): 5915-5923.

O'Toole, G. A. and Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas Aeruginosa biofilm development. Molecular microbiology, 30(2): 295-304.

Parsek, M. R. and Greenberg, E. P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(16): 8789-8793.

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. and Iglewski, B. H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas Aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(20): 11229-11234.

Pier, G. B. 2003. Promises and pitfalls of Pseudomonas Aeruginosa lipopolysaccharide as a vaccine antigen. Carbohydrate research, 338(23): 2549-2556.

Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J. L. and Husson, M. O. 2008. Kinetics of Pseudomonas Aeruginosa virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. Medecine et maladies infectieuses, 38(6): 318-323.

Pittet, D., Harbarth, S., Ruef, C., Francioli, P., Sudre, P., Petignat, C. and Widmer, A. 1999. Prevalence and risk factors for nosocomial infections in four university hospitals in Switzerland. Infection Control and Hospital Epidemiology, 20(1): 37-42.

Prunier, A. L., Schuch, R., Fernandez, R. E., Mumy, K. L., Kohler, H., McCormick, B. A. and Maurelli, A. T. 2007. nadA and nadB of Shigella flexneri 5a are antivirulence loci responsible for the synthesis of quinolinate, a small molecule inhibitor of Shigella pathogenicity. Microbiology, 153(7): 2363-2372.

Puchelle, E., Bajolet, O. and Abély, M. 2002. Airway mucus in cystic fibrosis. Paediatric respiratory reviews, 3(2): 115-119.

Rashid, M. H. and Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas Aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(9): 4885-4890.

Ratjen, F., Döring, G. and Nikolaizik, W. H. 2001. Effect of inhaled tobramycin on early Pseudomonas Aeruginosa colonisation in patients with cystic fibrosis. The Lancet, 358(9286): 983-984.

Rello, J., Ollendorf, D. A., Oster, G., Vera-Llonch, M., Bellm, L., Redman, R. and Kollef, M. H. 2002. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. Chest, 122(6): 2115-2121.

Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. and Lam, J. S. 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis inPseudomonas Aeruginosa. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(3): 523-553.

Safdar, N., Dezfulian, C., Collard, H. R. and Saint, S. 2005. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review. Critical care medicine, 33(10): 2184-2193.

Salunkhe, P., Smart, C. H., Morgan, J. A. W., Panagea, S., Walshaw, M. J., Hart, C. A. and Winstanley, C. 2005. A cystic fibrosis epidemic strain of Pseudomonas Aeruginosa displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. Journal of bacteriology, 187(14): 4908-4920.

Sharma, M. and Anand, S. K. 2002. Swarming: a coordinated bacterial activity. Current Science, 32: 707-715.

Shen, D. K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B. and Toussaint, B. 2006. PsrA is a positive

transcriptional regulator of the type III secretion system in Pseudomonas Aeruginosa. Infection and immunity, 74(2): 1121-1129.

Shime, N., Sawa, T., Fujimoto, J., Faure, K., Allmond, L. R., Karaca, T. and Wiener-Kronish, J. P. 2001. Therapeutic administration of anti-PcrV F (ab′) 2 in sepsis associated with Pseudomonas Aeruginosa. The Journal of Immunology, 167(10): 5880-5886.

Smith, D. J., Ramsay, K. A., Yerkovich, S. T., Reid, D. W., Wainwright, C. E., Grimwood, K. and Kidd, T. J. 2016. P seudomonas Aeruginosa antibiotic resistance in Australian cystic fibrosis centres. Respirology, 21(2): 329-337.

Smith, R. S. and Iglewski, B. H. 2003. P. Aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. Current opinion in microbiology, 6(1): 56-60.

Speert, D. P., Campbell, M. E., Henry, D. A., Milner, R., Taha, F., Gravelle, A. and Mahenthiralingam, E. 2002. Epidemiology of Pseudomonas Aeruginosa in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. American journal of respiratory and critical care medicine, 166(7): 988-993.

Stapper, A. P., Narasimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S. and Mathee, K. 2004. Alginate production affects Pseudomonas Aeruginosa biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. Journal of medical microbiology, 53(7): 679-690.

Starner, T. D. and McCray, P. B. 2005. Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. Annals of internal medicine, 143(11): 816-822.

Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C. and Vasil, M. L. 2002. A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. Molecular microbiology, 46(3): 661-676.

Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. and Otani, T. 2000. Impact of siderophore production onpseudomonas Aeruginosa infections in immunosuppressed Mice. Infection and immunity, 68(4): 1834-1839.

Toutain, C. M., Caiazza, N. C. and O'Toole, G. A. 2004. Molecular basis of biofilm development by pseudomonads. In Microbial biofilms, 43-63. American Society of Microbiology.

Valles, J., Mariscal, D., Cortés, P., Coll, P., Villagrá, A., Díaz, E. and Rello, J. 2004.

Patterns of colonization by Pseudomonas Aeruginosa in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Medicine, 30(9): 1768-1775.

Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. and Filloux, A. 2005. The pel genes of the Pseudomonas Aeruginosa PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. Microbiology, 151(3): 985-997.

Weber, D. J., Rutala, W. A., Sickbert-Bennett, E. E., Samsa, G. P., Brown, V. and Niederman, M. S. 2007. Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia. infection control and hospital epidemiology, 28(7): 825-831.

Weinstein, R. A. 1998. Nosocomial infection update. Emerging infectious diseases, 4(3): 416-22.

Weinstein, R. A., Gaynes, R., Edwards, J. R. and National Nosocomial Infections Surveillance System. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clinical infectious diseases, 41(6): 848-854.

Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G. and Iglewski, B. H. 1990. Structure, function, and regulation of Pseudomonas Aeruginosa exotoxin A. Annual review of microbiology, 44(1): 335-363.

Wingender, J., Neu, T. R. and Flemming, H. C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances?. In Microbial extracellular polymeric substances, pp. 1-19. Springer, Berlin, Heidelberg.

Wu, F. R., Jiang, L., He, X. L., Zhu, P. L. and Li, J. 2015. Effect of hesperidin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in HSC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 40(13): 2639-2943.

Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. M. and Frank, D. W. 1995. Transcriptional analysis of the Pseudomonas Aeruginosa exoenzyme S structural gene. Journal of Bacteriology, 177(5): 1169–1178.

Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C. and Durmaz, R. 2006. Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of Pseudomonas Aeruginosa infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. American Journal of Infection Control, 34(4): 188–192.

Yu, H., He, X., Xie, W., Xiong, J., Sheng, H., Guo, S. and Zhang, K. 2014. Elastase LasB of Pseudomonas aeruginosa promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. Canadian journal of microbiology, 60(4): 227-235.

Zückert, W. R., Marquis, H. and Goldfine, H. 1998. Modulation of Enzymatic Activity and Biological Function of Listeria monocytogenes Broad-Range Phospholipase C by Amino Acid Substitutions and by Replacement with theBacillus cereus Ortholog. Infection and immunity, 66(10): 4823-4831.

EKLER

EK 1. Hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri ve numune tipi

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Örneklem
1	75	Erkek	Yara Enfeksiyonu
2	43	Erkek	Yara Enfeksiyonu
3	19	Erkek	Yara Enfeksiyonu
4	65	Erkek	Yara Enfeksiyonu
5	43	Erkek	Yara Enfeksiyonu
6	44	Erkek	Yara Enfeksiyonu
7	25	Erkek	Yara Enfeksiyonu
8	71	Erkek	Yara Enfeksiyonu
9	65	Erkek	Yara Enfeksiyonu
10	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
11	94	Erkek	Yara Enfeksiyonu
12	33	Erkek	Yara Enfeksiyonu
13	46	Erkek	Yara Enfeksiyonu
14	73	Erkek	Yara Enfeksiyonu
15	69	Erkek	Yara Enfeksiyonu
16	31	Erkek	Yara Enfeksiyonu
17	28	Erkek	Yara Enfeksiyonu
18	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
19	20	Erkek	Yara Enfeksiyonu
20	60	Erkek	Yara Enfeksiyonu
21	40	Erkek	Yara Enfeksiyonu
22	54	Erkek	Yara Enfeksiyonu
23	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
24	32	Erkek	Yara Enfeksiyonu
25	28	Erkek	Yara Enfeksiyonu
26	75	Erkek	Yara Enfeksiyonu
27	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
28	18	Erkek	Yara Enfeksiyonu
29	21	Erkek	Yara Enfeksiyonu
30	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
31	36	Erkek	Yara Enfeksiyonu
32	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
33	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
34	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
35	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
36	39	Erkek	Yara Enfeksiyonu
37	42	Erkek	Yara Enfeksiyonu
38	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
39	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
40	43	Erkek	Yanık Enfeksiyonu

41	77	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
42	26	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
43	35	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
44	74	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
45	35	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
46	19	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
47	41	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
48	81	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
49	28	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
50	75	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
51	42	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
52	48	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
53	38	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
54	43	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
55	77	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
56	26	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
57	35	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
58	74	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
59	35	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
60	19	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
61	41	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
62	81	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
63	28	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
64	75	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
65	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
66	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
67	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
68	87	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
69	36	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
70	44	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
71	64	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
72	63	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
73	85	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
74	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
75	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
76	29	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
77	23	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
78	74	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
79	76	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
80	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
81	61	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
82	64	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
83	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
84	75	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
85	54	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
86	47	Dişi	Yanık Enfeksiyonu

87	43	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
88	41	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
89	49	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
90	55	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
91	83	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
92	44	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
93	19	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
94	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
95	21	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
96	74	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
97	32	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
98	63	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
99	34	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
100	57	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
101	56	Erkek	Yara Enfeksiyonu
102	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
103	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
104	58	Erkek	Yara Enfeksiyonu
105	71	Erkek	Yara Enfeksiyonu
106	35	Erkek	Yara Enfeksiyonu
107	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
108	41	Erkek	Yara Enfeksiyonu
109	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
110	27	Erkek	Yara Enfeksiyonu
111	19	Erkek	Yara Enfeksiyonu
112	67	Erkek	Yara Enfeksiyonu
113	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
114	56	Erkek	Yara Enfeksiyonu
115	53	Erkek	Yara Enfeksiyonu
116	58	Erkek	Yara Enfeksiyonu
117	56	Erkek	Yara Enfeksiyonu
118	75	Erkek	Yara Enfeksiyonu
119	41	Erkek	Yara Enfeksiyonu
120	49	Erkek	Yara Enfeksiyonu
121	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
122	76	Erkek	Yara Enfeksiyonu
123	23	Erkek	Yara Enfeksiyonu
124	47	Erkek	Yara Enfeksiyonu
125	41	Erkek	Yara Enfeksiyonu
126	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
127	36	Erkek	Yara Enfeksiyonu
128	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
129	64	Erkek	Yara Enfeksiyonu
130	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
131	29	Erkek	Yara Enfeksiyonu
132	28	Erkek	Yara Enfeksiyonu

133	31	Erkek	Yara Enfeksiyonu
134	39	Erkek	Yara Enfeksiyonu
135	57	Erkek	Yara Enfeksiyonu
136	59	Erkek	Yara Enfeksiyonu
137	37	Erkek	Yara Enfeksiyonu
138	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
139	49	Erkek	Yara Enfeksiyonu
140	85	Erkek	Yara Enfeksiyonu
141	24	Erkek	Yara Enfeksiyonu
142	37	Erkek	Yara Enfeksiyonu
143	66	Erkek	Yara Enfeksiyonu
144	39	Erkek	Yara Enfeksiyonu
145	19	Erkek	Yara Enfeksiyonu
146	56	Erkek	Yara Enfeksiyonu
147	21	Erkek	Yara Enfeksiyonu
148	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
149	49	Erkek	Yara Enfeksiyonu
150	51	Erkek	Yara Enfeksiyonu
151	41	Dişi	Yara Enfeksiyonu
152	49	Dişi	Yara Enfeksiyonu
153	38	Dişi	Yara Enfeksiyonu
154	76	Dişi	Yara Enfeksiyonu
155	23	Dişi	Yara Enfeksiyonu
156	47	Dişi	Yara Enfeksiyonu
157	41	Dişi	Yara Enfeksiyonu
158	45	Dişi	Yara Enfeksiyonu
159	36	Dişi	Yara Enfeksiyonu
160	38	Dişi	Yara Enfeksiyonu
161	64	Dişi	Yara Enfeksiyonu
162	63	Dişi	Yara Enfeksiyonu
163	29	Dişi	Yara Enfeksiyonu
164	28	Dişi	Yara Enfeksiyonu
165	31	Dişi	Yara Enfeksiyonu
166	39	Dişi	Yara Enfeksiyonu
167	57	Dişi	Yara Enfeksiyonu
168	59	Dişi	Yara Enfeksiyonu
169	37	Dişi	Yara Enfeksiyonu
170	45	Dişi	Yara Enfeksiyonu
171	49	Dişi	Yara Enfeksiyonu
172	85	Dişi	Yara Enfeksiyonu
173	24	Dişi	Yara Enfeksiyonu
174	37	Dişi	Yara Enfeksiyonu
175	66	Dişi	Yara Enfeksiyonu
176	39	Dişi	Yara Enfeksiyonu
177	19	Dişi	Yara Enfeksiyonu
178	56	Dişi	Yara Enfeksiyonu

179	21	Dişi	Yara Enfeksiyonu
180	63	Dişi	Yara Enfeksiyonu
181	49	Dişi	Yara Enfeksiyonu
182	51	Dişi	Yara Enfeksiyonu
183	25	Dişi	Yara Enfeksiyonu
184	71	Dişi	Yara Enfeksiyonu
185	36	Dişi	Yara Enfeksiyonu
186	62	Dişi	Yara Enfeksiyonu
187	64	Dişi	Yara Enfeksiyonu
188	58	Dişi	Yara Enfeksiyonu
189	75	Dişi	Yara Enfeksiyonu
190	33	Dişi	Yara Enfeksiyonu
191	28	Dişi	Yara Enfeksiyonu
192	74	Dişi	Yara Enfeksiyonu
193	46	Dişi	Yara Enfeksiyonu
194	49	Dişi	Yara Enfeksiyonu
195	42	Dişi	Yara Enfeksiyonu
196	39	Dişi	Yara Enfeksiyonu
197	38	Dişi	Yara Enfeksiyonu
198	53	Dişi	Yara Enfeksiyonu
199	44	Dişi	Yara Enfeksiyonu
200	63	Dişi	Yara Enfeksiyonu

EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi

FIRAT TERCÜME NOTER YEMİNLİ TERCÜME OFİSİ TRANSLATION OFFICE www.firattercume.com.tr

Yeminli Tercüme

Sağlık Bakanlığı
AL Anbar Sağlık Müdürlüğü
Al-Ramadi Kadın Sağlığı ve Çocuk
Eğitim Hastanesi

/ Logo /

No : 3050
Tarih : 18/07/2020

/ Mühür /

KİME: ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

Hastanemizde araştırmasının pratik kısmını yapabilmesi amacıyla (ABDULRAZZAQ JUMAAH HAMMAD HAMMAD)'nin **talebini kabul ettiğimizi** tarafınıza bildiririz.

Dr. Muneem Aftan Ayed
AL-Ramadi Kadın Sağlığ
ve Çocuk Eğitim Hastanesi

/ İmza ve Mühür /

E-mail: .alatfalhos@yahoo.com

FIRAT TERCÜME Turizm Dış Ticaret Ltd. Şti.

ASIL'dan FAKS'tan FOTOKOPİ'den ÇEVİRİDİR

İNGİLİZCE
İşbu Çeviri ASLINDAN FOTOKOPİDEN Tarafımdan Aslına Sadık Kalınarak Tercüme Edilmiştir
Yeminli Mütercim Tercüman Savaş HORMUZ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı **:** Abdulrazzaq Jumaah Hammad HAMMAD

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Anbar Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü	2002-2005