ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA MVAT, CUPA VE CUPB GENLERİ İLE GEN EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ

Sura Yahya Raheem RAHEEM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sura Yahya Raheem RAHEEM tarafından hazırlanan **"Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da MvaT, CupA Ve CupB Genleri İle Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki"** adlı tez çalışması 17/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT

Eş Danışman : Prof. Dr. Asmaa Mohammed Salih AlMOHAIDI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan SHMYO Veterinerlik Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa Sencer KARAGÜL
Kartepe Atçılık MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü
Kocaeli Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan SHMYO Veterinerlik Bölümü
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 "**Hastalardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da MvaT, CupA ve CupB Genleri ile Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki**" 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 (17/02/2022).

Sura Yahya Raheem RAHEEM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA MVAT, CUPA VE CUPB GENLERİ İLE GEN EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ

Sura Yahya Raheem RAHEEM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eş Danışman: Prof. Dr. Asmaa Mohammed Salih AlMOHAIDI

Bu çalışma, *P.aeruginosa* klinik izolatlarında CupA, CupB ve MvaT genleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamıştır. Bağdat'ta Al-Yarmuk Genel Eğitim Hastanesi'nde farklı hastalık, yara, yanık, diyabetik ayak ülseri, idrar yolu enfeksiyonu, keratit, dış kulak iltihabı olan hastalardan toplanan yüz elli numunenin yüz bir tanesi *P.aeruginosa* kaynaklı olarak teşhis edilmiştir. Katılımcılar çeşitli yaş gruplarından ve cinsiyetlerden seçilmiştir. Toplanan numuneler farklı seçici ve diferansiyel besiyerlerinde kültürlenmiş ve *P.aeruginosa*'yı tanımlamak için biyokimyasal olarak test edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın tanımlanması API 20E sistemleri kullanılarak doğrulanmış, sonuçlar API20NE testi için duyarlılığın (%80,1) olduğunu göstermiştir. 5 izolat için CupA, CupB ve MvaT genlerinin tespiti için konvansiyonel PCR uygulanmıştır. Bu genlerin varlığı elektroforez ile doğrulanmıştır ve üç gen için agaroz jelde DNA bandının görünümü sonuçlar pozitiftir (%100). Daha sonra CupA, CupB ve MvaT genlerinin pozitif sonuçlarını veren 5 izolatı için dizileme yapılmıştır ve NCBI'ndeki hizalama, *P.aeruginosa* ile CupA geninin %98, CupB geninin %96 ve MvaT geninin %100 özdeşliğini göstermiştir. Tüm izolatların antibiyotik duyarlılığını değerlendirmek için dokuz antibiyotik kullanılmıştır. Sonuçlar, izolatların çoğunun Levofloksasin (%94), Timinim (%88,1), Gentamisin (%82,1) ve hem Pipracillin hem de Imipenem'e (%80,1) duyarlı olduğunu göstermiştir, ancak izolatlar diğer antimikrobiyaller Augmentin'e (%72,2), Ceftazidime'e (%33,6), Colistin'e (%37,6) ve Siprofloksasin'e (%27,7) karşı dirençli görünmüştür. Levofloksasin'in, *P. aeruginosa* izolatlarına karşı en etkili antibiyotiği temsil ettiği tespit edilmiştir. Real Time PCR kullanılarak 16 izolat için CupB, MvaT ve RpoD (housekeeping gen) genlerinin gen ekspresyonu yapılmıştır. MvaT geninin en yüksek gen ekspresyon katlama değerine (3,86) sahip olduğu, CupB geni için 0,01 olduğu ve RpoD için 1,02 olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre; biyofilm oluşumunda rol oynayan CupB geni MvaT global regülatör geni tarafından baskılanmış ve buna rağmen bu izolatlar patojenitelerini korumaya devam etmiş ve bazı antibiyotiklere dirençli oldukları tespit edilmiştir.

2022, 96 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *P.aeruginosa*, CupA, CupB, MvaT, Çoklu ilaca direnç

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE RELATION BETWEEN MVAT, CUPA AND CUPB GENES WITH GENE EXPRESSION IN ISOLATED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FROM PATIENTS

Sura Yahya Raheem RAHEEM

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

Advisor: Asst. Prof. Müge FIRAT
Co-Advisor: Prof. Dr. Asmaa Mohammed Salih AlMOHAIDI

This study aimed to study the relationship between CupA, CupB and MvaT genes in *P.aeruginosa* clinical isolates. Hundred fifty samples were collected, hundred one of them were diagnosed as *P.aeruginosa* were collected from patients with different diseases, wounds, burns, diabetic foot ulcers, urinary tract infection, keratitis, external otitis in Baghdad hospital (Al-Yarmuk General Teaching Hospital). Participants were drawn from a variety of age groups and genders. The collected samples were cultured on different selective and differential media and tested biochemically in order to identify *P.aeruginosa*, the identification of *P. aeruginosa* confirmed by using the systems API 20E, the results showed that the sensitivity for API20NE test was (80.1%). Conventional PCR has been applied for detect CupA, CupB and MvaT genes for 5 isolates, then the presence of these genes was confirmed by electrophoresis and appearance of DNA band in the agarose gel for three genes the results was positive 5/5 (100%), then sequencing was performed for the 5 isolates which gave positive results of CupA, CupB, MvaT genes and the alignment in NCBI showed identities of CupA gene 98%, CupB gene 96% and MvaT gene 100% with *P. aeruginosa*. Nine antibiotics were used to evaluate the antibiotic sensitivity of all isolates. The most isolates were sensitive to Levofloxacin (94%), Ticarcillin-clavulanic acid (Timinim) (88.1%), Gentamicin (82.1%) and to both Pipracillin and Imipenem (80. 1%), while the isolates appeared resistant to other antimicrobials represented by (72.2%) to Augmentin, (33.6%) to Ceftazidime, (37.6%) to Colistin, and (27.7%) to Ciprofloxacin. Levofloxacin represents the most effective antibiotic against *P. aeruginosa* isolates. By Real Time PCR the gene expression of CupB, MvaT and RpoD (housekeeping gene) genes were conducted for 16 isolates. It was found that the mvaT gene have the highest value of gene expression fold which was (3.86), while the CupB gene was 0.01, and the RpoD was 1.02. This study concluded that; CupB gene which have a role in biofilm formation repressed by MvaT global regulator gene and despite this, these isolates were pathogens and had resistance for some antibiotics.

2022, 96 pages

Keywords: *P.aeruginosa*, CupA, CupB, MvaT, Multidrug resistantance

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamın tamamlanmasında büyük katkı sağlayan, buradaki destek ve rehberliklerinden dolayı ve bu çalışmayı seçmemde bana güvendiği için danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT'a en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Eş danışmanım Prof. Dr. Asmaa Mohammed Salih AlMOHAIDI'a çalışmalar sırasındaki rehberliği, sabrı, sürekli desteği ve değerli tavsiyeleri için teşekkür eder, minnetlerimi sunarım.

Başta ailem olmak üzere bana yardım eden ve destekleyen herkese çok teşekkür ederim.

Sura Yahya Raheem RAHEEM
Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER DİZİNİ vi
KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 3
2.1 *P. aeruginosa*'nın Tarihçesi 3
2.2 Genel Açıklama 3
2.3 Sınıflandırma 5
2.4 Epidemiyoloji 6
2.5 *P. aeruginosa* Genomu 7
2.6 Patogenez 9
2.6.1 Yanıklarda *Pseudomonas aeruginosa* 10
2.6.2 Yarada *Pseudomonas aeruginosa* 11
2.7 Virülans Faktörleri 11
2.8 MvaT Geni 14
2.9 Cup Genleri 16
2.10 RpoD (σ^{70}) Geni 17
2.11 Antimikrobiyal Direnç 18
2.12 Antibiyotik Etkisi 20
2.13 *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi 21
3. MATERYAL VE YÖNTEM 27
3.1 Materyal 27
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları 27
3.1.2 Kimyasallar ve solüsyonlar 28
3.1.3 Kültürel medya 28

3.1.4 Kitler **29**
3.1.5 Primerler **29**
3.1.6 Antimikrobiyal ajanlar **30**
3.1.7 Solüsyonlar **31**
3.1.8 Kültür medyası **32**
3.2 Yöntem **33**
3.2.1 Numune toplama **33**
3.2.2 Laboratuvar tanısı **34**
3.2.3 Sterilizasyon yöntemleri **35**
3.2.4 Bakteriyel izolatların saklanması **36**
3.2.5 Moleküler tanı **36**
3.2.6 Antimikrobiyal duyarlılık testi (Morello *et al.* 2006) **46**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **48**
4.1 *P. aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Tanımlanması **48**
4.2 Mikroskobik İnceleme **51**
4.3 Biyokimyasal Test Sonuçları **51**
4.4 *P. aerugiosa*'nın Moleküler Tanısı **53**
4.4.1 Gen dizileme **53**
4.4.2 Gen ekspresyonu **61**
4.5 *P. aeruginosa* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılığı **68**
5. SONUÇLAR **73**
KAYNAKLAR **74**
ÖZGEÇMİŞ **96**

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CFU	Koloni oluşturma birimi
CT	Eşik döngüsü
dk	Dakika
g	Gram
Ib/In²	İnç kare başına pound
Kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
MvaT	Transkripsiyonel düzenleyici MvaT (MvaT başlangıçta *Pseudomonas mevaloni*'de mevalonat katabolizmasında yer alan mvaAB operonunu kodlayan enzimlerin transkripsiyonel düzenleyicisi olarak tanımlandı)
ng	Nanogram
pg	Petagram
pmol	Pikomol
Vol	Voltaj
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ΔCT	Delta CT
ΔΔCT	Delta delta CT
σ^{70}	Sigma 70 faktörü
%	Yüzde
*	Önemli

KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
AG'ler	Aminoglikozitler
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
AMR	Antimikrobiyal direnç
BLI	B-laktamaz inhibitörleri
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CF	Kistik fibroz
CT	Eşik döngüsü
Cup	Şaperon- eşlikçi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ESBL	Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz
gDNA	Genomik DNA
GIM	Alman imipenemaz
HGT	Yatay gen transferi
H.K.G	Housekeeping geni
IMP	İmipenem
LPS	Lipopolisakkarit
LSD	En küçük önemli fark
MDR	Çoklu ilaç direnci
mRNA	Mesajcı RNA
MBL	Metallo- beta-laktamaz
MRSA	Metisiline dirençli *staphylococcus aureus*
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
OM	Dış zar
P. Aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PASP	*Pseudomonas aeruginosa* küçük proteaz
PBP'ler	Penisilin bağlayıcı proteinler
PCH	Piyokelin
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi
PTC	Peptidil-transferaz merkezi
PVD	Piyoverdin
RNA	Ribonükleik asit
RNAP	RNA polimeraz
rRNA	Ribozomal RNA
SD	Standart sapma
SPM	Sao paulo metallo beta laktamaz
SPICE	*Serratia spp., p. Aeruginosa*, indole positif *proteus*, *citrobacter spp., enterobacter spp*.

TBE	Tris borik asit
TE	Tris- edta
T2SS	Tip II salgı sistemi
T3SS	Tip III salgı sistemi
T4P	TİP 4 pili
TPS	İki ortaklı salgı
tRNA	Taşıyıcı RNA
U.T.I	İdrar yolu enfeksiyonu
VIM	Verona integron kodlanmış metallo beta laktamaz
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 RpoD-housekeeping gen ekspresyonunda kullanılan termal profil……. 44
Şekil 3.2 CupB gen ekspresyonunda kullanılan termal profil.....45
Şekil 3.3 MvaT gen ekspresyonunda kullanılan termal profil 46
Şekil 4.1 MacConkey agarda *Pseudomonas aeruginosa* büyümesi.....49
Şekil 4.2 Kromojenik agarda *Pseudomonas aeruginosa* büyümesi.....49
Şekil 4.3 a ve b, kanlı agar üzerinde *P.aeruginosa* büyümesini göstermektedir 50
Şekil 4.4 Setrimid agar üzerinde *P. aeruginosa* büyümesi 50
Şekil 4.5 API20NE testi ile *P.aeruginosa*'nın pozitif sonucu 52
Şekil 4.6 %1 agaroz, TBE (1x) kullanılarak genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile görselleştirilmesi.....53
Şekil 4.7 *P.aeruginosa* CupA geninin (450 bp) konvansiyonel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dk) 1-5 : olumlu sonuçlar gösterir: basamak 100 bp. 54
Şekil 4.8 *P.aeruginosa* CupB geninin (400 bp) konvansiyonel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dk) 1-5 : olumlu sonuçlar gösterir: basamak 100 bp. 54
Şekil 4.9 *P.aeruginosa* MvaT geninin (150 bp) konvansiyonel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dak) 1-5: pozitif sonuçları gösterir: basamak 100 bp 55
Şekil 4.10 CupA geninin hizalama sonuçları.....56
Şekil 4.11 CupB geninin hizalama sonuçları 58
Şekil 4.12 MvaT geninin hizalama sonuçları.....60
Şekil 4.13 Real Time PCR ile CupB amplifikasyonu 64
Şekil 4.14 Real Time PCR ile CupB ayrışma eğrileri.....64
Şekil 4.15 Real Time PCR ile MvaT amplifikasyonu.....65
Şekil 4.16 Real Time PCR ile MvaT ayrışma eğrileri. 66
Şekil 4.17 Mueller Hinton agar üzerinde kültürlenen *P.aeruginosa'*ya karşı antimikrobiyal diskler kullanılarak yapılan duyarlılık testinin sonucu 69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *P. aeruginosa*'nın bilimsel sınıflandırması (Nakano *et al.* 2015).....6
Çizelge 2.2 Tıbben önemli *Pseudomonas*'ların bazılarının sınıflandırılması (Breed *et al*. 2014). 6
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve araçlar 27
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar 28
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültürel medya.....28
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kitler 29
Çizelge 3.5 Çalışmada dizileme için kullanılan primer dizileri 29
Çizelge 3.6 Çalışmada gen ekspresyonu için kullanılan primerler dizileri.....30
Çizelge 3.7 *P. aeruginosa* duyarlılık testi için kullanılan antimikrobiyal ajanlar.....30
Çizelge 3.8 Klinik kaynaklar ve izolat sayısı.....34
Çizelge 3.9 PCR için reaksiyon bileşenleri ve hacmi 38
Çizelge 3.10 CupA geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil 38
Çizelge 3.11 CupB geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil.....39
Çizelge 3.12 MvaT geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil 39
Çizelge 3.13 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi. 42
Çizelge 3.14 cDNA ters transkriptaz koşulunun termal döngüleyici adımları 42
Çizelge 3.15 Gen ekspresyonu için reaksiyon bileşenleri ve hacmi 43
Çizelge 3.16 Real Time PCR aşamaları ve sıcaklığı.....43
Çizelge 3.17 RpoD geni için Real Time PCR aşamaları ve sıcaklığı. 44
Çizelge 3.18 CupB gen ekspresyonunun termal profili 45
Çizelge 3.19 MvaT gen ekspresyonunun termal profili.....46
Çizelge 4.1 Kültürel testlerin pozitif sonuçları 50
Çizelge 4.2 *P. aeruginosa* izolatları için pozitif biyokimyasal testlerin yüzdeleri 51
Çizelge 4. 3 CupA geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri 55
Çizelge 4.4 CupB geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri 57
Çizelge 4.5 MvaT geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri 59
Çizelge 4.6 Farklı *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatları için housekeeping gen RpoD'nin Ct değerleri ve gen ekspresyonunun katı.....62
Çizelge 4.7 *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatları için housekeeping geni RpoD, MvaT ve CupB'nin Ct değerleri ve gen ekspresyonunun katı 66
Çizelge 4.8 *P. aeruginosa*'nın duyarlılık testleri sonuçları 70

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa Gram negatif ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Stover *et al.* 2000, Al Dawodeyah *et al.* 2018, Diggle and Whiteley 2020), bir proteobakteri olan *Pseudomonadaceae* familyasına aittir ve yapısında mobilizasyon için bir flagellum içermektedir (Jenny and Kingsbury 2018). *P. aeruginosa*'nın toprak, su, bitki ve hayvanlar gibi farklı ortamlarda geniş yayılımlı olması onların genel özelliği olarak bilinmektedir (Pang *et al.* 2019). Bu bakteri hem aerobik hem de anaerobik olarak gelişebilmektedir (Schurek *et al.* 2012).

Pseudomonas aeruginosa fırsatçı bir patojendir ve hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir (Kerr and Snelling 2009). *P. aeruginosa* biyofilmler geliştirmekte ve enfekte hücrelerde kalıcı bir enfeksiyon oluşturmak için çeşitli virülans proteinleri salgılamaktadır; bu, doku mikroçevresinde uygun homeostazın sürdürülmesi için gerekli olan çeşitli prosedürler üzerinde etkili olabilmektedir (Trøstrup *et al.* 2017). Bu organizmanın özel yeteneği, tespit edilmesi zor biyofilmler oluşturmaktır (Mulcahy *et al.* 2014). DSÖ yakın zamanda *P. aeruginosa'*yı ek araştırma finansmanına almış ve yeni tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyan öncelikli bir patojen olarak belirlemiştir (Tacconelli *et al.* 2018).

P. aeruginosa, eksotoksin A ve Tip III Salgı Sistemi (T3SS) toksinleri dahil olmak üzere bir dizi farklı toksinin yanı sıra ExoT, ExoS, ExoY ve ExoU ve flagella, pili, ekzopolisakkaritler, elastaz, proteazlar, lipazlar, pigmentler, sideroforlar gibi birçok virülans faktörü üretmektedir (David *et al.* 2014).

P. aeruginosa genomları, yaklaşık 6,3 milyon baz çiftiyle ortalama bakteri genomunun neredeyse iki katı büyüklüğündedir (Stover *et al.* 2000, Dicenzo and Finan 2017). Tüm geçirgen genler, *P. aeruginosa*'nın bunu değiştirmek, enfeksiyonu artırmak ve çok çeşitli ortamlara uyum sağlamak için kullanan genom yapısı sayesinde, yatay gen transferi yoluyla diğer bakteri türlerinden elde edilebilmektedir (Norgaard-Gron 2010).

P.aeruginosa 'da çok sayıda virülans geni vardır, bunlardan biri biyofilm büyümesinin ilk aşamaları, özellikle hücre-hücre etkileşimi ve mikrokoloni oluşumu için çok önemli olan Cup fimbria küme genleridir (Kulasekara *et al.* 2005, Ruer *et al.* 2007). Biyofilmler; antibiyotiklere, dezenfektanlara ve insan bağışıklık tepkisine karşı büyük dirençleri nedeniyle önemli terapötik zorluklar yaratmaktadır (Lee and Yoon 2017). Cup sistemleri, *P. aeruginosa PAO1*'de bulunan ve farklı organizasyonel ve fonksiyonel özellikler sergileyen en az dört tipten (CupA, B, C ve E) oluşmaktadır (Giraud *et al.* 2011).

Çalışmada, bu genin Real Time PCR ile ekspresyonunu ve bunun *P. aeruginosa'*daki global bir düzenleyici ile ilişkisini incelemek, çekirdek algılama, virülans, biyofilm oluşumu ve çoklu ilaç direnci ile ilgili çok sayıda genin (en az 150 gen) ekspresyonunun düzenlenmesi (bastırılması) için küme kap genlerinden CupA ve CupB seçilmiştir (Diggle *et al.* 2002).

Bu çalışmada *P. aeruginosa*'daki virülans genlerinin ekspresyonunu analiz etmek için Real Time PCR kullanılmıştır. Bu yaklaşım hızlı ve hassastır, ayrıca klinik laboratuvarda kullanılabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada *P. aeuroginosa'*nın farklı klinik izolatlarında CupA ve CupB ekspresyonu ile genlerin ekspresyonunu kontrol eden MvaT geni arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *P. aeruginosa*'nın Tarihçesi

P. aeruginosa, kültürdeki eşsiz renginden dolayı tarihi boyunca sayısız isim verilmiş en fırsatçı patojenlerden birisidir. 1850'de Fransız doktor Sedillot, cerrahi bandajlarda enfeksiyonlarla bağlantılı olduğunu düşündüğü renk değişikliğini fark etmiş ve *Pseudomonas*'ı ilk defa izole etmiştir. 1860'da Fordos mavi renkten sorumlu *P.aeruginosa* pigmentini izole ederken, Lucke 1862'de çubuk şeklindeki organizmalar ile bu pigment arasındaki ilişkiye atıfta bulunmuştur (Pitt 1998).

1882'de Carle Gessard, *P. aeruginosa*'yı iki hastanın mavi-yeşil renkli pürülansından saf kültürde başarılı bir şekilde kültüre etmiş, kültüre ettiği bakteriyi ilk olarak *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırmış ve "Bandajların Mavi ve Yeşil Renklenmesi Üzerine" başlıklı bir makalede yayınlamıştır (Goldman and Green 2009).

1916'da Freeman (Freeman 1916), çeşitli enfeksiyonlarla sonuçlanan *P. aeruginosa* yayılımı ve istilasının yollarını özetleyen bir makale yayınlamıştır. Bu bakteri, adını Yunanca sahte birim anlamına gelen "pseudomonas" (pseudo; sahte, monas ise tek birim anlamına gelmektedir) ve "aeruginosa" (bakır pası anlamına gelmektedir) kelimelerinden almıştır (Priya and Anitha 2013).

2.2 Genel Açıklama

Pseudomonas aeruginosa Gram negatif bir bakteridir ve çubuk şeklindedir (Stover *et al*. 2000, Al Dawodeyah *et al.* 2018, Diggle and Whiteley 2020), bir proteobakteri olan *Pseudomonadaceae* familyasında yer alır, yapısında mobilizasyon için bir flagellum içerir ve 0,5-0,8 µm x 1.5-3 µm çubuk şeklindedir. Bu flagellum (kamçı) ile kendini çoğu gram-negatif bakteriden bireyselleştirir. *P. aeruginosa* kalıcı olarak laktozu fermente edemez ve oksidaz reaksiyonunda pozitiftir (Jenny and Kingsbury 2018).

P. aeruginosa; kapsüllenmiş veya antimikrobiyallere, fagositik hücrelere ve lenfositlere karşı bariyer görevi gören balçık katlara sahip aerobik bir bakteridir (Todar 2011). Belirtildiği gibi, *P.aeruginosa* aerobik olmakla birlikte, nitrat veya arginin bir terminal elektron alıcısı ortamda mevcutsa anaerobik olarak da büyüyebilmektedir. Bakteri, çok çeşitli organik bileşikler üzerinde büyüyebilir; basit ortamlar ve nemli yüzeyler dahil olmak üzere düşük karbon ve azot kaynaklarında yetişmektedir. Sık sık damıtılmış suda büyüdüğü tespit edilmiştir, bu da az besin gereksimininin olduğunu göstermektedir (Palleroni 2015).

P. aeruginosa kendine has bir kokuya sahiptir (bu koku “çiçek”, "üzüm suyu" veya "yeni tortilla" olarak tanımlanır) (Clark *et al.* 2015). *Pseudomonas* 37 santigrat derecede gelişirken, 4 ila 40 santigrat derece arasında değişen sıcaklıklarda da yaşayabilmektedir (Gajdács *et al.* 2019).

Farklı pigment türlerini sentezlemektedir: piyoverdin/floresein (düşük demirli ortamlarda siderofor olarak çalışabilen ve izolatların yüzde 70-80’i tarafından üretilen parlak yeşil-sarı suda çözünür bir pigment), piyosiyanin (demir metabolizmasında, bakteriyel redoks dengesinin korunmasında ve hücre-hücre iletişiminde bir işlev oynayan yeşil-mavi yağda çözünür bir fenazon türevi pigment), pyorubin (izolatların yaklaşık %2-3’ü tarafından üretilen ve redoks dengesinin korunmasında rol oynayan kırmızımsı kahverengi suda çözünür bir pigment) ve pyomelanin/alkaptomelanin (kahverengi-siyah, suda çözünür ve asidik bir pigment) (Meyer *et al.*1996, Hall *et al.* 2016).

P. aeruginosa üç farklı tipte koloni oluşturmaktadır: Su veya topraktan alınan ilk doğal numuneler tipik olarak kaba ve küçük koloniler oluştururken, klinik numuneler iki tip düz koloniden birini oluşturmaktadır. İkinci form, düz kenarları ve yüksek bir görünümü olan pürüzsüz, büyük bir kızarmış yumurta görünümü üretmektedir (Brooks *et al.* 2007).

Üçüncüsü esas olarak idrar yolu ve solunum salgılarından edinilen başka bir türdür; bu tür, guluronik ve mannuronik asitlerden oluşan bir ekzopolisakkarit olan aljinatın

varlığından dolayı mukoid bir görünüm sergilemektedir. Pürüzsüz ve mukoid kolonilerin virülans ve kolonizasyon için kritik olduğu düşünülmektedir (Todar 2011).

*P. aeruginosa'*nın belirli suşları, fermente edilmemiş laktoz nedeniyle soluk sarı bir renge sahip olan MacConkey agar üzerinde hemoliz toksini salarak kanı tamamen hemoliz (β-hemoliz) etmektedir. *P. aeruginosa'*yı seçici olarak izole etmek için piyosiyanin, piyoverdin, piyorubin kırmızısı ve piyomelanin siyahı renklerinin oluşumunu uyaran Setrimid agar dâhil çok sayıda besiyeri kullanılmaktadır (Breed *et al.* 2014). *P. aeruginosa* katalaz, oksidaz, sitrat kullanımı, indol, üçlü şeker demir, üreaz, metil kırmızısı, voges proskauer ve jel sıvılaştırma testleri kullanılarak biyokimyasal olarak tanımlanmaktadır (Ranjan *et al.* 2010). *P. aeruginosa* kinolonlar, tetrasiklin ve kloramfenikole dirençli (Rossolini and Mantengoli 2005) ve gentamisine duyarlıdır (Jombo *et al.* 2008).

P. aeruginosa karşıt fiziksel ve kimyasal koşullara rağmen üremesini, dağılımını ve hayatta kalmasını destekleyen geniş metabolik çeşitliliği nedeniyle vahşi ve su ortamlarında yaşayan bir bakteridir, böylece bu bakteri ekolojik varlığını koruyabilmekte ve halk sağlığı için tehlikeli olabilmektedir (Deredjian *et al.* 2014, Elshafiee *et al.* 2019).

2.3 Sınıflandırma

Schröter 1872'de, *P. aeruginosa'*yı morfolojik ve kültürel özellikler yönünden Çizelge 2.1'de gösterildiği şekilde sınıflandıran ilk kişi olmuştur (Nakano *et al.* 2015). Daha sonra *Pseudomonadaceae* familyası, Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi rRNA/DNA homolojisine ve paylaşılan kültürel özelliklere dayalı olarak beş homoloji grubuna ayrılmıştır (Breed *et al.* 2014).

Çizelge 2.1 *P. aeruginosa*'nın bilimsel sınıflandırması (Nakano *et al.* 2015)

Alan	**Bacteri**
Alem	*Öbakteri*
Şube	*Proteobakteriler*
Sınıf	*Gama Proteobakteriler*
Takım	*Pseudomonadales*
Aile	*Pseudomonadaceae*
Cins	*Pseudomonas*
Tür	*Pseudomonas aeruginosa*

Çizelge 2.2 Tıbben önemli *Pseudomonas*'ların bazılarının sınıflandırılması (Breed *et al.* 2014)

rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu	**Cins ve Türler**
Floresan grubu	*Pseudomonas aeruginosa*
	Pseudomonas floresan
	Pseudomonas putida
Floresan olmayan grup	*Pseudomonas stutzeri*
	Pseudomonas mendocina
II	*Burkholderia pseudomallei*
	Burkholderia mallei
	Burkholderia cepacia
	Ralstonia pickettii
III	*Comamonas türleri*
	Acidovorax türleri
IV	*Brevundimonas türleri*
	Stenotrophomonas maltophilia

2.4 Epidemiyoloji

P. aeruginosa'nın toprak, su, bitki ve hayvanlar gibi farklı ortamlarda geniş yayılımlı olması onun genel özelliğidir (Pang *et al.* 2019). *P. aeruginosa*; yüksek konsantrasyonlu boya ve tuzlar, etkisiz sterilizatörler ve çok sayıda antibiyotik gibi farklı çevresel koşullarda yaşayabilmektedir. Ayrıca, büyüme gereksinimleri çok mütevazı olduğu için

damıtılmış suda büyüyebilmekte ve bazı dezenfektanları tolere edebilmektedir (Blanc *et al.* 2007). Deri yüzeylerinde, üst solunum yollarında, burun deliklerinde ve normal bağırsak florasının bir parçası olarak az miktarda bulunan kommensal bir bakteridir (Brook *et al.* 2007). Sağlıklı kişilerin %40'ına kadar bağırsaklarını kolonize etmekte; bu oran hastanede yatan hastalarda, özellikle yatış süresi arttıkça önemli ölçüde artmaktadır (Mayhall 1999).

*P. aeruginosa'*nın giderler, lavabolar, çiçek vazoları, nehirler, nemlendiriciler, hidroterapi havuzları ve çamaşır makineleri dahil olmak üzere çeşitli nemli ortamlarda ve ayrıca damıtılmış suda hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi nedeniyle, kontamine sebzelerin tüketilmesi hastanelerdeki immün yetmezliği olan hastalar için risk taşımaktadır (Frank 2012). Bu bakteri, hastanelerde yaygın olarak kullanılan çeşitli antiseptik ve dezenfeksiyon maddelerine karşı dirençlidir. Bu nedenle, hastanelerde edinilen tüm enfeksiyonların yaklaşık %10'unu oluşturur, yanık hastaları hava yoluyla bulaşmanın yanı sıra tıbbi personelin elleri veya kontamine giysiler yoluyla da bulaşabilmektedir (Greenwood *et al.* 2012).

2.5 *P. aeruginosa* Genomu

P. aeruginosa genomları, genomik dönem boyunca çeşitli enfeksiyonlu ve enfeksiyonsuz habitatlardan kaynaklanmakta ve bir çekirdek genom ile oldukça büyük bir pan-genoma sahip olmaktadır (Freschi *et al.* 2019). Bir çalışmada, *P. aeruginosa* genomunun, % 6,6'sını oluşturan 321 çekirdek temel genine sahip olduğu gösterilmiştir (Poulsen *et al.* 2019). Başka bir çalışmada, çeşitli çevresel kaynaklardan alınan yaklaşık 1300 *P. aeruginosa* genomu analiz edilmiş ve *P. aeruginosa*'nın pan genomunun 54. 272 gene sahip olduğu keşfedilmiştir (665 çekirdek gen, 26.420 esnek gen ve 27.187 benzersiz gen) (Freschi *et al.* 2019). *Pseudomonas aeruginosa*'nın genomu, hem polimorfizmler hem de gen içeriği varyansları açısından yüksek düzeyde genetik çeşitlilik göstermektedir ve monolitik değildir (Kung *et al.* 2010, Freschi *et al.* 2019, Ozer *et al.* 2019).

Genom boyutlarındaki çeşitlilik, çeşitli *P. aeruginosa* suşlarının değişen genom boyutlarına sahip olmasına neden olmaktadır (Subedi *et al.* 2019). *P. aeruginosa*'nın aksesuar genomu, belirli suşlarında bulunan ancak diğerlerinde bulunmayan korunmamış genleri içermektedir. Aksesuar genom, kromozoma çeşitli lokuslarda eklenen plazmitler ve DNA'dan oluşmaktadır (Freschi *et al.* 2019). Bu genler, *P.aeruginosa*'nın değişmesini, enfeksiyonu artırmasını ve çok çeşitli ortamlara uyum sağlamasını sağlayan plastik genom yapısı sayesinde, yatay gen transferi yoluyla diğer bakteri türlerinden elde edilebilmektedir (Norgaard-Gron 2010).

P. aeruginosa aksesuar genomu çeşitli taşıyıcıları, transkripsiyonel düzenleyicileri ve iki bileşenli düzenleyici sistemleri kodlamakta ve bu da aksesuar genomun çeşitli besin dizilerini kullanma yeteneğini göstermektedir. *P. aeruginosa* yüksek düzeyde genomik çeşitliliğe sahiptir, çünkü aksesuar DNA bölümleri genom boyunca yayılmakta ve bu da çeşitli koşullara/ayarlara uyarlanabilirliğini desteklemektedir. Ek olarak, aksesuar genom, *P. aeruginosa* kalıcılığında, özellikle de çoklu ilaç direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Ek olarak, aksesuar genom, virülans faktörlerini kodlamaktadır (Kung *et al.* 2010, Freschi *et al.* 2019, Subedi *et al.* 2019). Yaklaşık 6,3 milyon baz çifti ile *P.aeruginosa* genomları, ortalama bakteri genomunun neredeyse iki katı büyüklüğündedir (Stover *et al.* 2000, Dicenzo and Finan 2017). Çeşitlendirilmiş seçime tabi tutulan lokuslar dışında, çekirdek genom klonal kompleksler içinde büyük ölçüde korunmakta ve yüzde 0,5-0,7'lik dizi değişiklikleri sergilemektedir (Cramer *et al.* 2011).

Genomun yaklaşık %10'u düzenleyici proteinler tarafından kodlanmaktatır ve birçok gen iki düzenleyici sistemin bileşenleridir; bunların ilki olan düzenleyici sistem, çevresel değişikliklere hızlı adaptasyon sağlayan sinyal iletim yollarını içermektedir (Eusebio 2013), ikinci düzenleyici sistem ise biyofilm oluşumunu, çekirdek algılamayı ve virülans faktörlerini düzenlemektedir. Böylece bu adaptasyon ile, bu bakterilerin çok çeşitli habitatlarda hayatta kalması ve çeşitli dokularda enfeksiyonlara neden olan bir bitki, hayvan ve insan patojeni haline gelmesi sağlanmaktadır (Gellatly and Hancock 2013).

P. aeruginosa genomunun GC açısından zengin bölgesi, aksesuar genom genini, benzer bir yaşam tarzı ve metabolik varyasyona sahip diğer GC açısından zengin proteobakterilerle değiştirmektedir, ancak tür içi genomik ada transferi, *P.aeruginosa* suşları içinde 10-6 ila 10-2 sıklıkta gerçekleşmektedir (Minoia *et al.* 2008, Klockgether *et al.* 2011). Genom, daha fazla sayıda *P. aeruginosa* popülasyonunda ifade edilen genleri içeren esnekliğe sahiptir; bu genler farklı lokuslarda yoğunlaşmıştır ve genom içinde rastgele yayılmaz; bu lokuslar genellikle genomik adalar (>10 kb) veya adacıklar (10 kb) olarak adlandırılmaktadır (Mathee *et al.* 2008). Plazmit ise bu bakterinin gen havuzunun, özellikle de çoklu ilaca direnç sağlayan plazmitlerin büyük bir kısmı olarak kabul edilmektedir (Shahid *et al.* 2003).

2.6 Patogenez

P. aeruginosa insanlarda, hayvanlarda, böceklerde, solucanlarda ve bitkilerde çok çeşitli dokularda enfeksiyonlara neden olan yükek virülanslı ve iyi bilinen bir patojendir. İnsanlarda, değişen hastalık ve ölüm oranına sahip enfeksiyonlara neden olmaktadır. Toplumdaki enfeksiyonlar genellikle hafif ve nadir görülürken, hastanelerdeki ve sağlık bakım ortamlarındaki enfeksiyonlar daha şiddetli, çeşitli ve yaygındır (Greenwood *et al.* 2012).

P. aeruginosa; solunum sistemi, yanıklar ve idrar yollarında şekillenen enfeksiyonlar gibi çeşitli yaşamı tehdit eden enfeksiyonların yanı sıra tıbbi implant cihazları (Malhotra *et al.* 2019), delinme yaraları, ventilatörle ilişkili pnömoni (Kerr and Snelling 2009, Mulcahy *et al.* 2014), antibiyotik ilişkili diyare (Al-Salehy 2015), çok sayıda kan dolaşımı enfeksiyonu (Cattoir *et al.* 2010) ve bakteriyemi durumlarında da tespit edilebilmekte (Al-Hasan *et al.* 2008), ayrıca korneayı rutin olarak enfekte edebilmekte ve kornea kazıntılarından en sık izole edilen mikroorganizma olmaktadır (Saeed *et al.* 2009, Hilliam *et al.* 2020). Ayrıca kistik fibroz hastalarında enfeksiyon ve ölüm ile ilişkilidir (Anuj *et al.* 2009).

P. aeruginosa; bronşektazi, nötropeni, kanser, AIDS, organ nakli, kontrolsüz diabetes mellitus ve yoğun bakım ünitesi (YBÜ) kabulleri dahil olmak üzere bağışıklığı

baskılanmış bireylerde çeşitli enfeksiyonlardan sorumludur. Kateterler veya endotrakeal tüpler gibi invaziv ekipman kullanan hastalarda, bu mikroorganizmanın tespit edilmesi zor biyofilmler oluşturma konusundaki özel yeteneği nedeniyle tehlike riski ortaya çıkmaktadır (Mulcahy *et al.* 2014). Genellikle fırsatçı bir patojendir ve düşük çevresel besinlerin varlığında canlı kalmasına rağmen, antimikrobiyallerin ve deterjanların çoğuna direnci nedeniyle hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir (Kerr and Snelling 2009, Mulcahy *et al.* 2014).

Hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olması, patojenin yüksek uyumlanabilirliğinin bir sonucudur (Gellatly and Hancock 2013). *P. aeruginosa* yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle, bu etkene karşı antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi gecikmiş ve sonuç olarak halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaya devam etmektedir (Sainz-Mejas *et al.* 2020). Asidik ortamların *P. aeruginosa* biyofilmlerinin üretimini arttırdığı, daha yüksek antibiyotik direncine adaptasyonu hızlandırdığı ve biyofilm/virülans ile ilgili birkaç genin ekspresyonunu geliştirdiği vurgulanmıştır. Ek olarak, fizyolojik olarak nötr ortama kıyasla artan *P. aeruginosa* tutunması ve bakteri sayıları normal deneklerden kültürlenmiş birincil insan bronş epitel hücrelerinin yüzeyinde tespit edilmiştir (Lin *et al.* 2020).

2.6.1 Yanıklarda *Pseudomonas aeruginosa*

Yanık yaraları, enfeksiyonunun neden olduğu fizyolojilerindeki çok sayıda değişiklik nedeniyle ölüme neden olabilmektedir. Yanık ve enfeksiyonlarla ilişkili yaygın patojenler *Staphylococcus* ve *Pseudomonas spp*. türleridir (D'Abbondanza and Shahrokhi 2021). Özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, yoğun bakım ünitelerinde yanık ve enfeksiyonlarla ilişkili en yaygın patojendir (Ghaima *et al.* 2018). *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu yanık yara enfeksiyonları, hastanelerde tedavisi en zor yaralar arasında bulunmaktadır (Jault *et al.* 2018).

P. aeruginosa enfeksiyonu yanık hastasının iyileşmesinde gecikmelere ve hatta ölüme neden olabilmektedir. *P. aeruginosa* suşları, insan yanık yaralarında eksudatta çoğalmakta ancak araştırılan diğer patojenlerin suşları o şekilde bulunmamaktadır. Ek

olarak, yanık yarası eksudatları, *P. aeruginosa'*da virülans faktörü ekspresyonunu desteklemektedir (Gonzalez *et al.* 2016). Akut doku iltihabı ve tedavi edilmeyen enfeksiyonlar sonucunda hastaların hareket kabiliyeti azalmakta ve bakım masrafları artmaktadır, ayrıca mikrobiyal enfeksiyonun bir sonucu olarak oluşan ve antibiyotik kürlerine karşı daha fazla direnç sağlayan biyofilmler tedavide zorluklar ortaya çıkarabilmektedir. Doğru tedavi olmadan, daha virülent bakteri türlerinin varlığı nedeniyle akut bir yara kronikleşebilmektedir (Rahim *et al.* 2017).

2.6.2 Yarada *Pseudomonas aeruginosa*

Elektif cerrahi veya travmatik hasar sonucu gelişen yara enfeksiyonu, hastalar için önemli bir morbidite nedeni olmaya devam etmekte ve önemli masraflara ve bozulmalara neden olmaktadır (Keenan *et al.* 2014). *P. aeruginosa*, yara enfeksiyonlarında sıklıkla bulunan, yüksek oranda adapte olmuş fırsatçı bir patojendir (Murali *et al.* 2014). *P. aeruginosa* biyofilmler geliştirmekte ve enfekte hücrelerde kalıcı bir enfeksiyon oluşturmak için çeşitli virülans proteinleri salgılamakta; bu, doku mikroçevresinde uygun homeostazın sürdürülmesi için gerekli olan çeşitli prosedürler üzerinde bir etkiye sahip olabilmektedir (Trøstrup *et al.* 2017).

Bu virülans; hücre sinyal yolaklarını bozarak hücre dışı matrisi yok etmekte, bakteri adhezyonu ve ardından doku hasarı ile kan damarı istilasına izin vermektedir (Schmidtchen *et al.* 2003). *P. aeruginosa* tarafından üretilen temel virülans faktörleri elastaz A, elastaz B, proteaz IV ve alkalin proteazlardır (Kipnis *et al.* 2006). Genel olarak, patojen tarafından salgılanan virülans proteinleri, konakçı sistemdeki çeşitli fizyolojik fonksiyonlar üzerinde, yara iyileşmesi de dahil olmak üzere, zararlı bir etkiye sahip olabilmektedir (Schmidtchen *et al.* 2003).

2.7 Virülans Faktörleri

Bakteriyel virülans faktörleri; hücre yüzeyi ve patojenik bakteriler tarafından üretilen ve bakterilerin konakçıda bir niş kolonize etmelerini, konakçı bağışıklık tepkisinden kaçmalarını ve bunları baskılamalarını, doku hasarına neden olmalarını ve konakçıdan

besin elde etmelerini sağlayan salgılanan proteinler veya biyolojik moleküllerdir (Fleitas Martinez *et al.* 2019). *P. aeruginosa'*nın virülans özellikleri, çeşitli konakçılarda enfeksiyon veya hastalık oluşturmasına izin verir. Akut enfekte suşlar hareketlidir ve virülans faktörüne sahiptir, ayrıca doku invazyonu, nekroz ve epitelyal tutunma için etkilidir (Moradali *et al.* 2017). Durağan (sesil), biyofilm oluşturan ve aljinat üreten, kronik olarak enfekte edici suşlardır. (Laventie *et al.* 2019). Virülans faktörleri şöyledir:

1. **Proteazlar:** *P. aeruginosa*, konakçı hücrelere zarar veren ve bağışıklıktan kurtulmaya yardımcı olan çeşitli proteazlar üretir. Proteaz IV ve *P. aeruginosa* küçük proteazının (PASP) çeşitli klinik kaynaklardan elde edilen çeşitli izolatların genomlarında mevcut olduğu ve yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir. PASP, ayrıca keratit ile ilişkili bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır (Caballero *et al.* 2004, Hilliam *et al.* 2020). Proteazlar, yanık ve septisemi (Greenwood *et al.* 2012) bakterilerinin enfeksiyonunda çok önemli bir rol oynamaktadırlar çünkü bu proteazlar kompleman faktörlerini, müsinleri parçalama ve epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılara zarar verme yeteneğine sahiptir ve bunların tümü patojenin yayılmasına katkıda bulunmaktadır (Voynow *et al.* 2009). Elastaz LasB tipi metaloproteazlar olarak *P. aeruginosa* tarafından üretilen çok sayıda proteaz, konakçı dokuyu bozar ve dolayısıyla hem akut akciğer enfeksiyonlarında hem de yanık yarası enfeksiyonlarında rol oynamaktadır (Rocha *et al.* 2019).

2. **Hücre dışı toksinler:** Septisemi ve yanık enfeksiyonlarının gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (Greenwood *et al.* 2012). ExoA, tip II salgılama sisteminin (T2SS) birincil efektör toksinidir ve (Adenozin difosfat) ADP ribozilasyonu yoluyla protein sentezine müdahale etmek için *P. aeruginosa* tarafından üretilen ve *P. aeruginosa* enfeksiyonu sırasında konakçı hücre ölümüyle sonuçlanan en öldürücü toksin olarak kabul edilmektedir. (Michalska and Wolf 2015, Terra and Salvador 2020). Hücre dışı ekzotoksin A, konakçı hücrenin uzama faktörü 2 aktivitesini inhibe ederek, konakçı hücreyi protein sentezi ve nekrotizan yapamaz hale getirmektedir (Rehman 2020).

3. **Pigmentler:** Piyoverdin ve piyokelin, sideroforların kullanımı dahil olmak üzere çeşitli şekillerde demiri parçalamaktadır (Kaplan *et al.* 2021). Piyokelin (PCH) düşük afiniteli bir siderofora ve daha enerji yoğun, yüksek afiniteli bir moleküle sahipken, piyoverdin (PVD) yüksek afiniteli bir siderofora ve daha az enerji gerektiren yüksek afiniteli bir moleküle sahiptir (David *et al.* 2020). Piyoverdin ve piyokelin bakteri metabolizmasını ve gelişimini desteklemekte, böylece *P. aeruginosa* biyofilm üretimini hızlandırmaktadır. Ayrıca insan ferritinin bozulmasına da yardımcı olmakta böylece konakçıda patojeniteyi teşvik etmektedir (Das *et al.* 2020). Piyoverdin ayrıca, her ikisi de hücre dışı virülans faktörleri olan proteaz PrpL ve eksotoksin A'yı aktive eden bir sinyal partikülüdür (Cornelis 2010). Piyosiyanin; bol miktarda üretilen ve *P.aeruginosa* suşlarının yaklaşık %95'i tarafından salınan önemli bir virülans faktörüdür (Price-Whelan *et al.* 2006). Fenazinden üretilen bu mavi-yeşil pigment, kronik olarak *P. aeruginosa* ile enfekte olan kistik fibroz (CF) hastalarının balgamına yeşilimsi bir renk vermektedir (Lau *et al.* 2004). Ek olarak, piyosiyanin, çeşitli fizyolojik aktivitelerde yer alan yüksek oranda yayılabilir bir redoks aktif sekonder metabolittir (Lau *et al.* 2004, Hall *et al.* 2016).

4. **Yapışma:** *P. aeruginosa* polistiren, paslanmaz çelik ve polikarbonat dahil olmak üzere çeşitli yüzeylere iyi yapışmaktadır (Amzil *et al.* 2020). İlgili moleküllerin aracılık ettiği hücre yapışması, ayrıca iltihaplanma, enfeksiyon ve bağışıklık ile de ilişkilidir (Meng *et al.* 2020). Flagella ve tip 4 pili, konak epitel hücrelerine yapışmadan sorumludur ve bağırsak epitel hücrelerinin istilası gibi bir inflamatuar yanıt efektörünü tetikleyebilmektedir (Brooks *et al.* 2007). Flagellum, T4P ve diğer adezinler, antibiyotiklere, dezenfektanlara ve insan bağışıklık tepkisine karşı büyük dirençleri nedeniyle önemli terapötik zorluklar oluşturan sağlam *P.aeruginosa* biyofilmlerinin üretiminde kritik bir rol oynamaktadır (Lee and Yoon 2017, Yan and Wu 2019)

5. **Lipopolisakkarit (LPS):** Dış zarın dış yaprağının (OM) birincil yapısal bileşeni ve koruyucu özelliğidir. Lipid A'nın endotoksik özelliklerinin bir sonucu olarak doku hasarını indükler, konak alıcılarla etkileşimlere aracılık eder ve konak hücre

bağlanmasında dolaylı bir rolü olabilmektedir (King *et al.* 2009). Ek olarak, antibiyotik direnci ve dış membran vezikülleri (OMV'ler) ve biyofilmlerin üretimi üzerinde etkisi vardır (Huszczynski *et al.* 2020). Dış membran OM; beslenme değişimi, antibiyotik direnci ve yapışma dahil olmak üzere çeşitli işlevler yapan çeşitli proteinleri (OMP'ler) içerir, ancak bunların çoğu keşfedilmemiştir (Chevalier *et al.* 2017). Lipopolisakkarit, konağın doğuştan gelen ve adaptif (veya edinilmiş) immün yanıtlarının aktivasyonunda yer alır ve sonuçta morbidite ve mortaliteye katkıda bulunan düzensiz inflamasyonla sonuçlanmaktadır (Rocha *et al.* 2019).

6. **Aljinat:** Aljinat, biyofilmlere katkıda bulunur, bakteri temizlenmesini engellemekte, kronik ve yüksek dirençli enfeksiyonların oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Lee and Yoon 2017). Aljinat, 1-4 bağlantılı D-mannuronik asit (poli-M) ve L-guluronik asitin asetillenmiş rastgele bir kopolimeri olan aljinattan oluşan bir mukoid ekzopolisakkarit kapsülü oluşturma yeteneğine sahiptir (Pier *et al.* 2001). Aljinat, kistik fibroz hastalarında aşırı üretilir, hastanın akciğerlerini de tıkayabilir. Bu enfeksiyonları ortadan kaldırmak son derece zordur ve neredeyse genellikle hastanın ölümüyle sonuçlanmaktadır (Li *et al.* 2005).

7. **Çekirdek algılama:** Çekirdek algılama, yayılabilir kimyasal moleküllerin aracılık ettiği bir bakteriyel "hücreden hücreye" iletişim mekanizmasıdır. (Pearson *et al.* 2001).

2.8 MvaT Geni

MvaT homologları yalnızca gama-Proteobakterilerde, çoğunlukla *pseudomonad*larda bulunmaktadır ve her *pseudomonad* en az bir MvaT homologu içermektedir (Shintani *et al.* 2015). MvaT'nin, *P. aeruginosa* için çekirdek algılama, virülans, biyofilm oluşumu ve çoklu ilaç direnci ile ilgili çok sayıda genin (en az 150 gen) ekspresyonunu düzenleyen (bastıran) bir regülatör olduğu keşfedilmiştir (Diggle *et al.* 2002, Valet-Gely *et al.* 2007). MvaT, MexEF-OprN pompasının ekspresyonunu engelleme yeteneğine de sahiptir (Westfall *et al.* 2006).

Enterobakterilerin H-NS ve StpA histon nükleoid yapılandırma genlerine benzer şekilde, *P. aeruginosa* da işlevleri çoğunlukla MvaT'ninkilerle örtüşen MvaU olarak adlandırılan ekstra bir MvaT homoloğu içermektedir (Castang and Dove 2012). MvaT ve MvaU, H-NS ve akrabalarında olduğu gibi AT bakımından zengin DNA bölgelerini homo- veya heterodimerler olarak spesifik olarak bağlayarak (Castang and Dove 2010) ve bitişik DNA dizilerini bağlayarak küresel baskılayıcılar olarak rol oynamaktadır (Winardhi *et al.* 2012), ayrıca uzun DNA aralıkları üzerinde oligomerler yaratmaktadır (Winardhi *et al.* 2012). MvaT ve MvaU, transkripsiyonu susturduğu bilinen H-NS'ye benzer bir şekilde RNA polimerazı tıkayarak (Dorman 2014), RNA polimerazın promotörlere bağlanmasını önleyerek (Schroder and Wagner 2000), veya RNA polimerazın duraklatılmasını ve transkripsiyonun bitmesini kolaylaştırarak (Kotlajich *et al.* 2015) çalışmaktadır.

Ancak, MvaT ve MvaU'nun transkripsiyonu küresel düzeyde düzenlemeye etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, hedef genleri susturmak için yüksek dereceli oligomerizasyon gerekli gibi görünmektedir (Castang and Dove 2010).

MvaT ve MvaU, *P. aeruginosa* referans suşu *PAO1*'deki profaj genlerini susturarak, Pf4 fajının aktivasyonunu ve yıkımını inhibe etmektedir. *PAO1*, bu kritik işlev nedeniyle MvaT veya MvaU'nun silinmesini tolere edebilir, ancak her ikisini birden yapamaz (Castang and Dove 2012). Doğrudan MvaT ve MvaU, sırasıyla 394 ve 311 geni kodlayan 100'den fazla lokusa bağlanır. Bunlar, MvaT ve MvaU bağlanması açısından büyük ölçüde örtüşen AT açısından zengin sitelerdir (Castang *et al.* 2008). Tip III salgılama sisteminin (T3SS) birincil düzenleyici yeri, hem MvaT hem de MvaU tarafından bağlanan bir bölgedir (Castang *et al.* 2008). T3SS, efektör proteinleri ökaryotik konak hücrenin sitoplazmasına yerleştirmek için çalışan çok çeşitli Gram-negatif bakterilerde bulunan moleküler bir makinedir. *P. aeruginosa*'nın T3SS'si, konak hücre sinyalleşmesini bozan eksotoksinleri (ExoS, ExoT, ExoU ve/veya ExoY) taşır ve sitotoksisiteye yol açmaktadır (Hauser 2009).

2.9 Cup Genleri

Cup sistemleri, *P.aeruginosa PAO1'*de bulunan ve farklı organizasyonel ve fonksiyonel özellikler sergileyen en az dört tipten (CupA, B, C ve E) oluşmaktadır (Giraud *et al.* 2011). Cup fimbria, özellikle hücre-hücre etkileşimi ve mikrokoloni oluşumu için biyofilm büyümesinin ilk aşamaları için çok önemlidir (Kulasekara *et al.* 2005). MvaT CupA'yı (şaperon- eşlikçi yolları) düzenlemektedir (Vallet *et al.* 2004). Cup yolu, pili alt birimlerinin birçok Gram-negatif bakteri yüzeyinde pili (fimbria) halinde birleştirilmesi için gerekli bileşenler için adlandırılmaktadır. Bunu takiben şaperon-pili kompleksi, dış zarda bir gözenek oluşturan usher proteinine taşınmaktadır. Usher, pilinin alt birimlerinin şaperondan salınmasını ve dış zar geçişi sırasında fibrillere birleştirilmesini kolaylaştırmaktadır (Vallet *et al.* 2004). Şaperon-eşlikçi fimbria genleri, en az bir fimbrial protein bileşenini, uygun katlanmayı sağlayan bir şaperon proteinini ve fimbrial-şaperon kompleksinin salgılanmasını ve birleştirilmesini kolaylaştıran bir haberci proteini kodlayan çok genli operonlarda bulunmaktadır (Jones *et al.* 1992). *P. aeruginosa* suşları, en çok çalışılanı CupA genleri olan en fazla beş Cup gen kümesini kodlamaktadır (Giraud *et al.* 2011).

Bir dış zar OM, CupB gen kümesi tarafından kodlanan hem fimbrial alt birim düzeneğinde hem de tip Vb substrat salgılanmasında rol oynayan mozaik proteinden oluşmaktadır. İki ortaklı salgı (TPS) ailesinden P-Usher (CupB3) olarak adlandırılmıştır. (Ruer et al. 2008), CupB2 ve CupB4 iki şaperondur; CupB1 tipik bir fimbrial alt birimdir, CupB6 bir yapıştırıcıdır ve CupB7 bir TPS substratıdır (CupB5). Biyofilm olgunlaşma aşamasında, CupB ve CupC sistemleri hücre-hücre etkileşimlerinde ve mikrokoloni üretiminde iş birliği yapmaktadır (Kulasekara *et al.* 2005). CupB ve CupC lokusları birbirinden bağımsız olarak yapılandırılmıştır. Her ikisi de düzenleyici özellikleri paylaşmaktadır. CupB ve CupC transkript seviyeleri, ikinci histon benzeri nükleoid protein MvaU'nun varlığından bağımsız olarak, MvaT mutantında vahşi tipten biraz daha yüksektir (Vallet *et al.* 2004). MvaT, bu lokusların her ikisini de bastırır ve bunun bir transkripsiyon düzenleyici olduğu anlamına gelmektedir. Ancak, MvaT'nin yokluğunda CupB1 veya CupC1 üretimi görülmemektedir (Giraud and de Bentzmann 2012). CupB ve CupC, Roc (Cup

genlerinin düzenleyicisi) sistemlerini içeren karmaşık bir fosforlu ağ tarafından düzenlenmektedir (Kulasekara *et al.* 2005).

2.10 RpoD (σ^{70}) Geni

P. aeruginosa, housekeeping genlerinin ekspresyonunu kontrol eden çok sayıda promotör içeren rpoD adı verilen bir ana σ^{70}'e sahiptir. RpoD, *E. coli* rpoD σ^{70} ile yüksek derecede benzerlik paylaşmakta, bu da benzer roller üstlendiklerini göstermektedir; *P. aeruginosa* rpoD σ^{70}, *E. coli* rpoD'de sıcaklığa duyarlı bir mutasyonu tamamlayabilmektedir (Tanaka and Takahashi 1991). RpoD'ye bağlı transkripsiyonun çoğu, büyümenin üstel fazı sırasında meydana gelmektedir (Fujita *et al.* 1994). RpoD gen transkripsiyonu iki promotör tarafından düzenlenmektedir: PC ve PHS. PC rpoD mRNA sentezi, hem sabit durum hem de ısı şoku büyüme koşulları altında yapıcı iken, PHS mRNA sentezi ısı şoku ile geçici olarak uyarılmaktadır (Aramaki and Fujita 1999). *P. aeruginosa'*nın ana sigma 70 faktörünü kodlayan rpoD genidir (Aramaki and Fujita 1999).

RpoD geni, RNA polimeraz sigma 70 faktörünü kodlamaktadır. Genom boyunca eşit olarak dağılmış çok sayıda polimorfik bölge (%70,4) içerir, bu nedenle *Pseudomonas* türlerinin filogenetik ve taksonomik analizi için çok uygun bir bölgedir (Mulet *et al.* 2010). RNA polimeraz (RNAP), bakterilerde transkripsiyonu yöneten çok alt birimli bir enzimdir. RNA polimerizasyonu için katalitik aktiviteye sahip bir çekirdek fraksiyondan ve promotör tanıma ve transkripsiyon başlangıcından sorumlu olan ayrılabilir bir sigma faktöründen (faktörlerinden) oluşmaktadır. Şimdiye kadar incelenen hemen hemen tüm bakterilerde çok sayıda sigma faktör alt birimi bulunmaktadır (Gruber and Gross 2003).

Cins içi türleri tanımlamak için kullanılan tek kopyalı bir gen, çeşitliliğin ve filogenetik ilişkilerin tam olarak değerlendirilmesini sağladığı için mikrobiyal ekolojide ileriye doğru önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. Tüm taksonomik seviyelerde, rpoD, üstün çözünürlük verdiği yakından ilişkili organizmalar (türler ve alt tür seviyeleri) dışında, 16S rRNA genine karşılaştırılabilir filogenetik çözünürlük sağlamaktadır (Case

et al. 2007). Bu, rpoD gibi tek kopya protein kodlayan genlerin 16S rRNA geni tarafından sağlanan bilgileri tamamlayabildiği alt tür çeşitliliğini inceleyen artan sayıda çalışma ışığında önemlidir (Rajwar and Sahgal 2016).

Sonuçlar, rpoD'nin ekolojik bir işaretleyici olarak ek önemli özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır çünkü (a) tüm prokaryotlarda her yerde bulunur; (b) çok çeşitli özelliklere sahip probların ve primerlerin yapımına izin vererek yavaş ve hızlı gelişen alanlara sahiptir; (c) bazı lateral gen transferine karşı daha direnç sağlar; (d) nükleotdid dizisi hizalandığında zor bölümleri çıkardıktan sonra bile filogenetik bilgiyi muhafaza etmek için yeterince büyük bir boyuta sahiptir (Rajwar and Sahgal 2016).

2.11 Antimikrobiyal Direnç

P. aeruginosa klinik suşları, onlardan kaçma veya direnç oluşturma yeteneklerinden dolayı şu anda mevcut olan tüm antibiyotiklere aşamalı olarak dirençli hale gelmektedir (Del Barrio-Tofio *et al.* 2019). DSÖ yakın zamanda *P. aeruginosa*'yı ek araştırma finansmanına ve yeni tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyan öncelikli bir patojen olarak belirlemiştir (Tacconelli *et al.* 2018). Hastalık Kontrol Merkezi'ne göre, dünya, bakteriyel enfeksiyonlardan ölüm oranlarının kanserden ölüm oranlarını geçeceği (Li and Webster 2018) ve yeni ilaçların geliştirilmesini gerektiren bir "antibiyotik sonrası çağa" girmenin eşiğindedir.

*P.aeruginosa'*nın direnç geliştirmesinin 2 yolu vardır: birincisi mutasyonlar, ikincisi de yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin edinilmesiyle sonuçlanan hareketli genetik elementler (plazmitler) ile yoluyla kromozomal genlerin işlevini ve ekspresyonunu değiştirir ve (Lister *et al.* 2009). Bir patojen birden fazla ilaca dirençli olduğunda, 'çoklu ilaç dirençli'terimi kullanılmaktadır (Fisher and Mobashery 2010). Bakteriler, aşağıda tartışıldığı gibi, antimikrobiyal ajanlara direnmek için çeşitli yollar kullanabilir. Biyokimyasal yollar şunları içerir:

1. Antibiyotik inaktivasyonu: *P. aeruginosa*, SPICE bakteri grubunun bir üyesidir (*Serratia spp*., *P. aeruginosa*, Indole pozitif *Proteus*, *Citrobacter spp*., *Enterobacter*

spp.). Bu mikropların hepsinin ortak bir yanı vardır: o da kromozomal olarak kodlanmış ve indüklenebilir AmpC beta-laktamaz oluşturma yeteneğidir. Bunlar beta-laktam antibiyotiklerin çoğunu hidrolize eden ve beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen sefalosporinazlar, *P. aeruginosa* tarafından üretilen bir D sınıfı oksasilinaz olan PoxB ve başka bir endojen beta-laktamazdır (Kong *et al.* 2005). Bakteriler, antibiyotikleri azaltmak veya oksitlemek için nadiren redoks işlemleri kullandılar; bir örnek, tetrasiklin antibiyotiklerinin TetX enzimi tarafından oksidasyonudur (Yang *et al.* 2004).

2. Hedef grubun bypass edilmesi (grup transferi ile antibiyotiklerin inaktive edilmesi): Transferazlar, antibiyotikleri (aminoglikozitler, streptogramin, kloramfenikol, rifampisin veya makrolidler) kimyasal değişim yoluyla (periferik olarak, antibiyotik molekülüne fosforil adenilil veya asetil grupları eklenmiştir) inaktive eden en dirençli enzimlerdir. Modifiye edilmiş antibiyotiklerin hedef için düşük bir afinitesi vardır (Shaikh *et al.* 2015).

3. Hedef modifikasyonu ile antibiyotiklere direnç: Antibiyotik hedefinin modifikasyon bölgesi, antibiyotiğin düzgün bağlanma yeteneğini kaybetmesine neden olan ikinci direnç yoludur; yine de, hedefte mutasyonlar meydana geldiğinde, inhibisyona karşı duyarlılığın azalmasına yol açmaktadır (Spratt 1994).

Genetik yönler şöyledir:

1. Mutasyonlarla antibiyotik direnci: Mutasyonlar antibiyotik alımının azalmasına, ilaç hedeflerinin değişmesine ve akış pompalarının ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin aşırı ekspresyonuna yol açabilmekte ve bu faktörler, antimikrobiyal bileşiklerin varlığında bakterilerin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (Munita and Arias 2016), (örneğin, *P.aeruginosa*'da OprD porin ekspresyonunun olmaması veya azalması, hücre duvarının karbapenemlere geçirgenliğini azaltır, bu da karbapenemlere karşı yüksek düzeyde dirence yol açar) (Li *et al.* 2012). Efflux genleri, tipik olarak bir lokal baskılayıcıda, bir global transkripsiyon faktöründe, promotör bölgelerinde veya intergenik alanlarda meydana gelen, düzenleyici ağlarındaki mutasyonların neden olduğu şeyi aşırı derecede eksprese etmektedir. Örneğin, MexAB-OprM çoklu ilaç akış

sistemlerinin aşırı ekspresyonu, mutasyonlar ve gen kopyalama mekanizmaları yoluyla bazı *P. aeruginosa* izolatlarında karbenisilin antibiyotiklerine direnç kazandırmaktadır (Nicoloff *et al.* 2006).

2. Yatay gen transferi ile antibiyotiklere direnç: Dirençli genler, transformasyon, konjugasyon veya transdüksiyon dahil olmak üzere çeşitli proseslerle iletilebilir. Son 15 yılda, β-laktamaz enzimleri geniş bir aktivite spektrumu göstermektedir. Bir β -laktam alt kümesine karşı geniş spektrumlu bir beta-laktamaz (ESBL) olan antikorlar (Brooks *et al.* 2007), β-laktamaz enzimleri, β-laktam halkasını seçici olarak hidrolize ederek, artık bakteriyel transpeptidazları bloke edemeyen inaktive edilmiş bir ürünle sonuçlanmaktadır (Christaki *et al.* 2020). Sefalosporinleri içerir, ancak karbapenemazlar hariç, uzun süreli hastanede yatış, huzurevinde kalma, kateterizasyon, önceki antibiyotik tedavisi, yüksek riskli bölgelere seyahat ve karaciğer veya altta yatan böbrek patolojisi olan kişilerde enfeksiyon riski artmaktadır (Nordmann *et al.* 2011). MDR bakterilerinin klonal iletimi ve farklı bakteri türleri arasında yatay gen transferi (HGT) aracılı çoklu ilaç direncinin yayılması, antimikrobiyal direnç (AMR) gen genişlemesinin önemli yollarındandır (Partridge *et al.* 2018).

2.12 Antibiyotik Etkisi

Antibiyotik etkisine beş ana yol aracılık eder.

1. Hücre duvarı sentezine müdahale: Sefalosporin ve penisilin gibi beta-laktam antibiyotikler (Benton *et al.* 2007), peptidlerin peptidoglikan oluşturmak üzere çapraz bağlanmasından sorumlu transpeptidazı asilleyerek, peptidoglikan oluşumundaki son adım bastırılabilmektedir. Penisilin bağlayıcı proteinler, beta-laktam antibiyotiklerin (PBP'ler) hedefleridir. Bu bağlanma, terminal transpeptidasyon sürecini bozar ve ayrıca hücre içindeki otolitik mekanizmalar yoluyla bakteri hücresinin canlılığının ve lizisinin kaybıyla sonuçlanmaktadır (Eckburg *et al.* 2019).

2. Protein sentezinin inhibisyonu: Oksiazolidinonlar gibi bazı antibiyotikler, 50S (peptidil-transferaz merkezi) PTC A-sitesine bağlanmakta ve böylece protein sentezini

inhibe ederek, gelen aminoasil-tRNA'ların verimsiz bağlanma-ayrışma döngülerine neden olmaktadır (Marks *et al.* 2016, Choi *et al.* 2020). Dahası, streptomisin veya gentamisin gibi aminoglikozitlerin (AG'ler) yanı sıra tetrasiklinlerin protein üretimi ile örtüşen 30S alt biriminin 16S ribozomal RNA'sına (Krause *et al.* 2016) bağlanır (Goljan 2011). Makrolidler, ribozomun 50S alt birimine bağlanarak polipeptit zincir uzamasını bastırırken, kloramfenikol ribozomun 50S alt birimine bağlanarak peptidil transferaz adımını inhibe etmeye yol açar (Leach *et al.* 2007, Anandabaskar 2021).

3. DNA sentezine müdahale: Kinolon antibiyotikler (nalidiksik asit, siprofloksasin vb.) iki önemli tip II topoizomerazın; DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün aktivitesini inhibe ederek DNA sentezini engeller ve böylece bakteri kromozomunu parçalar (Evans-Roberts *et al.* 2016) .

4. Metabolik bir yolun baskılanması: Trimetoprim ve sülfonamidler folik asit üretimini engellemektedir (Yoneyama and Katsumata 2006), nükleotidlerin üretiminde bir kofaktör olarak görev yapmakta dolayısıyla DNA ve RNA sentezini engellemektedir (Strohl 1997).

5. Hücre zarının düzensizliği: Bazı antibiyotikler, inhibitör etkileri yoluyla sitoplazmik membran geçirgenliğini arttırmakta, bu da bakteri içeriğinin kaybolmasına ve hücre lizisine neden olmaktadır (Sabnis *et al.* 2021).

2.13 *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi

P. aeruginosa enfeksiyonlarının şiddeti erken teşhis ile azaltılabilmektedir. Birçok *P. aeruginosa* izolatı çok çeşitli antibiyotiklere dirençli olduğundan ve kesin olmayan tedaviyi takiben ek direnç geliştirebildiğinden, ampirik olarak bir antibiyotik seçmek yerine hastalara ilaç vermeden önce laboratuvar duyarlılıkları yapılmalıdır. Karbapenemler, MDR bakterilerinin neden olduğu tehlikeli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Thomson and Bonomo 2005). Dünya çapındaki *P. aeruginosa* izolatlarının %90'ından fazlasının kolistin, seftazidime-avibaktam ve seftolozan-tazobaktama duyarlı olduğu belirtilmiştir (Evans *et al.* 2019). Uygun duyarlılık testinin

ardından bir kombinasyon tedavisi yapılmaktadır ve bu bakterilerin MDR suşlarının tedavisinde en iyi sonuçları verdiği görülmektedir (Dougherty and Pucci 2012).

***P. aeruginosa*'ya karşı etkili olabilecek antibiyotikler arasında şunlar bulunmaktadır:**

• Aminoglikozitler (gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin)

• Karbapenemler (imipenem, meropenem)

• Sefalosporinler (seftazidim, sefepim)

• β-laktamaz inhibitörleri (BLI) ile penisilin (klavulanik asit veya tazobaktam ile kombinasyon halinde tikarsilin ve piperasilin)

• Monobaktamlar (aztreonam)

• Florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin)

• Fosfomisin ve polimiksinler (kolistin, polimiksin B) (El Zowalaty *et al.* 2015).

Florokinolonlar, *Pseudomonas aeruginosa'*ya karşı oldukça etkilidir ve direnç suşlarının evrimini önlemek için kullanımı kesinlikle sınırlıdır (Hachem *et al.* 2007, Brar *et al.* 2020). Kolistin veya gentamisin, enfeksiyon görünür ve sınırlı olduğunda lokal olarak kullanılabilmektedir (kulak enfeksiyonlarında olduğu gibi) (Hachem *et al.* 2007). Antimikrobiyal direnç, yeni beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının (seftolozan/tazobaktam, seftazidim/avibaktam, meropenem/vaborbaktam, imipenem/silastatin/rebebaktam, aztreonam/avibaktam), sideroforan sefalokon ortaya çıkmasıyla ilgili endişeleri artırmaktadır. Sefiderokol ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde karmaşık enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan siderofor-konjuge monobaktamlar da keşfedilmiştir (Leone *et al.* 2019).

İmipenem:1980 yılında Burton Christensen, Kenneth Wildonger ve William Leanza tarafından keşfedilen bir β-laktam antibiyotiktir. Karbapenem antimikrobiyal sınıfının ilk nesli, birçok Gram-negatif tür bakteri tarafından üretilen β-laktamazların üstesinden gelebilir, diğer antimikrobiyallerle tedavisi zor olan enfeksiyonlar üzerinde kritik bir

etkiye sahiptir (Clissold *et al.* 1987). *P. aeruginosa* ve diğer *Enterococcus* türlerine karşı özellikle yararlıdır, ancak MRSA'ya karşı etkili değildir; bununla birlikte, imipenem çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarlarının oluşumunu engellemektedir (Vardakas *et al.* 2012). Ek olarak, karbapenem dirençli ve çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için iyi konumlandırılmış bir imipenem/rebebaktam kombinasyonudur (Barnes *et al.* 2018). İki büyük sürveyans çalışması, relebaktamın imipenem dirençli *P. aeruginosa*'nın %74 ila %78'inde imipenem duyarlılığını geri kazandırdığını göstermiştir (Karlowsky *et al.* 2019).

Piperasilin: Piperasilin, β-laktam üreidopenisilin sınıfının bir üyesidir (Tan and File 1995). Ureidopenisilinler (piperacillin) polar bir yan zinciri birleştirmektedir. Bu zincir, Gram-negatif bakterilere geçişi kolaylaştırır ve beta laktamaz enzimleri tarafından bozulmaya karşı duyarlılığı azaltmaktadır. Piperasilin özellikleri, önemli nozokomiyal patojen *P. aeruginosa*'ya karşı piperasilin aktivitesi sağlamaktadır (Hauser 2013). Piperasilin, duyarlı olduğu beta laktamazların sayısını inhibe ederek piperasilin etkinliğini artıran (piperasilin/tazobaktam) oluşturmak üzere tazobaktam (bir beta-laktamaz inhibitörü) ile birleştirilmektedir. Piperasilin, oral yoldan emilmediği için intramüsküler veya intravenöz olarak uygulanmaktadır (Zhanel *et al.* 2008).

Augmentin: Augmentin, amoksisilin ve klavulanat potasyum (bir β-laktamaz inhibitörü) içeren bir penisilin antibiyotiktir. Amoksisilin, temel penisilinden elde edilmektedir; klavulanat potasyum, klavulanik asidin bir tuzudur. Penisilin ile aynıdır; Penisilinlere ve sefalosporinlere sıklıkla dirençli bakterileri tedavi etmek için kullanılan klavulanat potasyumdur. Augmentin, 1979'da Birleşik Krallık'taki bilim adamları tarafından icat edilmiştir (Rolinson 1982). Augmentin, tipik olarak sinüzit, kulak enfeksiyonları, zatürre, idrar yolu enfeksiyonları, bronşit ve cilt enfeksiyonları dahil olmak üzere çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır ve ağızdan alınmaktadır (Gillies 2015).

Tikarsilin+Klavulanik Asit: Tikarsilin/klavulanik asit, β-laktam antibiyotik tikarsilin ve β-laktamaz inhibitörü klavulanik asitten oluşan bir kombinasyon antibiyotiktir. Bu

kombinasyon antibiyotik, spesifik β-laktamazlar üreten tikarsilin dirençli bakterilere karşı geniş bir aktivite ve onarım etkisi spektrumuna sahiptir (Zimmerman 1999).

Tikarsilin, beta-laktam antibiyotiğe ait Timentin'i yapmak için neredeyse yalnızca klavulanat ile birlikte kullanılan bir karboksipenisilin antibiyotiktir. Gram-negatif bakterileri, özellikle *P. aeruginosa*'yı tedavi etmek için intravenöz olarak kullanılmaktadır (Petri *et al.* 2011). Tikarsilin, hücre duvarının üretimi sırasında (bakteri bölünmesi sırasında) peptidoglikan çapraz bağlanmasını inhibe ederek hücre ölümüyle sonuçlanır. Aynı zamanda, β-laktamazlar tarafından parçalanan ve antibiyotiğin deaktivasyonu ile sonuçlanan bir β-laktam halkasına sahip olmaktadır.

Tikarsilin bazı kişilerde penisilin alerjisine neden olabileceğinden, tek başına kullanıldığında antibiyotik olmayan klavulanik asit (bir beta-laktamaz inhibitörü) ile de kombine edilmektedir (Moseley *et al.* 2013). Klavulanik asit, *Streptomyces clavuligerus* fermantasyonundan elde edilmektedir. Beta-laktamazın aktif bölgesindeki bir serine bağlanan ve aktif bölgedeki başka bir amino aside saldırabilen, her zaman enzimi olduğu kadar onu da inaktive edebilen çok daha reaktif türler üreten bir inhibitördür (Petri *et al.* 2011).

Levofloksasin: Levofloksasin (Levaquin), Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumu olan antibakteriyel bir florokinolondur (Gerald *et al.* 2011). Tüm kinolonlarda olduğu gibi, levofloksasin iki tip topoizomeraz enzimini, topoizomeraz IV ve DNA girazı bloke ederek bakteri gelişimini azaltmaktadır, bu nedenle her iki etki şekliyle de bakterisit görevi görmektedir (Brooks *et al.* 2007). 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için ve ayrıca menenjit ve tüberkülozu tedavi etmek için diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanım için bir ilaç olarak onaylanmıştır. Sonuç olarak, intravenöz veya oral olarak mevcuttur (Croom and Goa 2003).

Siprofloksasin: Siprofloksasin 1987 yılında keşfedilen bir florokinolon antimikrobiyal ajandır. Siprofloksasin; kemik ve eklem enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, tifo ateşi ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli

bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Damardan veya ağızdan alınabilir (Hamilton 2014). Siprofloksasin, tipik olarak patojenin ölümüyle sonuçlanan geniş bir aktivite spektrumuna sahip ikinci nesil bir florokinolondur (Corrao *et al.* 2006). Bakteriyel DNA ayrımı için gerekli olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek hücre bölünmesini baskılamaktadır (Pommier *et al.* 2010).

Kolistin: Polimiksin E olarak da bilinen Kolistin, pnömoni de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli Gram-negatif enfeksiyonlar için son çare olarak kullanılan bir antibiyotiktir (Pogue *et al.* 2017). Bu enfeksiyonlara antibiyotiğe dirençli bakteriler neden olabilir. Damar içi veya kas içi yolla uygulanmaktadır (Bialvaei and Samadi 2015). Kolistin, ilk olarak 1949'da Japonya'da tanımlanan ve polimiksin E olarak da bilinen bazı *Paenibacillus polymyxa* suşları tarafından üretilen bir antibiyotiktir. Kolistin A ve B'nin bir kombinasyonudur ve bir polipeptit antibiyotik sınıfı olan bir polimiksin olarak sınıflandırılmaktadır (Falagas and 2008).

Kolistine karşı ilk direnç geninin, bakteri suşları arasında aktarılabilen bir plazmitte yer aldığı 2016 yılında keşfedilmiştir (Lui *et al.* 2016). Mcr-1 geni Çin, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki plazmitlerden geri kazanılmıştır (Patrick *et al.* 2016). Kolistin, bakteri dış zarında (Gram-negatif bakteriler) bulunan fosfolipidlere ve lipopolisakkaritlere bağlanarak etki etmektedir. Kolistin çok önemli bir bileşenidir, çünkü lipid membranlardaki fosfat gruplarından iki değerlikli katyonları rekabetçi bir şekilde uzaklaştırmaktadır, bu da bakteriyel dış membran karışıklığına, hücre içi içerik penetrasyonuna ve son olarak bakteriyel ölüme neden olmaktadır (Li *et al.* 2001). Kolistinin lipopolisakkariti (LPS) bağladığı ve nötralize ettiği ve merkezi sinir sisteminde endotoksinin patofizyolojik etkilerini engellediği gösterilmiştir (Giacometti *et al.* 2003).

Gentamisin: Gentamisin, 1963 yılında *Micromonospor purpurea* bakterisinden keşfedilen bir aminoglikozit antibiyotiktir (Bartlett and Janaat 2013). Endokardit, kemik enfeksiyonları, pelvik inflamatuar hastalık, pnömoni, menenjit, sepsis ve idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisi için reçete edilmektedir,

ancak ne yazık ki klamidya veya bel soğukluğuna karşı etkili değildir. Damardan, topikal veya kas içinden uygulanmaktadır (Bartlett and Janaat 2013).

Gentamisin'in aktivasyon mekanizması aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmektedir:

1. Protein sentezini önlemek ve dolayısıyla bakteri ölümüne neden olmak; bakterilerin 30S ribozomal alt biriminin "bağlanması" olarak adlandırılmaktadır (Goljan 2011).
2. Başlatma kompleksinin normal peptit üretim aktivitesinin inhibitörü olarak hareket etmek.
3. Ribozomun tanıma alanında mRNA mesajının yanlış okunması, yanlış bir amino asit eklenmesi ve proteinin işlevsiz olması (Brooks *et al.* 2007).

Seftazidim: Bu üçüncü nesil sefalosporin antibiyotiklerinden biridir. Daha önceki nesillerde bulunmayan bir C=N-OCH3 grubuna sahiptir. Üçüncü nesil, hızla yayılan Gram-negatif basillerin beta-laktamazlarına karşı stabilite sağlamaktadır (Brooks *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2013). Damardan uygulanmaktadır (Richards and Brogden 1985). Bakteriyel enzimler, ilacın beta-laktam kimyasal halkasını kırarak önceki nesil sefalosporinleri hızla bozmakta ve antibiyotik direncine neden olmaktadır. Bazı Gram-negatif bakteriler, üçüncü kuşak sefalosporinlerde yaygın kullanımları nedeniyle geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL'ler) olarak adlandırılmaktadır (Sharma *et al.* 2013). Seftazidim hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir; seftazidim, *Pseudomonas*'a karşı güçlüdür, ancak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* 'a karşı değildir (Richards and Brogden 1985).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları ve araçları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve araçlar

Ekipmanlar	**Şirket**	**Ülke**
Laminer kabin	Gallenkamp	İngiltere
Otoklav	Sakura	Japonya
Birleşik mikroskop	Olympus	Japonya
Soğutma santrifüjü	Eppendorf	Almanya
Tek kullanımlık Petri kapları	JRZ	Lübnan
Damıtıcı	Elga	İngiltere
Elektrik dengesi	Sartorius	Almanya
Ependorf tüpleri	BBL	ABD
Jel elektroforez aparatı	Amersham	İsveç
Karıştırıcı ile sıcak plaka	Heidolph	Almanya
İnkübatör	Mammert	Almanya
Mikro pipet	Eppendorf	Almanya
Mikroskop slaytları	Sail Brand	Çin
Fırın	Memmert	Almanya
Parafilm	BEMIS	ABD
Buzdolabı	Concord	Lübnan
Rotorgene6000 RT PCR	Qiagene	Almanya
Termal ısıl döngüleyici G-strom	G-strom	ABD
Tips	Promega	ABD
Transillüminatör (UV ışık kaynağı)	LKB	İsveç
Taşıma çubuğu	AFCO	Ürdün
Burgaç	Fanem	Brezilya
Su Banyosu	kottermann	Almanya

3.1.2 Kimyasallar ve solüsyonlar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	**Şirket**	**Ülke**
Agaroz	Promega	ABD
Baryum Klorür BaCl2.H2O, H2SO4	BDH	İngiltere
Etidyum Bromür	Promega	ABD
Gliserol	BDH	İngiltere
Hidrojen peroksit H2O2	BDH	İngiltere
İzopropanol	Riedel-DeHae	Almanya
N,N,N,N-Tetrametil-P-fenilendiaminodihiklorür	BDH	İngiltere
Tris Borik asit (TBE)10X	Promega	ABD
Nalidiksik asit (15mg/ml)	Himedia	Hindistan
Tris- EDTA (TE) tamponu	Promega	ABD
DNA Merdiveni (50bp,100bp)	Promega	ABD

3.1.3 Kültürel medya

Bu çalışmada kullanılan kültürel medya Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültürel medya

Medya	**Şirket**	**Ülke**
Kanlı agar tabanı	Himedia	Hindistan
Beyin kalp infüzyon suyu	Himedia	Hindistan
Setrimid ağarı	Himedia	Hindistan
MacConkey ağarı	Oxoid	İngiltere
Mueller Hinton ağarı	Himedia	Hindistan
Besin agar ve et suyu	Himedia	Hindistan
Pseudomonas Kromojenik agar	Conda	İspanya
Pseudomonas izolasyon agarı	Himedia	Hindistan

3.1.4 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kitler

Kitler	**Şirket**	**Köken**
Gram boyama kiti	BDH	İngiltere
API20NE kitleri	Bio-Mérieux	Fransa
DNA ekstraksiyon Kiti	Transgen	Çin
PCR için 2x Eazy Taq® PCR SuperMix	Transgen	Çin
RNA Ekstraksiyon Kiti	Transgen	Çin
Tek Adımda gDNA Kaldırma ve cDNA Sentezi SuperMix	Transgen	Çin
Gen ekspresyonu için PerfectStart Green Real Time PCR SuperMix	Transgen	Çin

3.1.5 Primerler

Bu çalışmada dizileme için kullanılan primerler, dizileri ile birlikte Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Çalışmada dizileme için kullanılan primer dizileri

Primer	**Sıra (5′→3′ yönü)**	**Ürün boyutu (bp)**	**Referans**
Cup A geni			
İleri	AGCGATAGAGGTTGGTGTC	590bp	(Dr. Asmaa dizayn)
Geri	TTCGATGATCGCCTGTTG		
Cup B geni			
İleri	CCAACGTCGACCTGGGTATC	570 bp	(Llanes *et al.* 2011)
Geri	CCAGGAGGTAGCGAATACGG		
MvaT geni			
İleri	CGCGGTTTACTTACAGTTTCG	347 bp	(Dr. Asmaa dizayn)
Geri	AACGCTATTCGCTGGAGACT		

Tüm primerler ve problar Alpha DNA Şirketi (Kanada) tarafından üretilmiştir. Bu çalışmada gen ekspresyonu için kullanılan primerler dizileri ile birlikte Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada gen ekspresyonu için kullanılan primer dizileri

Primer	**Sıra (5′→3′ yönü)**	**Ürün boyutu (bp)**	**Referans**
RpoD-H.K.G geni			
İleri	ACAAGATCCGCAAGGTACTGAAG	156 bp	(Crabbé *et al.* 2008)
Geri	ATCGCCCAGGTGCGAAT		
Cup B geni			
İleri	CATCGCCTTCGATCAGGTCA	129 bp	(Dr. Asmaa dizayn)
Geri	GGGATCTTCGTGGTGTTGGT		
MvaT geni			
İleri	GATTGATCGCTTTCTACCGAC	150 bp	(Wagemans *et al.* 2015)
Geri	CATGAGGCCAGGACGTTGTTC		

3.1.6 Antimikrobiyal ajanlar

P. aeruginosa duyarlılık testi için Çizelge 3.7'de gösterilmiş olan 9 adet antimikrobiyal ajan tipi (Anonymous 2014) kullanılmıştır ve *P. aeruginosa*'nın inhibisyon zonu sonuçları incelenmiştir. R dirençli, I orta ve S duyarlıyı temsil etmektedir.

Çizelge 3.7 *P. aeruginosa* duyarlılık testi için kullanılan antimikrobiyal ajanlar

Antimikrobiyal ajan	**Sembol**	**Disk Konsantrasyonu (µg/ml)**	**Engelleme Bölgesi Çapı (mm)**		
			R	**I**	**S**
İmipenem	IMI	10	15	16-18	19
Siprofloksasin	CIP	5	15	16-20	21
Levofloksasin	LEV	5	13	14-16	17
Ticarsilin-Klavulanik asit	TIM	75/10	15	16-23	24
Gentamicin	GM	10	12	13-14	15
Kolistin	CO	25	10	-	11
Seftazidim	CAZ	30	17	18-20	21
Piprasilin	PR100	100	14	15-20	21
Augmentin	AUG	30	13	14-17	18

3.1.7 Solüsyonlar

3.1.7.1 Gram boyaması

Gram boyama kiti olarak iyot, kristal viyole, safranin ve %70 etanol kullanılmıştır.

3.1.7.2 Oksidaz reaktifi

0,1 g N,N,N,N-Tetrametil-fenilen-diamino dihidroklorür 10 mL distile suda çözülerek koyu renkli bir şişede tutularak oksidaz üretim testi için kullanılmıştır (Vandepitte *et al.* 2003).

3.1.7.3 Katalaz reaktifi

Bu reaktif %3 hidrojen peroksitten oluşacak şekilde hazırlanmıştır (Harley and Prescott 2002).

3.1.7.4 McFarland solüsyon

McFarland'ın standart çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

- Solüsyon A: 1g Baryum Klorür ($BaCl_2$) 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.
- Solüsyon B: 1 mL Sülfürik asit (H_2SO_4) eklenerek hazırlanmış ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

99,5 mL B çözeltisine, A çözeltisinden 0,5 mL eklenerek hazırlanan McFarland çözeltisi, kullanılana kadar koyu renkli şişede saklanmıştır.

- Bu çözelti, bir antimikrobiyal duyarlılık testi kullanmadan önce bakteri hücresi sayısını belirlemek ve bakterilerin API 20NE sistemi tarafından tanımlanması için kullanılan 1.5 *108 CFU/Ml içeren bakteri süspansiyonuna kıyasla bulanıklık verecek spesifik optik yoğunluğa sahiptir (Benson 2002).

3.1.8 Kültür medyasI

1. Basit medya:

Besin agarı: 1000 mL distile su içinde 28 g süspanse edilerek hazırlanmış, kaynatılıp (3.2.3.1'e göre) sterilize edilmiştir.

MacConkey agar: 1000 mL distile su içinde 51,5 g süspanse edilerek hazırlanmış, kaynatılmış ve (3.2.3.1'e göre) sterilize edilmiştir.

Mueller-Hinton agar: 1000 mL distile su içinde 38 g süspanse edilerek hazırlanmış, kaynatılmış ve (3.2.3.1'e göre) sterilize edilmiştir.

Beyin Kalp İnfüzyon suyu: 1000 mL distile su içinde 37 g süspanse edilerek hazırlanmış, kaynatılmış ve (3.2.3.1'e göre) sterilize edilmiştir.

Besin suyu: 1000 mL distile su içinde 13 g süspanse edilerek hazırlanmış, kaynatılmış ve (3.2.3.1'e göre) sterilize edilmiştir.

2. Bileşik medya:

Kanlı agar: İmalatçı firmanın (Himedia/Hindistan) önerilerine göre hazırlanmış, (3.2.3.1'de belirtilenlere göre) sterilize edilmiş, daha sonra 45-50°C'ye soğutulmuş ve kanlı agar bazına %5 taze insan kanı eklenerek hazırlanmıştır. Bu besiyeri, bakterilerin kanı hemolize etme yeteneğini ve ne tür bir hemoliz olduğunu test etmek için kullanılmıştır. Kanlı agarda *P. aeruginosa* için pozitif sonuç, tipik olarak mavi veya yeşil pigment ve metalik parlak görünüm ile beta hemoliz gözlemlenmiştir (Anderson *et al.* 2013).

Setrimid agar: İmalatçı firmanın (Himedia/Hindistan) önerilerine göre 10 mL gliserol içeren 1000 mL distile suya 46,7 gr ilave edilerek hazırlanmış, kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve (3.2.3.1'de belirtilenlere göre) sterilize edilmiştir. Daha sonra eşlik eden

floranın büyümesini engellemeye yardımcı olan nalidiksik asit (15 mg/L) eklenmiş, böylece *P. aeruginosa* dışındaki bakterileri inhibe etmek için ortama bir Setrimid (N-asetil N,N,N trimetil amonyum bromür) dahil edilmiştir, bu nedenle bu ortam aynı zamanda bir organizmanın floresein ve piyosiyanin üretme kabiliyetini belirlemek için kullanılmıştır. *P. aeruginosa* kolonileri pigmentli parlak yeşilimsi gözlemlenmiştir (UV ışığı altında da) (Kodaka *et al.* 2003).

Pseudomonas agarı: Bu besiyeri, 24,2 g pseudomonas agar bazının 100 mL'de çözülmesiyle imalatçı firmanın önerilerine göre hazırlanmıştır. 5 mL gliserol içeren 500 mL distile suyla tamamlanmış, daha sonra bileşen tamamen eriyene kadar ısıtılnış ve (3.2.3.1'de belirtilenlere göre) otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri *Pseudomonas* yetiştirme ve izolasyon için kullanılmıştır (Alfred 2005).

Kromojenik agar: 37 g besiyeri, önceden 80° C'ye ısıtılmış 1000 mL distile su içinde süspanse edilerek, daha sonra iyice karıştırılmış ve ısıtılıp eritilerek imalatçı firmanın önerilerine göre hazırlanmıştır. Çözünmeyi tamamlamak için dört dakika kaynatılmıştır. Aşırı ısınma ve otoklavlamadan kaçınılmış ve hazırlanan plaklar karanlık bir yere konulmuştur. *P. aeruginosa*, macenta koloni rengi ve besiyerinin açık yeşilden mavi-yeşile dönüşmesi nedeniyle kolaylıkla ayırt edilmiştir. Diğer bakteriler inhibe olmuş, büyürlerse renksiz koloniler (Conda) olarak görünmüşlerdir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Numune toplama

Eylül 2020'den Şubat 2021'e kadar AL-Yourmok Eğitim Hastanesi'ndeki (Bağdat/Irak) hastalardan yüz elli örnek toplanmış, ancak sadece yüz bir izolatta *P. aeruginosa* teşhisi yapılmıştır. Çizelge 3.8 gösterildiği gibi, örnekler arasında yanık sürüntüleri, yara sürüntüleri, idrar yolu enfeksiyonları, kulak sürüntüleri, göz sürüntüleri ve diyabetik ayak ülseri sürüntüleri yer almıştır.

Çizelge 3.8 Klinik kaynaklar ve izolat sayısı

Klinik yer	**Sayı**
Yanıklar	9
Diyabetik ayak ülserleri	30
Kulak temizleme bezleri	16
Göz sürüntüleri	14
İdrar	20
Yaralar	12
Toplam	101

3.2.2 Laboratuvar tanısı

3.2.2.1 Morfolojik inceleme

MacConkey Agar, Pseuedomonas Agar, Setrimid Agar, Kromojenik Agar ve Kanlı Agar üzerinde bakteri üremesinin morfolojik özelliklerine dayanan birincil tanı testleri; koloni şekli, dokusu, rengi, kokusu ve kenarları dahil olmak üzere incelenmiştir (Adhikari *et al.* 2010).

3.2.2.2 Mikroskobik inceleme

İzole edilen koloni mikroskobik bir slayta taşınmış, ardından sabitlenmiş ve Gram boyama ile boyanmıştır. Gram reaksiyonu, bakteri dizilimi ve hücre şekli gözlemlenmiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.2.2.3 Biyokimyasal testler

Oksidaz testi: Tek bir *P. aeruginosa* kolonisi, birkaç damla oksidaz reaktifi (N,N,N,N-tetra metil-p-fenilen-diamin dihidroklorür çözeltisi) ile bir parça nemlendirici filtre kağıdı üzerine tahta çubukla bulaştırılmıştır. 1-20 saniye içinde rengin koyu mora dönüşmesiyle pozitif sonuç elde edilmiştir. Oksidaz negatif bakterilerin koyu renk üretmediği tespit edilmiştir (Procop *et al.* 2016).

Katalaz testi: Katalaz enzim aktivitesinin tespiti için tek bir koloni bir mikroskop lamına aktarılmış ve bu koloniye bir damla %3 hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilmiştir. Gaz kabarcıklarının üretimi ile olumlu bir sonuç alınmıştır (Procop *et al.* 2016).

API 20NE kiti kullanılarak teşhis: *P. aeruginosa* tanımlaması, üretici firmanın prosedürüne bağlı olarak API 20NE sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bu sistem, tek bir koloninin saflaştırılması ile 20 biyokimyasal testin tespiti için tasarlanmıştır. API bakteriyel süspansiyon solüsyonu hazırlanmış ve bulanıklık 0,5 McFarland'a (1,5 x 108 CFU/mL) ayarlanmış, yirmi mikro tüp, 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra üretici talimatlarına göre steril bir Pasteur pipeti kullanılarak aşılanmış, tür düzeyinde hızlı bakteri tanımlaması, analitik profil indeksindeki (bioMerieux) Sayısal kodlamaya bağlı olarak yapılmıştır.

3.2.3 Sterilizasyon yöntemleri

Sterilizasyon yöntemleri literatürde (Quinn *et al.* 2004) belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.3.1 Otoklavlama

Kültür ortamı, 15 Ib/In² basınç altında 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.2.3.2 Fırın sterilizasyonu

Cam kaplar 180 °C'de 2 saat fırın kullanılarak sterilize edilmiştir.

3.2.3.3 UV ışık sterilizasyonu

Mikropipetler, uçlar ve ependorf tüplerinin tümü UV ışığı ile sterilize edilmiştir.

3.2.3.4 Doğrudan ateşleme

Forseps noktası ve aşılama halkası gaz brülörünün alevi ile sterilize edilmiştir.

3.2.4 Bakteriyel izolatların saklanması

Bu çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* izolatları literatüre (Benson 2002) göre aşağıdaki şekilde muhafaza edilmiştir:

- Kısa Süreli Saklama: Bakteri izolatı, parafilm ile sıkıca sarılmış ve 4°C'de buzdolabına konan besleyici agar plakalarında iki hafta saklanmıştır.
- Orta Süreli Saklama: Bakteri izolatı, yaklaşık (5-8) mL nütrient agar içeren vidalı kapaklı şişeler kullanılarak slant kültürde üç ila altı ay arasında tutulmuş ve buzdolabında 4°C'de saklanmıştır.
- Uzun Süreli Saklama: Bakteri izolatı, %15 gliserol içeren bir besiyerinde uzun süre muhafaza edilmiştir. Ortam, steril düzlem tüpte 10 mL nihai hacimle büyüme kültürüne (beyin kalp infüzyon suyu) 1,5 mL gliserol eklenerek hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.5 Moleküler tanı

3.2.5.1 Gen dizileme

3.2.5.1.1 Ticari kit ile DNA ekstraksiyonu

Genomik bakteri DNA'sı, EasyPure® Genomic DNA Kiti (Katalog No. EE161) kullanılarak, kitin protokolüne göre ekstrakte edilmiştir.

* Tüm santrifüjleme adımları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

1. Gram-negatif Bakterilerin Lizizi

(a) 1 mL Gram negatif bakteri 1,5 mL'lik bir tüpe aktarılmış ve 12.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır.
(b) Tüpe 100 µL LB11 ve 20 µL Proteinaz K eklenmiştir. Pipetleme ile bakteriler yeniden süspanse edilmiştir.
(c) 55°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir (inkübasyondan sonra çözelti berrak değilse, inkübasyon süresi 30 dakikaya uzatılmış, her 5 dakikada bir pipetleme yapılmıştır).
2. Tüpe 20 µL RNase A eklenmiş, karıştırılmış ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir
3. 400 µL BB11 eklenmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir (bu adımda beyaz topaklanma çökeltisi veya şeffaf jelatinli madde bulunabilir, bu DNA ekstraksiyonunu etkilemez).
4. Tüm içerik bir döndürme kolonuna aktarılnış, 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş, süpernatant atılmıştır.
5. 500 µL CB11 eklenmiş, 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
6. Adım 5 bir kez tekrarlanmıştır.
7. 500 µL WB11 eklenmiş, 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş, süpernatant atılmıştır.
8. Adım 7 bir kez tekrarlanmıştır.
9. Kalan WB11'i çıkarmak için 12.000×g'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.
10. Döndürme kolonu steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolonun merkezine 50-200 µL Elüsyon Tamponu (65°C'ye önceden ısıtılmış) veya steril, damıtılmış su (pH >7,0) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Genomik DNA'yı ayrıştırmak için 1 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüjlenmiştir.
11. Adım 10 bir kez tekrarlanmış ve izole edilmiş DNA -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.5.1.2 Konvansiyonel PCR

Bu teknik, monopleks amplifikasyon olarak CupA, CupB ve mvaT genleri olan üç *P. aeruginosa* geninin tespiti için kullanılmış, her bir PCR karışımı 12,5 µL PCR SuperMix'ten oluşturulmuş, toplam hacim olarak 25 µL'ye ulaşmak için her bir ileri ve ters primerden 1µL, 3 µL ekstrakte DNA ve 7,5 µL Nükleaz içermeyen su eklenmiştir.

PCR için 2x Eazy Taq® PCR SuperMix, üreticinin talimatına göre 25 µL'lik bir reaksiyon hacmi için hazırlanmıştır.

1. 2x Eazy Taq® PCR SuperMix 25 °C oda sıcaklığında çözülmüştür.
2. Gerekli sayıda reaksiyonu hazırlamak için gereken bileşenlerin hacmi Çizelge 3.9'a göre hesaplanmıştır.

Çizelge 3.9 PCR için reaksiyon bileşenleri ve hacmi

Bileşen	**Hacim**
2x Eazy Taq® PCR SuperMix	12,5 µL
İleri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
DNA	3 µL
Nükleaz içermeyen su	7,5 µL
Toplam Hacim	25 µL

3. Tüm bileşenlerin toplandığı tüp, içindekileri döndürmek ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için kısaca santrifüjlenmiştir.
4. Tüp PCR kuyusuna yerleştirilmiş ve program çalıştırılmıştır. PCR karışımı, her bir gen için Çizelge 3.10, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12'de gösterildiği şekilde bir termal döngüleyiciye nakledilmiştir.

Çizelge 3.10 CupA geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	dakika	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	35 siklus
	Bağlanma	55ºC	30 saniye	
	Uzama	72ºC	1 dakika	
3. adım	Uzama	75ºC	5 dakika	1 siklus

Çizelge 3.11 CupB geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	dakika	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	35 siklus
	Bağlanma	60ºC	30 saniye	
	Uzama	72ºC	1 dakika	
3. adım	Uzama	75ºC	5 dakika	1 siklus

Çizelge 3.12 MvaT geninin amplifikasyonunda kullanılan termal profil

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	dakika	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	35 siklus
	Bağlanma	60ºC	30 saniye	
	Uzama	72ºC	1 dakika	
3. adım	Uzama	75ºC	5 dakika	1 siklus

3.2.5.1.3 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, ekstrakte edilen DNA parçalarının varlığını ve bütünlüğünü teyit ederek ekstrakte edilen DNA'nın kalite analizi için ve standart DNA'nın mevcudiyeti yoluyla PCR etkileşiminin amplifikasyonunun varlığını doğrulamak için kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde; 1 X TBE solüsyonu, agaroz, jel boyayıcı (etidyum bromür), DNA basamak işaretleyici ve örnek yükleme boyası kullanılmıştır.
%1 ve %2 agaroz jel hazırlamak için:
1. Bir behere 100 mL 1X TBE alınmıştır.
2. Tampona 1 g/2 g (DNA ekstraksiyonu için %1, PCR amplifikasyonu için %2) agaroz ilave edilmiştir.

3. Çözelti, tüm jel partikülleri çözünene kadar (mikrodalga kullanılarak) kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır.
4. Agaroza 7 µL etidyum bromür eklenmiştir.
5. Agaroz, karışması ve kabarcık oluşmasını önlemek için karıştırılmıştır.
6. Çözeltinin 50-60°C'de soğumasına izin verilmiştir.
7. Agaroz çözeltisi, her iki kenar selofan bantlarla kapatıldıktan sonra jel tepsisine dökülmüş ve agarozun oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmasına izin verilmiştir. Tarak, jel tamamen katılaşmadan önce yerleştirilmiştir.
8. Tarak dikkatlice çıkartılmış ve tepsi, tampon jel yüzeyi üzerinde 3-5 mm'ye ulaşana kadar 1X TBE-elektroforez tamponu ile doldurulmuştur.
DNA yükleme:
1. 7 µL DNA, 3 µL yükleme boyası ile karıştırılmıştır.
2. Karıştırma aşaması tamamlandığında jelin deliklerine yükleme aşaması yapılmıştır.
Elektrik gücü 100 V, 70A'da 30 dakika süreyle açılmıştır. DNA, negatif taraftan (katot) pozitif tarafa (anot) doğru hareket etmiştir. Jeldeki bantları incelemek için 336 nm'lik bir ultraviyole kaynağı kullanılmıştır. Jel içindeki bantlar, jel görüntüleme amacı ile UV kaynağı kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.2.5.2 Gen ekspresyonu

3.2.5.2.1 Ticari kit ile RNA ekstraksiyonu

Genomik RNA, TransZol Up Plus RNA Kiti (Transgen, Çin) (Katalog No.ER501) kullanılarak, kitin protokolüne göre ekstrakte edilmiştir. Düşük sıcaklıklı santrifüjün sıcaklığı önceden 2-8 °C'ye ayarlanmıştır.

1. Homojenizasyon
• Kültür ortamıyla birlikte bakteri veya süspansiyon hücreleri bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp 2-8°C'de 2 dakika boyunca 8000xg'de santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
• Her ≤2×109 bakteri veya ≤107 hücre başına 1 mL TransZol Up eklenmiştir.
• Lizatta görünür bir çökelti kalmayana kadar yukarı ve aşağı pipetlenmiştir.

• 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

2. Her mL TransZol Up için 0,2 mL kloroform veya 50 µL 4-Bromoanisol eklenmiştir. Tüp 30 saniye kuvvetlice vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.

3. Tüp 2-8 °C'de 10.000×g'de 15 dakika santrifüjlenmiş, karışım alt pembe organik faza, interfaza ve RNA içeren renksiz üst sulu faza ayrılmıştır. Sulu fazın hacmi, kullanılan TransZol Up reaktifinin yaklaşık %50-60'ı kadar olmuştur.

4. RNA içeren renksiz sulu faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (interfazdan DNA kontaminasyonunu önlemek için sulu fazın belirli bir kısmı bırakılabilir). Eşit hacimde mutlak etanol eklenmiştir (bu aşamada çökeltiler görünebilir). Tüp ters çevrilerek hafifçe karıştırılmıştır. Aşağıdaki tüm santrifüjleme adımları oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir.

5. Üretilen çözelti ve çökeltileri birlikte bir döndürme kolonuna aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.

6. Döndürme kolonuna 500 µL CB9 eklenmiş ve oda sıcaklığında 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş, süpernatant atılmıştır.

7. Adım 6 bir kez tekrarlanmıştır.

8. Döndürme kolonuna 500 µL WB9 eklenmiş ve oda sıcaklığında 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlenmiş, süpernatant atılmıştır.

9. Adım 8 bir kez tekrarlanmıştır.

10. Kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için 12.000×g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir.

11. Döndürme kolonu RNase içermeyen bir tüpe (kitte sağlanan) yerleştirilmiştir. Spin kolonunun merkezine 50-200 µL RNaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

12. RNA'yı ayrıştırmak için 12.000×g'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir.

13. İzole edilmiş RNA -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5.2.2 cDNA sentezi

cDNA sentezi, EasyScript® One-Step gDNA Removal ve cDNA Synthesis SuperMix'in (Katalog No.AE311) protokolüne göre yapılmıştır.

1. Birinci sarmal cDNA sentezi, Çizelge 3.13 'te gösterildiği gibidir:

Çizelge 3.13 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi

Bileşen	**Hacim**
Toplam RNA/mRNA	0,1ng-5µg / 10pg-500ng
Ankrajlı Oligo(dT)18 Primer(0,5µg/µL)	1µL
Random primer (0,1µg/µL)	1µL
GSP	1 pmol
2×EX Reaksiyon Karışımı	1 µL
Easy Script®RT/RI Enzim Karışımı	1 µL
gDNA Sökücü	1 µL
RNazsız Su	20 L'ye kadar

2. 25 °C'de 10 dakika ve Anchored Oligo(dT)18 primer ve GSP için inkübe edilen her Random Primer, Real Time PCR için 42 °C'de 15 dakika inkübe edilmiş, ters transkriptaz enzimini inaktive etmek için 85 °C'de 5 saniye inkübe edilmiştir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 cDNA ters transkriptaz koşulunun termal döngüleyici adımları

	1. adım	2. adım	3. adım
Sıcaklık	25 °C	42 °C	85 °C
Zaman	10 dakika	15 dakika	5 saniye

3.2.5.2.3 Real Time PCR

Real Time PCR, Real Time PCR soft yazılımı ile Cephied Real Time PCR Sistemi (Smart cycler Technologies) kullanılarak yapılmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri ve kat değişimi, PerfectStart® Green Real Time PCR SuperMix Kitleri bileşenleri kullanılarak eşik döngüsü (Ct) ölçülerek nicelendirilmiştir. Bu teknik, PerfectStart Green Real Time PCR SuperMix'in ticari kiti kullanılarak daha sonra amplifikasyon spesifik gen dizilerine bağlı olarak *P. aeruginosa* genlerinin ekspresyon seviyelerini tahmin etmek

için kullanılmıştır: rpoD-H.K.G, CupB, MvaT gen ekspresyonu 3.2.5.2.3.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

3.2.5.2.3.1 Gen ekspresyonu için PerfectStart Green Real Time PCR SuperMix

Bu prosedür, üreticinin talimatına göre 20 µL'lik bir reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir.

1. PerfectStar Green Real Time PCR SuperMix 25°C oda sıcaklığında çözülmeye bırakılmıştır.
2. Gerekli sayıda reaksiyonu hazırlamak için gereken bileşenlerin hacmi Çizelge 3.15'e göre hesaplanmıştır.
3. Tüm bileşenlerin toplandığı tüp, içindekileri döndürmek ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için kısaca santrifüjlenmiştir.
4. Tüp, Real Time PCR kuyusuna yerleştirilmiş ve program çalıştırılmıştır.
5. Real Time PCR program koşulları, bu çalışma için Çizelge 3.16'da gösterildiği gibi tasarlanmıştır.

Çizelge 3.15 Gen ekspresyon için reaksiyon bileşenleri ve hacmi

Bileşen	**Hacim**
2xPerfectStart Yeşil RTPCR SuperMix	10 µL
İleri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
cDNA	3 µL
Nükleaz içermeyen su	5 µL
Toplam hacim	20 µL

Çizelge 3.16 Real Time PCR aşamaları ve sıcaklığı

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	5 saniye	40 siklus
	Bağlanma	60ºC	15 saniye	
	Uzama	72ºC	10 saniye	
3. adım	Ayrışma	55-95ºC	1 dakika	1 siklus

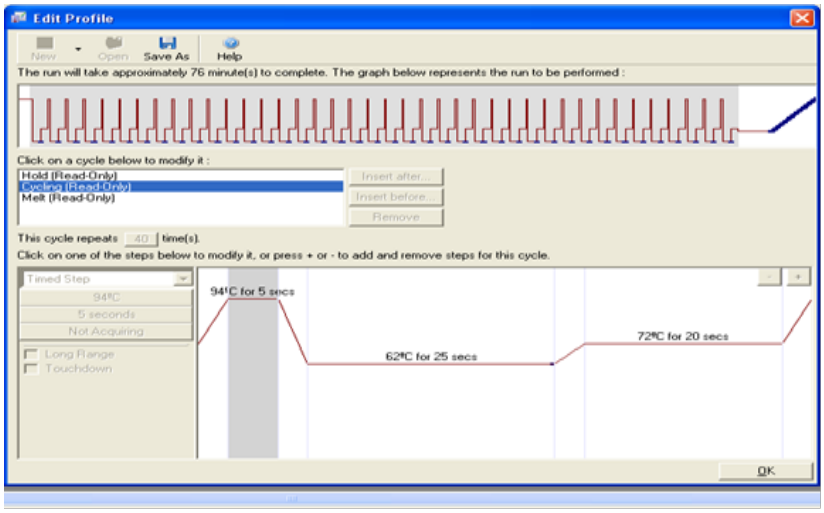
3.2.5.2.3.2 Primer hazırlama ve optimizasyon

Liyofilize primerlerden, her primer için 100 µM konsantrasyonda bir stok solüsyon yapmak üzere imalata göre nükleaz içermeyen suda eritildikten sonra bir primer çalışma solüsyonu hazırlanmış ve -23°C'de saklanmıştır. 10 µL primer stok solüsyonunun 90 µL nükleaz içermeyen su içinde seyreltilmesiyle 10 µM konsantrasyona sahip bir çalışma solüsyonu hazırlanmış ve kullanılana kadar -23°C'de saklanmıştır.

RpoD-Housekeeping gen ekspresyonu: ΔCT değerinin hesaplanmasında kullanılmak üzere dahili kontrol olarak rpoD-Housekeeping geni (H.K.G.) kullanılmıştır. rpoD-H.K.G geninin amplifikasyonunun Real Time PCR reaksiyonu, Çizelge 3.17'de gösterilen termal profil ile yapılmıştır. Şekil 3.1 RpoD-housekeeping gen ekspresyonunda kullanılan termal profili göstermektedir.

Çizelge 3.17 RpoD geni için Real Time PCR aşamaları ve sıcaklığı

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	5 saniye	40 siklus
	Bağlanma	62ºC	25 saniye	
	Uzama	72ºC	20 saniye	
3. adım	Ayrışma	55-95ºC	1 dakika	1 siklus

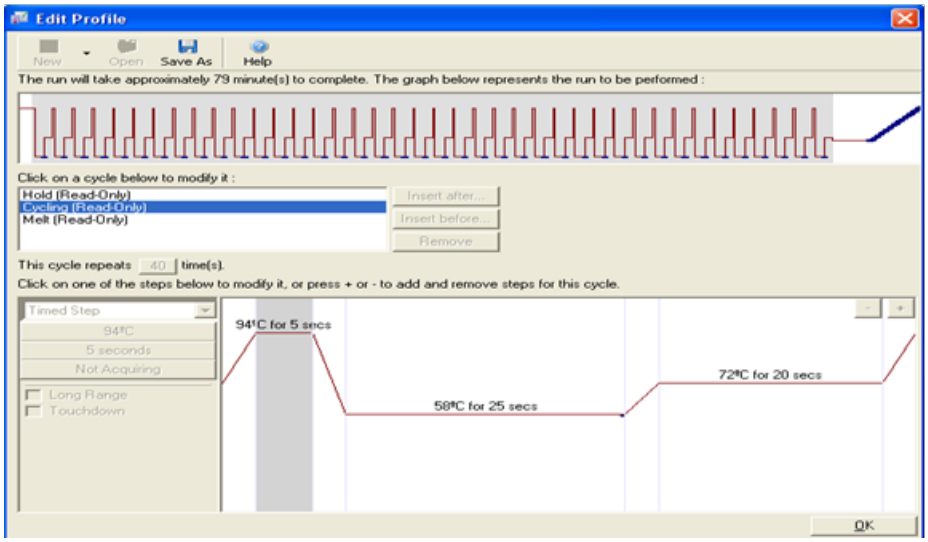


Şekil 3.1 RpoD-housekeeping gen ekspresyonunda kullanılan termal profil (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)

CupB Gen ekspresyonu: ΔCT değerinin hesaplanmasında kullanılan CupB geninin ekspresyonunun Real Time PCR reaksiyonu, Çizelge 3.18'de gösterilen termal profil ile yapılmıştır. Şekil 3.2 CupB gen ekspresyonunde kullanılan termal profili göstermektedir. Fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir.

Çizelge 3.18 CupB gen ekspresyonunun termal profili

		Sıcaklık	**Zaman**	**Aşama**
1. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	5 saniye	40 siklus
	Bağlanma	58ºC	25 saniye	
	Uzama	72ºC	20 saniye	
3. adım	Ayrışma	70-95ºC	1 dakika	1 siklus

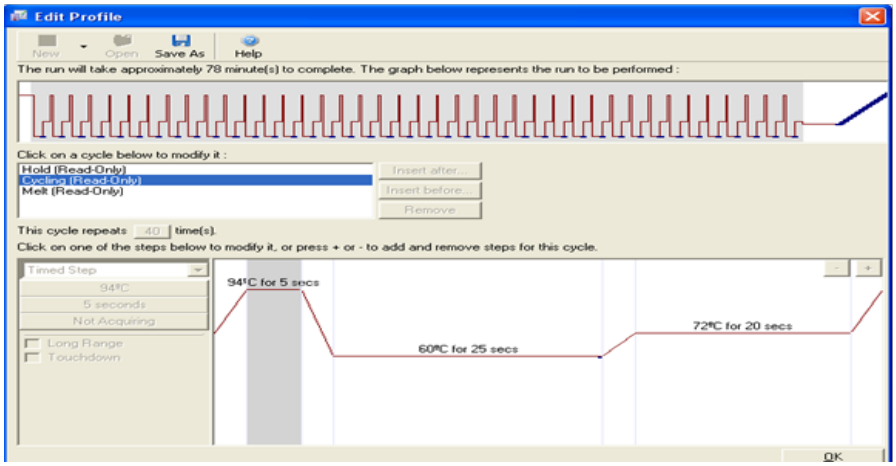


Şekil 3.2 CupB gen ekspresyonunda kullanılan termal profil (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)

MvaT Gen ekspresyonu: ΔCT değerinin hesaplanmasında kullanılan MvaT geninin amplifikasyonunun Real Time PCR reaksiyonu, Çizelge 3.19'da gösterilen termal profil ile yapılmıştır. Şekil 3.3 MvaT gen ekspresyonunda kullanılan termal profili göstermektedir. Fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir.

Çizelge 3.19 MvaT gen ekspresyonunun termal profili

		Sıcaklık	Zaman	Aşama
1. adım	Denatürasyon	94ºC	30 saniye	1 siklus
2. adım	Denatürasyon	94ºC	5 saniye	40 siklus
	Bağlanma	60ºC	25 saniye	
	Uzama	72ºC	20 saniye	
3. adım	Ayrışma	70-95ºC	1 dakika	1 siklus



Şekil 3.3 MvaT gen ekspresyonunda kullanılan termal profil (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)

3.2.6 Antimikrobiyal duyarlılık testi (Morello *et al.* 2006)

Kirby-Bauer testine bağlı olarak Mueller Hinton agar kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık testi yapılmıştır.

Müller-Hinton plakalarının hazırlanması: 3.1.8.1'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. İnokulumun hazırlanması: Kültürden birkaç koloniye (2-4) dokunularak, 2 mL besleyici et suyuna aktarılmış ve ardından tüp, 0,5 McFarland bulanıklığı, $1,5x10^8$CFU/mL'ye eşit olacak şekilde ayarlanmıştır.

Müller-Hinton plakalarına inokulasyon: Steril pamuklu çubuk kullanarak bakteri süspansiyonunu Muller-Hinton agarda inoküle edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır.

Antimikrobiyal diskler steril forseps ile agar yüzeyine aktarılmıştır. Plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Sonuçlar: Her antibiyotik diskinin inhibisyon zonunun çapı cetvelle ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi dirençli (R), duyarlı (S) veya aracı (I) olarak kaydedilmiştir.

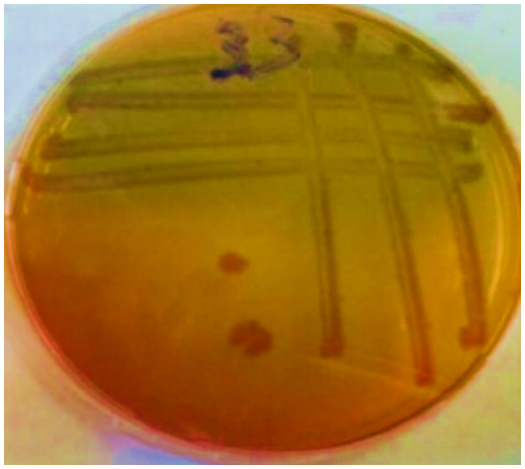
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *P. aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Tanımlanması

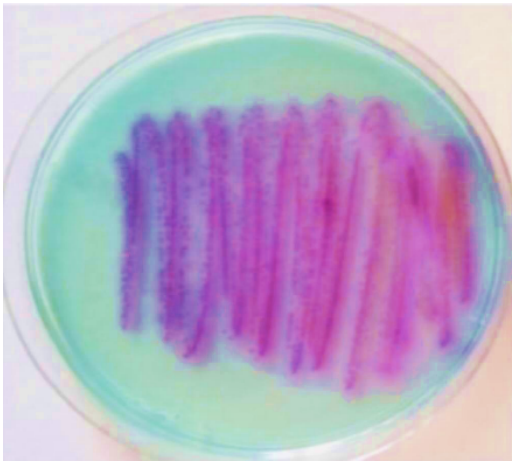
Steril sürüntüler kullanılarak Bağdat Hastanesinde (AL-Yarmuk Genel Eğitim Hastanesi) yatan hastalardan altı ay süreyle yüz elli örnek alınmıştır. 101 *P. aeruginosa* izolatı çeşitli klinik örneklerden elde edilmiştir ve bu izolatların kaynağı; diyabetik ayak ülserleri (n=30), idrar kültürleri (n= 20), keratit (n=16), yara (n= 12), yanıklar (n=9) ve dış kulak iltihabı (n= 14) olmuştur. Çalışma popülasyonu, farklı yaş gruplarından her iki cinsiyeti de hedef almıştır. Forbes *et al.* (Forbes *et al.* 2007)'a göre, elde edilen tüm izolatlar, patojen; laktozu fermente etmediğinden ve agarda yaygın yeşil bir pigment oluşturduğundan MacConkey agar, Pseudomonas agar, Nutrient agar ve Setrimid agar ile Kromojenik ve Kanlı agarlarda kültürlenmiştir. Çizelge 4.1 kültürel testleri göstermektedir, tüm izolatlar MacConkey agar üzerinde pozitif bulgular vermiştir; koloniler soluk renkli (Şekil 4.1) olarak görünmektedir (Anderson *et al.* 2013). Bu izolatlar Pseudomonas agarda kültürlendiğinde, tüm koloniler mavi-yeşil veya kahverengi renkte büyümüştür ve bu bakterilerin var olduğunu göstermektedir (Alfred 2005), daha sonra *P. aeruginosa*'yı tanımlamak için *P. aeruginosa* kolonilerinin rengini belirlemek için tanıda oldukça doğru olan Pseudomonas Kromojenik agar kullanılmıştır (Laina *et al.* 2009).

Mevcut çalışma, Irak'ta bu patojeni teşhis etmede bu besiyerini kullanan az sayıdaki çalışmadan biridir. Macenta koloni rengi ve besiyerinin yeşilden mavi-yeşile değişen rengi ile kolaylıkla ayırt edilir, kalan bakteriler inhibe olur ve üreme durumunda renksiz koloniler şeklinde çoğalırlar (Şekil 4.2). *P. aeruginosa* izolatları kanlı agarda kültürlenmiş ve belirgin metalik parlaklığa sahip büyük düz yayılan, beta-hemolitik, mukoid, pigmentli koloniler üreterek pozitif sonuçlar göstermiştir (Şekil 4.3) (Anderson *et al.* 2013). Nalidiksik asit içeren Setrimid agarda test edilen yüz bir izolattan sadece 93'ü pozitif çıkmıştır. Nalidiksik asit içeren Setrimid agar *P. aeruginosa*'nın dirençli, ancak diğerlerinin duyarlı olduğu için diğer Pseudomonas türlerinden *P. aeruginosa'*yı izole ve ayırt etmek için değerli bir antibiyotiktir (Kodaka *et al.* 2003). Koloniler, özellikle UV ışığı altında parlak yeşilimsi görülmüş (Şekil 4.4), ancak sekiz izolat,

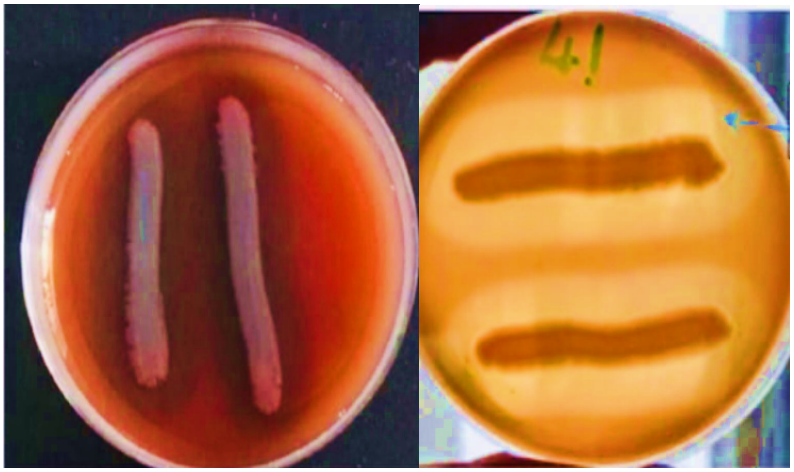
nalidiksik asidin varlığına atfedilebilecek (üreticinin talimatlarında tavsiye edilen) negatif bulgular vermiştir. *P.aeruginosa'*nın birkaç suşunda duyarlılık üreten tüm izolatlar nutrient agar üzerinde kültürlenmiş ve Çizelge 4.1'de listelenen kültürel testlerin sonuçlarının yanı sıra bunların çoğunluğu belirgin bir mavi-yeşil pigment üretmiştir (Şekil 4.1). Şekil 4.2 ise Macenta koloni rengi olarak görünen ve besiyeri renginin yeşilden mavi yeşile değişen kromojenik agar üzerinde *P.aeruginosa* büyümesini göstermektedir. Şekil 4.3 a ve b, kanlı agar üzerinde *P.aeruginosa* büyümesini göstermektedir; koloniler belirgin bir metalik parlaklığa sahip büyük düz yayılan, β-hemolitik, mukoid, pigmentli koloniler olarak görünmektedir.



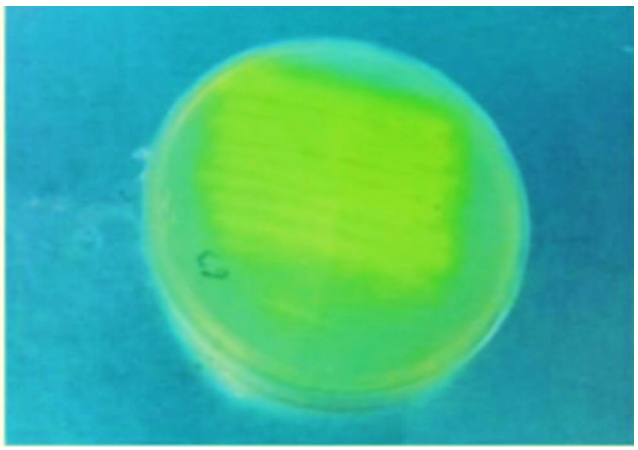
Şekil 4.1 MacConkey agarda *Pseudomonas aeruginosa* büyümesi (kolonilerin rengi soluktur ve agarda dağınık yeşil bir pigment üretir)



Şekil 4.2 Macenta koloni rengi olarak görünen ve besiyerinin rengi yeşilden mavi yeşile değişen kromojenik agar üzerinde *P.aeruginosa* büyümesi



Şekil 4.3 a ve b, kanlı agar üzerinde *P.aeruginosa* büyümesini göstermektedir; koloniler belirgin bir metalik parlaklığa sahip büyük düz yayılan, β-hemolitik, mukoid, pigmentli koloniler olarak görünmektedir



Şekil 4.4 Setrimid agar üzerinde *P. aeruginosa* büyümesi; koloniler, özellikle UV ışığına maruz kaldıklarında parlak yeşilimsi olarak görünmektedir

Çizelge 4.1 Kültürel testlerin pozitif sonuçları

İzolatların türü	MacConkey agar	Pseudomonas agar	Kanlı agar	Setrimid agar	Kromojenik agar
Diyabetik ayak ülserleri	30/30	30/30	30/30	26/30	30/30
İdrar	20/20	20/20	20/20	18/20	20/20
Orta kulak iltihabı	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Yaralar	12/12	12/12	12/12	10/12	12/12
Yanıklar	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
Keratit	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14

4.2 Mikroskobik İnceleme

Gram boyama, gram negatif (kırmızı) çubukların, 40X ve 100X'de bileşik ışık mikroskobu altında tek, kısa zincir veya gruplar olarak göründüğünü göstermiştir (Todar 2011).

4.3 Biyokimyasal Test Sonuçları

P. aeruginosa izolatlarını tanımlamak için Oksidaz, Katalaz ve API 20NE (Analitik Profil İndeksi) biyokimyasal kiti gibi geleneksel biyokimyasal testler kullanılmıştır; *P. aeruginosa* izolatları için yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

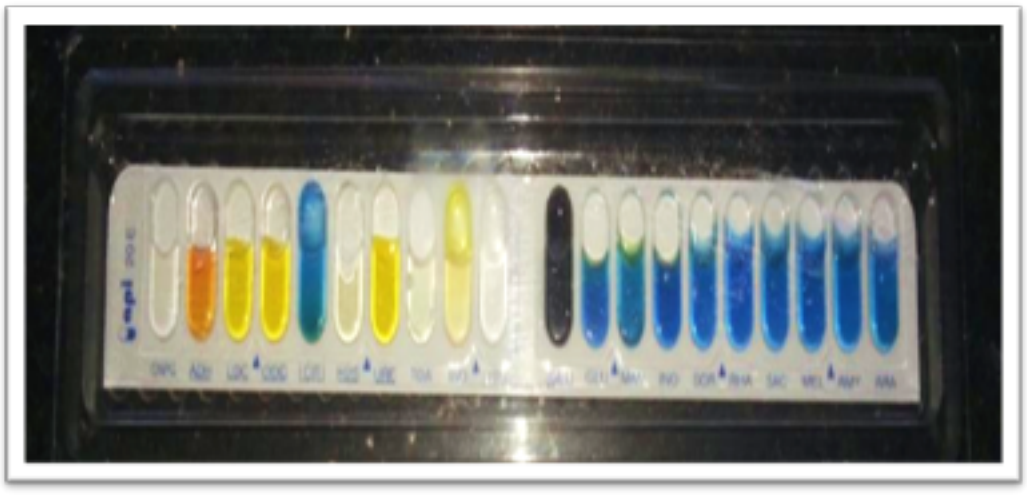
Çizelge 4.2 *P. aeruginosa* izolatları için pozitif biyokimyasal testlerin yüzdeleri

İzolatların Türü	İzolatların sayısı	Oksidaz testi pozitif/toplaml	Katalaz testi pozitif/toplam	API20 NE
Diyabetik ayak ülserleri	30	30/30(100%)	30/30(100%)	10/30(33,3%)
Orta kulak iltihabı	16	16/16(100%)	16/16(100%)	16/16(100%)
Keratit	14	14/14(100%)	14/14(100%)	14/14(100%)
İdrar	20	20/20(100%)	20/20(100%)	20/20(100%)
Yaralar	12	12/12(100%)	12/12(100%)	12/12(100%)
Yanıklar	9	9/9(100%)	9/9(100%)	9/9(100%)
Toplam	101	101/101(100%)	101/101(100%)	81/101(80,1%)

Oksidaz reaksiyonu 2-3 saniye içinde pozitif sonuç verirken, bu bakterinin mukoid suşları (diyabetik ayak ülserlerinden) 20 saniye sonra pozitif sonuç vermektedir. Pozitif sonuç oksidaz üretimine atıfta bulunur, bakterilerin sitokrom c oksidaz içerdiğine işaret eder, bu da oksijeni bir elektron transfer zinciri yoluyla O_2'yi H_2O veya H_2O_2'ye dönüştürerek enerji üretmek için kullanabilecekleri anlamına gelmektedir (Colaninno 2008). Tüm izolatlar, hidrojen peroksitin oksijen ve suya parçalanmasını katalize ederek oluşturulan gaz kabarcıklarının oluşumu ile tanınan katalaz enziminin varlığını gösteren katalaz testi için pozitif sonuçlar göstermiştir (Forbes *et al.* 2007). Katalaz testi diyabetik ayak ülserlerinden elde edilen *P. aeruginosa* izolatları ile diğer enfeksiyonlar arasında fark göstermez. API20NE sonuçları, bu izolatların nihai biyokimyasal

tanımlaması için kullanılmıştır; bu sistem, Gram-negatif bakterileri tanımlamak için tipik prosedürlerin minyatür ve standartlaştırılmış bir versiyonudur (Barghouthi 2011).

Diğer rutin ticari biyokimyasal testlerle karşılaştırıldığında, bu sistem bakterileri tanımlamak için kolay ve hızlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir, yani nihai sonucu almak yaklaşık 2 gün sürer ve her bir testin maliyeti yaklaşık 17,5 $'dır, inkübasyon sırasında metabolizma, kendiliğinden olan veya reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişiklikleri üretmektedir. Tüm pozitif ve negatif test sonuçları, bir profil numarası elde etmek için derlenmekte ve daha sonra bakteri türlerinin tanımlanmasını belirlemek için ticari bir kod kitabındaki (veya çevrimiçi) profil numaralarıyla karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmada API 20NE testi ile diyabetik ayak ülserlerinden sadece 10 (%33,3) izolat için pozitif sonuçlar kaydedilmiştir. Bunun sebebi Şekil 4.5'te gösterilen API20NE test kullanılarak bazı mukoid bakteri suşlarının ayırt edilmesinin zor olması kaynaklı olabilir (Fadhel 2013). Bu bulgular, kistik fibrozdan izole edilen farklı patojenlere ait 107 izolattan 42'sinin API20NE testi kullanılarak belirlenemediğini bulan İsviçre'de yapılan çalışma çalışmasına benzemektedir (Bosshard *et al.* 2006). Mevcut çalışma, aynı bakteri tespitinde API20NE testi kullanılarak duyarlılığın %100 kaydedildiği Irak'ta yapılan bir çalışma ile benzerlik göstermemiştir (Garallah 2015).



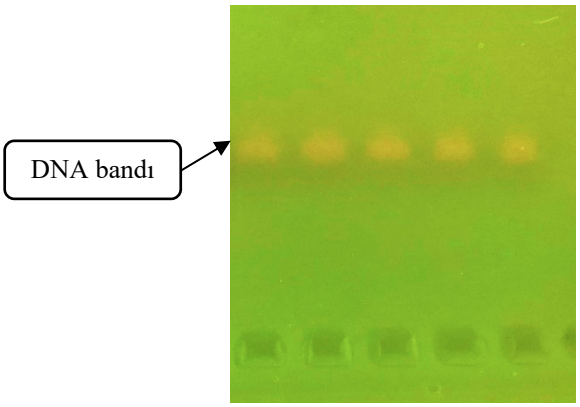
Şekil 4.5 API20NE testi ile *P. aeruginosa*'nın pozitif sonucu

4.4 *P. aerugiosa*'nın Moleküler Tanısı

4.4.1 Gen dizileme

4.4.1.1 *P. aeruginosa* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

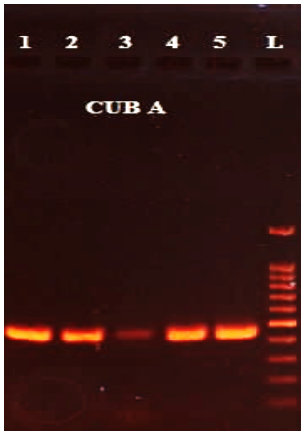
Kit DNA ekstraksiyonu yöntemi başarılı olmuştur. Ekstrakte edilen DNA'nın saf ve sağlam olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 %1 agaroz, TBE (1x) kullanılarak genomik DNA'nın agaroz jel elektroforez ve etidyum bromür boyaması ile görselleştirilmesi

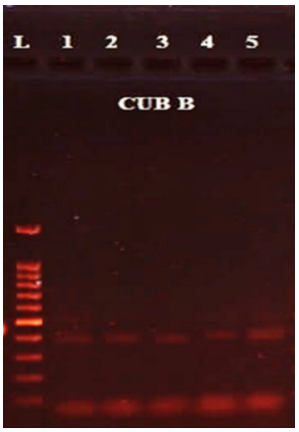
4.4.1.2 CupA, CupB ve mvaT genlerinin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterildiği gibi jel elektroforezi kullanılarak PCR ürünü saptanan her bir gene özel primerler kullanılarak farklı virülans faktörlerinin kodlamasının varlığını pekiştirmek amacıyla *P. aeruginosa* genomu için konvansiyonel amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Beş izolatın tümü, 450 bp molekül boyutuna sahip aynı primeri kullanan CupA geni için pozitif sonuç vermiştir. Bu çalışmada, bu genin hedef izolatlardaki prevalansı, Şekil 4.7'de gösterildiği gibi %100'dür.



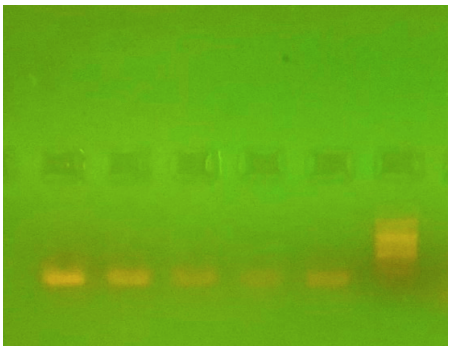
Şekil 4.7 *P.aeruginosa* CupA geninin (450 bp) geleneksel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dk) 1-5 : olumlu sonuçlar göstermiştir: DNA merdiveni 100 bp

Beş izolatın tümü, 400 bp molekül boyutuna sahip aynı primeri kullanan CupB geni için pozitif sonuç vermiştir. Bu çalışmada, bu genin hedef izolatlardaki prevalansı, Şekil 4.8'de gösterildiği gibi %100'dür.



Şekil 4.8 *P.aeruginosa* CupB geninin (400 bp) geleneksel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dk) 1-5 : olumlu sonuçlar göstermiştir: DNA merdiveni 100 bp

MvaT geni için, beş izolatın tümü, 150 bp moleküler boyuta sahip aynı primeri kullanan pozitif sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada bu genin hedef izolatlardaki prevalansı Şekil 4.9'da gösterildiği gibi %100'dür.



Şekil 4.9 *P. aeruginosa* MvaT geninin (150 bp) konvansiyonel PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (%1 agaroz, 100Vol / 60 dak) 1-5: pozitif sonuçları göstermiştir: DNA merdiveni 100 bp

4.4.1.3 Nükleotid dizileme sonuçları

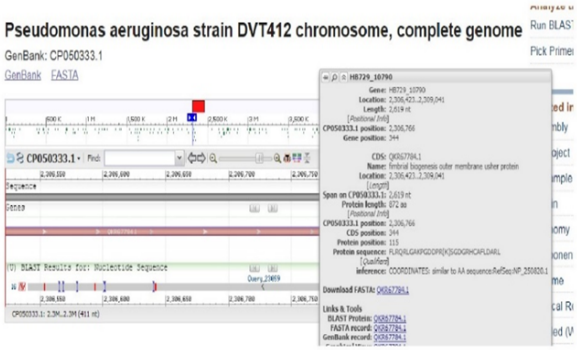
-CupA geni

Nükleotid dizi analizi, CupA geninin 5 bakteri izolatı için gerçekleştirilmiştir ve NCBI'deki hizalama, *P. aeruginosa* ile %98 özdeşlik göstermiştir (Çizelge 4.3) (*Pseudomonas aeruginosa* suşu DVT412 kromozomu, tam genom, Sıra Kimliği: CP050333.1, Uzunluk: 6394923, Eşleşme Sayısı: 1, Aralık 1: 2306541 - 2306915 GenBankGraphics).

Çizelge 4.3 CupA geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri

Skor	Beklenti	Teşhis	Boşluk	Zincir
652 bit (353)	0.0	372/380(98%)	5/380(1%)	Plus/Minus

Dizi hizalamasının tüm dizi bazları için %98 özdeş olduğu bulunan izolatlar, Şekil 4.10'da gösterildiği gibi global gen bankası NCBI kullanılarak global dizilerle hizalamayı temsil etmektedir.



In sample 1

TCT (S) TO TCC ( )

GGT (G) TO CGT ( )

CGC (R) TO GGC ( )

Pseudomonas aeruginosa strain DVT412 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP050333.1 Length: 6394923 Number of Matches: 1
Range 1: 2306541 to 2306915 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
652 bits(353)	0.0	372/380(98%)	5/380(1%)	Plus/Minus

```
Query  28       ACTCCTCGGGGCTGACGTAGCCGCGCGGCTTGAGGTCGAGCAAGGCTTGCGGCACCGAGA  87
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306915  ACTCCTCGGGGCTGACGTAGCCGCGCGGCTTGAGGTCGAGCAAGGCTTGCGGCACCGAGA  2306856

Query  88       GATCCAGGCGCAGGCGGGCGACGTCCAGGCTGAACCGCGAGCCGGGCAGGCGTGCATCGA  147
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306855  GATCCAGGCGCAGGCGGGCGACGTCCAGGCTGAACCGCGAGCCGGGCAGGCGTGCATCGA  2306796

Query  148      GAAAGGCGCAGTGGCGCCCGTCGCCGCTCTTGCGCGGATCGTCACCAGGCTTGGCGCCGA  207
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306795  GAAAGGCGCAGTGGCGCCCGTCGCCGCTCTTGCGCGGATCGTCACCAGGCTTGGCGCCGA  2306736

Query  208      GGCGCTGGCGCAGGAAGTCTTCGTCGAGGCAGGGCTCCACCGCGCCGCTGGCGGGGTTGG  267
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306735  GGCGCTGGCGCAGGAAGTCTTCGTCGAGGCAGGGCTCCACCGCGCCGCTGGCGGGGTTGG  2306676

Query  268      CGCGGAAACTCACTTCGCTGCGGCTGGCGAAGCCCCTCGTTGAGGTAGACATCGACGTGA  327
                |||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306675  CGCGGAAACTCACTTCGCTGCGGCTGGCGAAGCGC-TCGTTGAGGTAGACATCGACGTGA  2306617

Query  328      TAGCGACCCGGATCGGATCCGACGGTCCTGGTTGAAGCCGCGACAGGTCGGCCGCCCGCC  387
                |||||||||||||| ||||||| |||||||||||||| |||||||||| ||| |||||
Sbjct  2306616  TAGCGACCCGGATCG-ATCCGACCGTCCTGGTTGAAGC-GCGACAGGTCG-CCG-CCGCC  2306561

Query  388      CAGGGAGGAGCCGAGCAACA  407
                |||||| ||||||||||||
Sbjct  2306560  CAGGGAAGAGCCGAGCAACA  2306541
```

Şekil 4.10 CupA geninin hizalama sonuçları

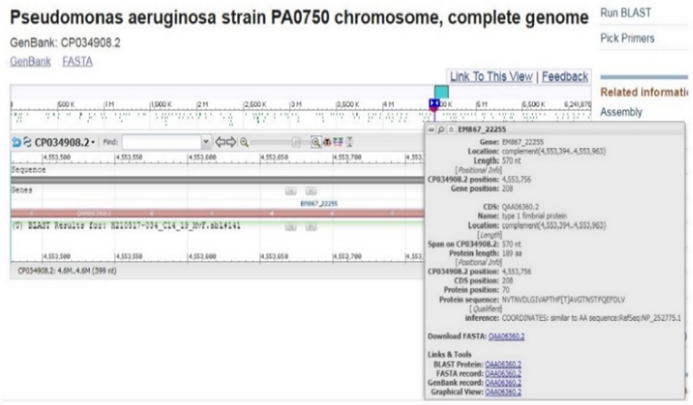
-CupB geni

Nükleotid dizi analizi, CupB geninin 5 bakteri izolatı için gerçekleştirilmiştir ve NCBI'deki hizalama, *P. aeruginosa* ile %96 özdeşlik göstermiştir (Çizelge 4.4) (*Pseudomonas aeruginosa* suşu DVT412 kromozomu, tam genom, Sıra Kimliği: CP050333.1, Uzunluk: 6394923, Eşleşme Sayısı: 1, Aralık 1: 2306541 – 2306935 GenBankGraphics).

Çizelge 4.4 CupB geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri

Skor	Beklenti	Teşhis	Boşluk	Zincir
647 bit (350)	0.0	391/408(96%)	13/408(3%)	Plus/Minus

Dizi hizalamasının tüm dizi bazları için %96 özdeş olduğunu bulunan izolatlar, Şekil 4.11'de gösterildiği gibi global gen bankası NCBI kullanılarak global dizilerle hizalamayı temsil etmektedir.



No. 1

Pseudomonas aeruginosa strain DVT412 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP050333.1Length: 6394923Number of Matches: 1
Range 1: 2306541 to 2306935GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	391/408(96%)	13/408(3%)	Plus/Minus

```
Query  8        CATGCTTGTCGCCGGCGTCAAACTCCTCGGGGCTGACGTAGCCGCGCGGCTTGAGGTCGA  67
                ||||| ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306935  CATGC-TGTCGCCGGCGTCCCACTCCTCGGGGCTGACGTAGCCGCGCGGCTTGAGGTCGA  2306877

Query  68       GCAAGGCTTGCGGCACCGAGAGATCCAGGCGCAGGCGGGCGACGTCCAGGCTGAACCGCG  127
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306876  GCAAGGCTTGCGGCACCGAGAGATCCAGGCGCAGGCGGGCGACGTCCAGGCTGAACCGCG  2306817

Query  128      AGCCGGGCAGGCGTGCATCGAGAAAGGCGCAGTGGCGCCCGTCGCCGCTCTTGCGCGGAT  187
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2306816  AGCCGGGCAGGCGTGCATCGAGAAAGGCGCAGTGGCGCCCGTCGCCGCTCTTGCGCGGAT  2306757

Query  188      CGTCACCAGGCTTGGCGCCGAGGCGCTGGCGCAGGAAGTCTTCGTCGAGGCAGGGCCCCC  247
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  2306756  CGTCACCAGGCTTGGCGCCGAGGCGCTGGCGCAGGAAGTCTTCGTCGAGGCAGGGCTCC-  2306698

Query  248      ACCCGCGCCCGCTGGCGGGGTTGGCGCGGAAACTCACTTCGCTGCGGCTGGCGAAGCCCC  307
                ||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  2306697  ACC-GCG-CCGCTGGCGGGGTTGGCGCGGAAACTCACTTCGCTGCGGCTGGCGAAGCGC-  2306641

Query  308      TCGTTTGAAGGTAGACATCGACGTGAATAGCGACCCGGGATCGATCCCGACCGTCCTGGT  367

                ||||| | ||||||||||||||||| |||||||||| |||||| ||||||||||||||
Sbjct  2306640  TCGTT-G-AGGTAGACATCGACGTGA-TAGCGACCCGG-ATCGAT-CCGACCGTCCTGGT  2306586

Query  368      TGAAGGCGCGACAGGGTCGCCGCCGCCCAGGGAAAGAGCCGAGCAACA  415
                ||||| ||||||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  2306585  TGAAG-CGCGACA-GGTCGCCGCCGCCCAGGGAA-GAGCCGAGCAACA  2306541
```

Şekil 4.11 CupB geninin hizalama sonuçları

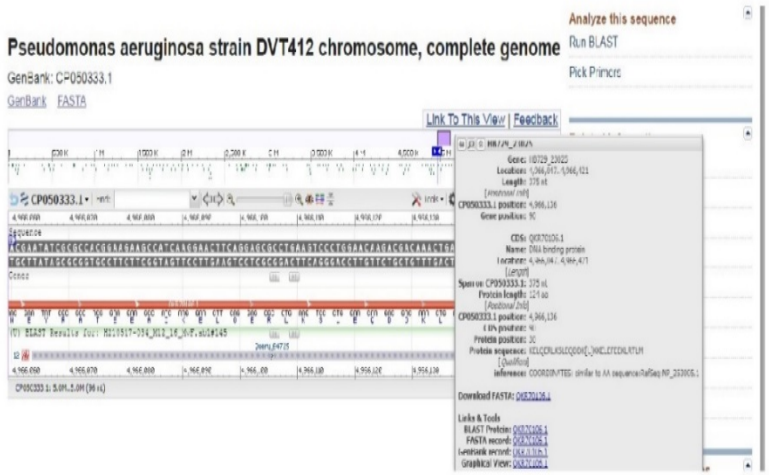
-MvaT geni

Nükleotid dizi analizi, MvaT geninin 5 bakteri izolatı için gerçekleştirimiştir ve NCBI'deki hizalama, *P. aeruginosa* ile %100 özdeşlik göstermektedir (Çizelge 4.5) (*Pseudomonas aeruginosa* suşu DVT412 kromozomu, tam genom, Sıra Kimliği: CP050333.1, Uzunluk: 6394923, Eşleşme Sayısı: 1 Aralık 1: 4966064 – 4966147 GenBankGraphics).

Çizelge 4.5 MvaT geni için kayıtla referansı karşılaştıran NCBI'den 1 numaralı eşleşme için hizalama istatistikleri

Skor	Beklenti	Teşhis	Boşluk	Zincir
156 bit(84)	5e-34	84/84(100%)	0/84(0%)	Artı/Artı

Tüm dizi bazları formu için dizi hizalamasının %100 özdeş olduğu bulunan izolatlar, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi global gen bankası NCBI kullanılarak global dizilerle hizalamayı temsil etmektedir.



MVa T CCACGGAAGAAGCCATCAAG
GATCGAGCAGGGAAATCACG

No. 1

Pseudomonas aeruginosa strain DVT412 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP050333.1Length: 6394923Number of Matches: 1
Range 1: 4966064 to 4966147GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
156 bits(84)	5e-34	84/84(100%)	0/84(0%)	Plus/Plus

```
Query  13       ATATCGCGCCACGGAAGAAGCCATCAAGGAACTTCAGGAGCGCCTGAAGTCCCTGGAACA  72
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4966064  ATATCGCGCCACGGAAGAAGCCATCAAGGAACTTCAGGAGCGCCTGAAGTCCCTGGAACA  4966123

Query  73       AGACGACAAACTGAAAAAAGAACT  96
                 |||||||||||||||||||||||
Sbjct  4966124  AGACGACAAACTGAAAAAAGAACT  4966147
```

Şekil 4.12 MvaT geninin hizalama sonuçları

Mevcut verilerden, *P. aeruginosa* üzerinde çalışılan izolatların çoğunda her üç genin de mevcut olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.2 Gen ekspresyonu

16 örneğin gen ekspresyonu, hem CupB hem de MvaT genleri (Housekeeping gen RpoD) için nicelendirilmiştir. CupA geni için gen ekspresyonunda sonuç alınamamıştır ve bunun sebebinin üretici firmanın gönderdiği primerler kaynaklı hata olabileceği düşünülmüştür. MvaT gen ekspresyonunun ortalaması diğer genlerden 17,99 (± 0,83) daha yüksek iken RpoD gen ortalama seviyesi 23,60 (±1,64) idi, ancak CupB geni Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi diğer genlerden 26,34 (± 1,62) daha düşük bulunmuştur. cDNA dahil olmak üzere herhangi bir çift sarmallı DNA'yı tanıyan bir floresan boya olan parlak syber green, amplifikasyon bir Ct değeri (döngü eşiği) olarak kaydedilmiştir. Daha fazla hedef kopyanın varlığı, daha düşük bir Ct değeri ile gösterilmektedir ve bunun tersi de geçerlidir. Yüksek Ct değerleri, gen ekspresyonu açısından düşük gen ekspresyonu anlamına gelmektedir (Schmittgen and Livak 2008).

4.4.2.1 rpoD (Housekeeping geni) gen ekspresyonunun Real Time PCR'ı

P. aeruginosa'da 16 numunede RpoD (Housekeeping geni) için Ct değerinin ortalama±SD değeri (23,60 ±1.64) bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bu çalışmada verilere referans olması için rpoD geni kullanılmıştır. Bu genin daha önce *P. aeruginosa*'da stabil olduğu gösterilmiş, bu da onu referans gen için iyi bir aday haline getirmiştir (Savli *et al.* 2003, Potvin *et al.* 2008). Referans genler veya housekeeping geni, çok çeşitli bakteri hücrelerinde eksprese edilen ve numuneler ile deney koşulları arasında ekspresyon seviyelerinde hiç/çok az değişiklik gösteren genlerdir.

Örnekler arasında Real Time PCR karşılaştırmalarından önce ilgili genlerin mRNA seviyelerini normalleştirmek için rpoD geni kullanılmıştır. Real Time PCR verilerini doğru bir şekilde değerlendirmek için uygun seçimi yapmak çok önemlidir (Radonic *et al.* 2004). Bu referans gen, numune varyansları, ekstraksiyon ve RNA kalitesi, cDNA

sentez verimliliği, dahili kontroller ve farklı deneysel numunelerin neden olduğu hataları değerlendirmek ve en aza indirmekten sorumludur (Peters *et al.* 2004).

Bu çalışma, *P. aeruginosa* gen ekspresyon çalışmalarında referans gen olarak rpoD'nin kullanımını desteklemiştir. Gen ekspresyonu kat değişiminin hesaplanması delta delta Ct değerinden bağıl niceleme (RQ) kullanılarak yapılmıştır. Bunu yapmak için kontrol ve numunelerde 2ˆ-Ct oranı Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi uygulanmıştır (Schmittgen and Livak 2008). Kontrol numunesi, rpoD referans geni için en yüksek Ct değerine dayalı olarak seçilmiştir (2-Ct değerine göre, farklı izolatlar için rpoD geni için gen ekspresyonunun katı 1,02, 1,00 idi). Gen kat ekspresyon numunelerindeki ve kontrol izolatındaki bu küçük varyasyonlar, rpoD genini faydalı bir kontrol geni olarak göstermektedir. Referans gen ekspresyon deneyinin bulguları, bu genin katının aynı bakteri üreme koşulları altında yakınsak (1,00-102) olduğunu göstermiştir. rpoD geni için ortalama Ct değerinde fark bulunmamıştır. Moleküler araştırmalarda housekeeping genlerinin kullanımı, incelenen hücrelerde veya dokularda ekspresyonlarının sabit kaldığı varsayımına dayanmaktadır (Rebouças *et al.* 2013).

Numuneden numuneye varyansı en aza indirmek için referans genler kullanılmıştır. Sonuç olarak, referans gen ekspresyonundaki dalgalanma yanlış pozitiflere yol açabileceğinden, stabil olarak eksprese edilen referans genlerin tanımlanması kritiktir (Dheda *et al.* 2005). Bununla birlikte, rRNA ekspresyonunun bakteri hücresinin fizyolojik durumuna güçlü bir şekilde bağlı olduğu gösterilmiştir (Hansen *et al.* 2001). Ardından, *P. aeruginosa*'da stabil olarak eksprese edilen housekeeping genlerini tanımlama ihtiyacı doğmuştur.

Çizelge 4.6 Farklı *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatları için housekeeping gen rpoD'nin Ct değerleri ve gen ekspresyonunun katı

Grup	**CT Ortalaması ±SD**	**2ˆ-CT**	**Deney grubu/ Kontrol**	**Gen ekspresyonu katlanması**
RpoD kontrol	23,63	7,70302e-8	7,70302e-8/ 7,70302e-8	1
RpoD	23,60 ±1,64	7,86488e-8	7,86488e-8 / 7,70302e-8	1,02

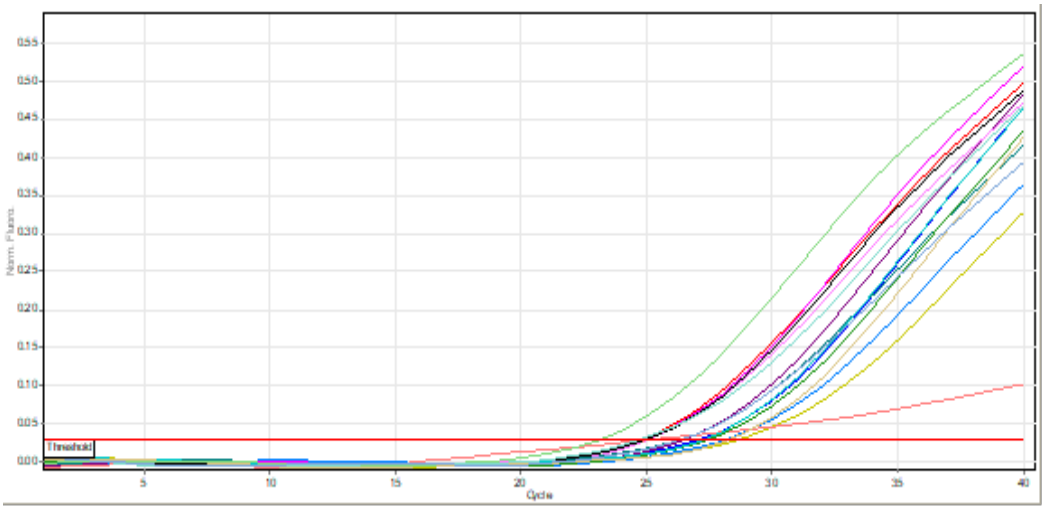
4.4.2.2 CupB, mvaT genlerinin klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının ekspresyonunun Real Time PCR ile ölçümü

Gen ekspresyonu çalışmasının temel amacı, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas aeruginosa'*da virülans genleri olan CupB geni ile MvaT geni arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak ve her birinin ekspresyonunu referans gen ekspresyonu MvaT geninin CupB geni üzerindeki etkisini bulmak için birbirleriyle ile karşılaştırmaktır. Ekspresyon, CupB, mvaT genlerinin gen ekspresyonunu ölçmek ve housekeeping geni ile karşılaştırmak için rpoD gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır.

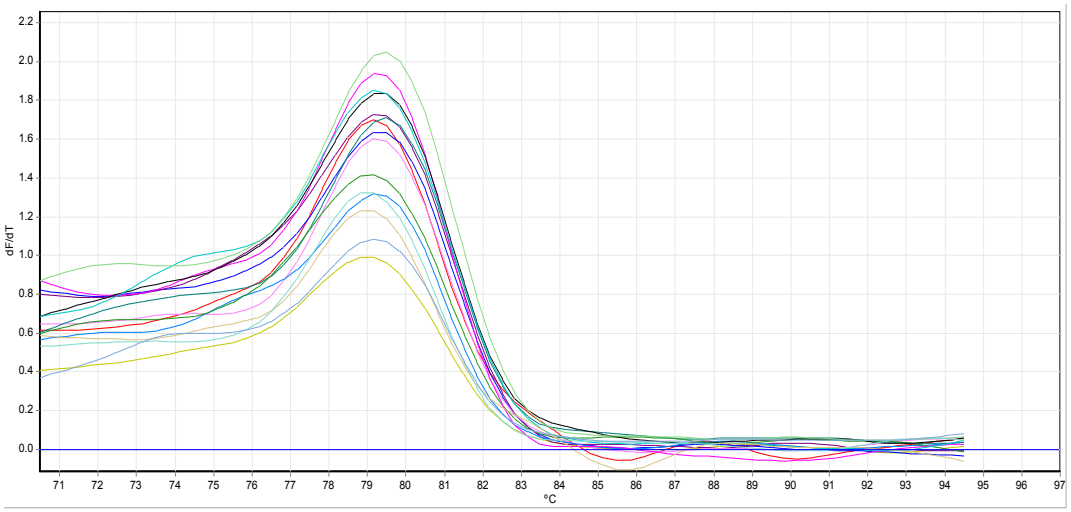
Test 16 numune için yapılmış ve numuneler için verilen gen ekspresyonunun miktarı olarak kabul edilen değerlerin ortalaması ΔΔ Ct, gen ekspresyonunu belirlemek için kullanılmıştır. ΔΔ Ct, numunenin Δ Ct'si kalibratörün Δ Ct'sinden (standart numune) çıkartılarak elde edilmiştir.

Göreceli gen ekspresyonu verilerine dayalı olarak, karşılaştırmalı Ct yöntemi aynı zamanda Schmittgen ve Livak'in (2008) kat değişimi= 2-ΔΔ Ct yöntemine atıfta bulunmuştur. Kazanılan farklılıkların mRNA kalitesi veya miktarına değil, hedef gen ekspresyonundaki değişikliklere geri döndürülebileceğini doğrulamak için her numune bir dahili kontrol geniyle (housekeeping geni) ilişkilendirilmiştir.

1. CupB geni: CupB geni, *P. aeruginosa*'daki virülans genini, ekspresyonu saptamak için Real Time PCR kullanma olasılığını değerlendirmek için ölçülmüştür. Tüm izolatlarda (16 izolat) CupB geni varlığı saptanmıştır ancak farklı izolatlarda farklı ekspresyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Sonuçlar, CupB geninin erime eğrisini gösteren Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14'de açıklandığı gibi, üç gende (RpoD, CupB, MvaT) $p \leq 0,01$'de LSD değerlerine göre önemli bir fark olduğunu ortaya çıkartmıştır.



Şekil 4.13 Real Time PCR ile CupB amplifikasyonu Ct değerleri 23,22-28,71 aralığında bulunmuştur (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)



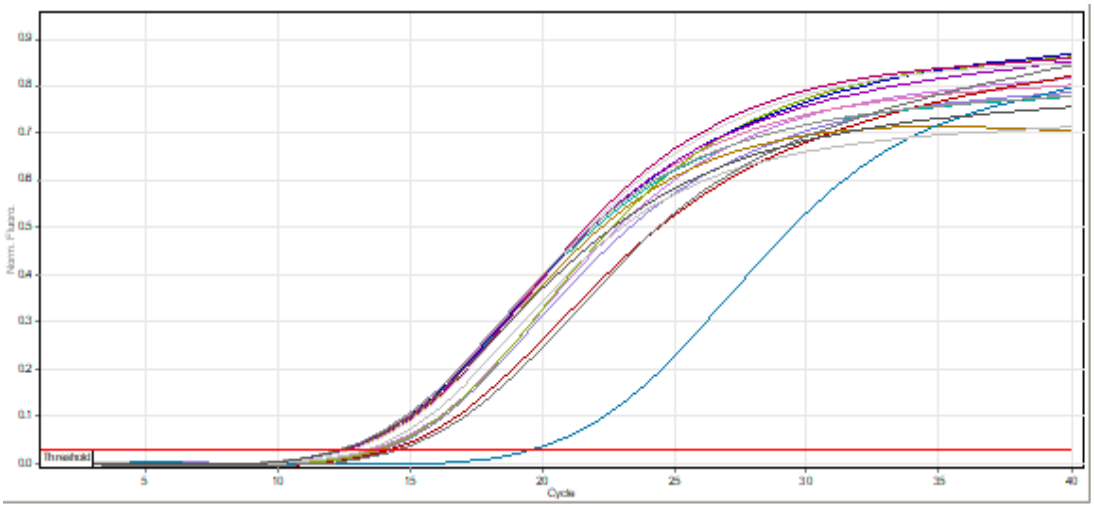
Şekil 4.14 Real Time PCR ile CupB ayrışma eğrileri (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)

Sonuçlar, CupB için ct ±SD 26,34 ± 1,62 ve Fold gen ekspresyonunun ortalamasının 0,01178 olduğunu göstermiştir. Referans genin ortalaması: ct 23,60 ±1,64 ve Fold gen ekspresyonu 1,02 bulunmuştur dolayısıyla CupB gen ekspresyonu azalmıştır, bu da Nicastro *et al.* çalışmasıyla aynı fikirdedir (Nicastro *et al.* 2009). Ayrıca transkripsiyonel çalışmalar, Cup gen kümelerinin çeşitli ortamlarda ve fiziksel ortamlarda zayıf şekilde ekspresyon edildiğini göstermiştir (Kulasekara *et al.* 2005).

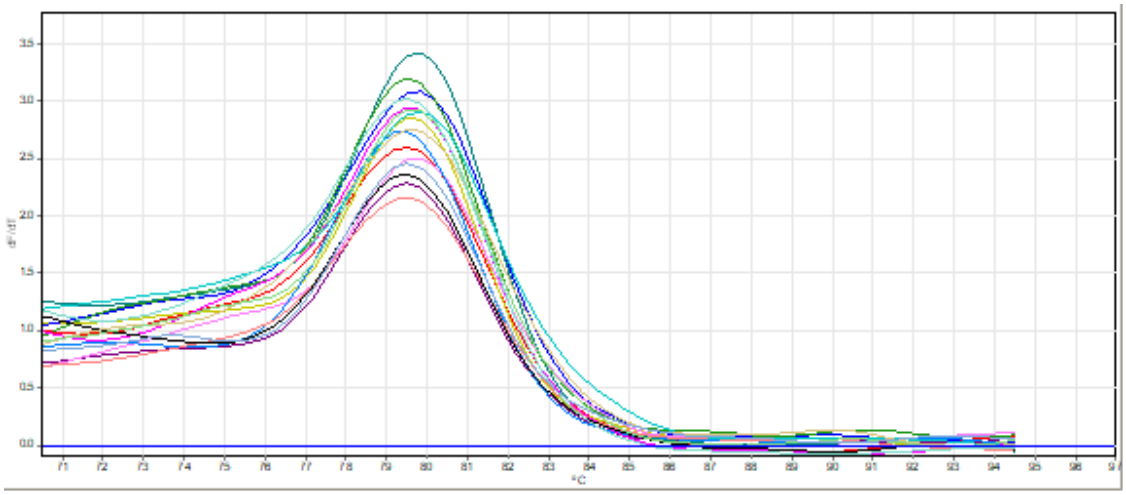
2. MvaT geni: *P. aeruginosa*'da transkripsiyonel düzenleme gen mekanizmalarını saptamak ve RT-PCR kullanma olasılığını değerlendirmek için MvaT geninin ekspresyonu ölçülmüştür. Bu gen, *P. aeruginosa*'da birçok virülans geninin ekspresyonunun kontrolünden sorumludur. Tüm izolatlarda (16 izolat) MvaT geni bulunmaktadır ancak farklı izolatlarda farklı ekspresyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

Sonuçlar, MvaT geninin erime eğrisini gösteren Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16'da açıklandığı gibi, üç gende (RpoD, CupB, MvaT) p≤0,01'deki LSD değerlerine göre önemli bir fark olduğunu ortaya çıkartmıştır.

Sonuçlar, MvaT için ct ±SD 17,99 ± 0,83 ve Fold gen ekspresyonunun ortalamasının 3,8616 olduğunu göstermektedir. Rrferans genin ortalaması: Ct 23,60 ±1,64 ve Fold gen ekspresyonu 1,02'dir, bu nedenle MvaT gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir ve bu sonuç Vallet *et al.* çalışması ile uyumludur (Vallet *et al.* 2004).



Şekil 4.15 Real Time PCR ile mvaT amplifikasyonu, Ct değerleri 16,76-19,81 aralığında bulunmuştur (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)



Şekil 4.16 Real Time PCR ile MvaT ayrışma eğrileri (fotoğraf doğrudan Real Time PCR makinesinden çekilmiştir)

Çizelge 4.7 *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatları için housekeeping geni rpoD, mvaT ve CupB'nin Ct değerleri ve gen ekspresyonunun katı

Genin adı	**Ortalama CT ±SD**	**Ortalama ΔCT**	**Ortalama ΔΔCT**	**Kat gen ekspresyonu $=2^{\Delta\Delta CT}$**	**Kat gen ekspresyonu $=2^{CT}$**
* RpoD	23,60 ±1,64	----------	----------		1,02
*MvaT geni	17,99 ± 0,83	-5,61	-1,94	3,8616	
*CupB	26,34 ± 1.62	2,73	6,40	0,01178	
LSD	**1,45				

**(P≤0,01) = çok önemli; P > 0,01 önemsiz.

Bu çalışmada test edilen üç gen arasında, MvaT geninin Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi en fazla ifade edilen değere sahip olduğu bulunmuştur. MvaT 17,99 ± 0,83 Ortalama CT ±SD ve 3,86 kat gen ekspresyonuna sahipken, housekeeping gen 23,60 ± 1,64 Ortalama CT ±SD ve 1,02 kat gen ekspresyonuna sahiptir. Bu, *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans geninin MvaT global düzenleyicisinin yüksek bir ekspresyonu olduğu anlamına gelmektedir. CupB geninin ekspresyon değeri en düşük ortalama CT±SD 26,34 ± 1,62 ve 0,01 kat gen ekspresyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.4.2.3 Ekspresyonda CupB ve mvaT genleri arasındaki korelasyon

CupB gen ekspresyonu azalmıştır, CupB geni, fimbrial veya fimbrial olmayan adezinleri birleştiren şaperon-kılavuz izyolunu kodlayan küme genlerinden (CupA, CupB ve CupC) birisidir. Şaperon tarafından salgılanan fimbrialar, *Pseudomonas aeruginosa* gibi klinik olarak önemli türlerde konak kolonizasyonu, lokalizasyonu ve biyofilm oluşumunu sağlayan anahtar patojenite faktörleridir ve *P. aeruginosa* genomunun refakatçi sistemlerinin fazlalığı, ekspresyonlarını sıkı bir şekilde düzenleyen karmaşık bir düzenleyici ağ ile birlikte, bakterinin çeşitli ortamlar veya desteklerle karşılaştığında yüzeyinde açığa çıkarabileceği organel çeşitliliğini göstermektedir (Ruer *et al.* 2007).

Bir çalışmada, CupB ve CupC genlerinin uyarılmasının, yüksek miktarda biyofilm gelişimi ile sonuçlandığı ve CupB ve CupC'nin mikrokoloni oluşumu için bakterileri kümelemede sinerjik olarak çalıştığı bulunmuştur. Önemli olarak; bu fenotip, elektron mikroskobu kullanılarak görülen hücre yüzeyi fimbria oluşumu ile bağlantılı bulunmuştur. CupB ve CupC sistemleri, kendi fiber bileşenlerinin montajında uzmanlaştıklarından birbirlerinin yerine kullanılamazlar (Ruer *et al.* 2007). CupB sistemleri ise bakteri hücre yüzeyinde geniş çapta dağılmış ince fimbrialar oluşturur. CupB fimbriaları, *P. aeruginosa*'nın hücre yüzeyinde yalnızca dış membran başlatıcı proteinleri aracılığıyla oluşan CupB fimbrialarının, biyofilm olgunlaşma süreci sırasında hücre-hücre etkileşimleri ve mikrokoloni oluşumunda işbirliği yapmaktadır (Ruer *et al.* 2007).

Öte yandan, MvaT geninin ekspresyonu artarken, MvaT, virülans gen ekspresyonunun (Cup küme genleri dahil) MvaT sessizlik T3SS (Tip üç salgılama sistemi) gen ekspresyonu çalışmasında yeni bir küresel düzenleyicisi olarak tanımlanmış (Williams *et al.* 2019), ayrıca MvaT, *P. aeruginosa*'da yabancı DNA elemanlarının susturulmasında rol aldığı belirlenmiştir (Castang *et al.* 2008). Cup küme genlerinde, Vallet *et al.* (Vallet *et al.* 2004) çalışmasında, CupA gen ekspresyonunun MvaT tarafından önemli ölçüde bastırılırken MvaT'nin CupB ve CupC gen ekspresyonu üzerinde daha az etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada MvaT'nin CupB

genini güçlü bir şekilde bastırdığı tespit edilmiştir ve Çizelge 4.7 çok küçük kat gen ekspresyonu (0,011) göstermektedir.

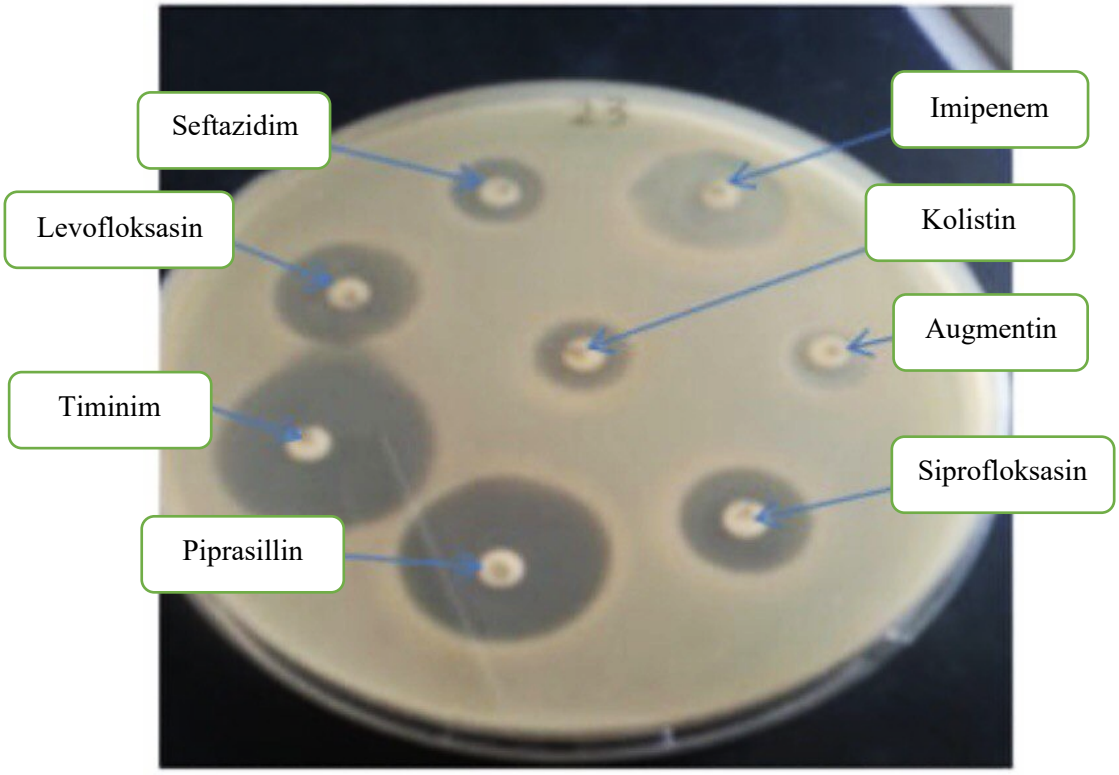
Vallet-Gely vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışma, MvaT'nin yokluğunun Cup gen kümesi üzerindeki etkisini gösterirken, Cup genleri faz-değişken ekspresyon sergilemiştir. 2020'de yapılan başka bir çalışma ise, MvaT MvaU çift devre dışı bırakma mutantının, *PAO1* vahşi tipine kıyasla düşük patojenite, biyofilm oluşturma yeteneği ve büyüme hızı gösterdiğini bulmuştur (Dong *et al.* 2020).

Ayrıca Lippa vd. (2021) tarafından *Pseudomonas aeruginosa*'da küresel baskılayıcılar olarak koordineli olarak hareket eden MvaT ve MvaU (H-NS benzeri proteinler) için yapılan çalışma, hem MvaT hem de MvaU'nun birleşik kaybının, bu proteinler tarafından doğrudan kontrol edilen lokuslardan intragenik transkripsiyonun artmasına yol açtığını göstermektedir. *PAO1*'de MvaT MvaU çift mutant piyosiyanin üretimi ortadan kaldırılmıştır (Li *et al.* 2009).

Böylece bu çalışmada tespit edilen, genler arasındaki ilişki; MvaT geninin, önceki çalışmalarda belirtildiği gibi, CupB geninin ekspresyonunu kontrol ettiğini göstermektedir. Bu izolatların CupB geninin düşük ekspresyonuna rağmen yüksek patojeniteye sahip olduğu fark edilmiştir, bunun nedeni inceleme bölümünde bahsedildiği gibi diğer virülans faktörü ve bu izolatların patojenitesine yol açan genlerdir.

4.5 *P. aeruginosa* İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılığı

Antimikrobiyal tahlil, Şekil 4.17'de gösterildiği gibi Kirby-Bauer'in tek disk difüzyon tekniği ile dokuz antibiyotik kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.17 Mueller Hinton agar üzerinde kültürlenen *P. aeruginosa'*ya karşı antimikrobiyal diskler kullanılarak yapılan duyarlılık testinin sonucu

Çizelge 4.8, Anonymous (2014)'e göre *P. aeruginosa*'nın dokuz antimikrobiyal ajana karşı duyarlılığının sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlara göre izolatların çoğunluğu Levofloksasin (%94), Tikarsilin-klavulanik asit (Timinim) (%88,1), Gentamisin (%82,1) ve hem Piprasillin hem de Imipenem'e (%80,1) duyarlı iken Augmentin (%72,2), Seftazidim (%33,6), Colistin (%37,6) ve Siprofloksasin (%27,7) ile temsil edilen diğer antimikrobiyallere dirençlidir.

Levofloksasin ve Siprofloksasin gibi florokinolonlar, DNA girazına bağlanarak bakteri üremesini baskılamaktadır (Lambert 2002). DNA giraz alt birimlerindeki mutasyonlar, *P. aeruginosa* ve diğer Gram negatif bakterilerde florokinolon direncinin oluşumunda önemli bir etkiye sahip olabilmektedir (Lee *et al.* 2005). Bu çalışma, bu bakterilere karşı en iyi antimikrobiyalin Siprofloksasin gibi kinolonlar olduğunu bulan başka bir çalışmayla (Al-Taei 2012) tutarlı olan, onlara karşı düşük düzeyde bir bakteri direnci bulmuştur. Siprofloksasine karşı sadece %20,6 direnç bulan bir başka çalışmanın yanı sıra (AL-Doory 2012), Levofloksasin duyarlılığı üzerine yapılan bir araştırma (AL-

Kaabi 2013), *P. aeruginosa*'nın Levofloksasine direncinin %69,23 olduğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 4.8 *P. aeruginosa'*nın duyarlılık testleri sonuçları

Antibiyotikler	**Bakteri izolatlarının sayısı ve bunların yüzdesi**		
	R	**I**	**S**
Augmentin 30 µg	73(72,2%)	6(5,9%)	22(21,7%)
Seftazidime 30 µg	34(33,6%)	8(7,9%)	59(58,4%)
Siprofloksasin 5µg	28(27,7%)	8(7,9%)	65(64,3%)
Kolistin sülfat 25 µg	38(37,6%)	-	63(62,3%)
Gentamisin 10 µg	18(17,8%)	-	83(82,1%)
Imipenem 10 µg	6(5,9%)	14(13,8%)	81(80,1%)
Levofloksasin 5 µg	4(3,9%)	2(1,9%)	95(94%)
Piprasillin 100 µg	14(13,8%)	6(5,9%)	81(80,1%)
Ticarcillin75µg+Klavulanik asid 10 µg	8(7,9%)	4(3,9%)	89(88,1%)

Polimiksin kolistin sülfat, sitoplazmik membranın fosfolipidlerine bağlanarak ve bariyer fonksiyonunu bozarak bakteri üremesini engellemektedir (Lambert 2002). Mevcut çalışma, bu antimikrobiyal ajana karşı minimum direnç bulmuştur; bu, izolatların yaklaşık %30,7'lik direnç olduğunu bulan (Al-Musawi 2012) ile aynı fikirdedir, ancak kolistine karşı önemli direnç bulanlarla aynı fikirde değildir (Bdiwee 2011). Plazmitler üzerinde taşınan mcr-1 geni kolistin direncinden sorumlu olmaktadır (Lui *et al.* 2016).

P. aeruginosa direnci, Augmentin'e karşı çok yüksek (%97.6) bir *P.aeruginosa* direnci bildiren Pakistan'daki başka bir çalışmadan (Shah *et al.* 2015) aynı firiklı olarak Augmentin'e karşı orta derecede yüksektir, ancak aynı çalışma daha düşük direnç göstermektedir (%10,4) ile bizim çalışmamıza benzer ve mevcut çalışma, %30,7 olan İmipeneme karşı düşük direncin olduğunu gösteren AL-Kaabi raporlarıyla uyumludur (AL-Kaabi 2013).

P. aeruginosa'da piprasillin direnci düşüktür. Piprasillin, üreidopenisilin sınıfı bir β-laktam antibiyotiktir. Mevcut çalışmanın bulguları, *P.vaeruginosa* izolatlarının yaklaşık %24'ünün çeşitli antimikrobiyal ilaçlara dirençli olduğunu keşfeden Al-Shwaikh'in bulgularına benzerdir (Al-Shwaikh 2006). Buna karşılık, bu çalışmanın bulguları, Hindistan'da yürütülen ve Piprasillin direncinin %100 olduğunu bulan başka bir çalışmanın bulgularıyla çelişmektdir (Murugan *et al.* 2010).

Gentamisin bir aminoglikozit antibiyotiktir. *P. aeruginosa* bu çalışmada sınırlı Gentamisin direncine sahip bulunmuştur. Bu bulgu, %35,9'luk bir duyarlılık bildiren başka bir çalışmanın (Al-Musawi 2012) bulgusuna benzer, ancak *P. aeruginosa*'nın Gentamisine direncinin %100 olduğunu gösteren çalışmadan (Dhar *et al.* 2007) farklıdır. *P.aeruginosa*, üçüncü kuşak bir sefalosporin olan Ceftazidime karşı düşük dirence sahipti ve bu, Ceftazidime %12,8 direnç bulan 2007'deki raporlarındaki sonuçlarla (Gailiene *et al.* 2007) uyumludur, ancak Al-Moussawi (Al-Mousawi 2012) ve Al-Shuwaikh (Shuwaikh 2006) sonuçları, Ceftazidime direnç %61,6 ve %78 olduğu için bu çalışma ile uyumsuzdur.

Tikarsilin+Klavulanik asit (Timentin), bir β-laktamaz inhibitörü ve bir β-laktam antibiyotik kombinasyonudur. *P. aeruginosa* için test edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın bu antimikrobiyal ajana karşı orta düzeyde dirence (%57,1) sahip olduğunu gösteren daha önceki bulgularla tezat teşkil eden minimum direnç göstermiştir (Fadhel 2013).

Bu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, birçok bakteriyel enfeksiyonda direnç gelişimi ile sonuçlanmıştır. Başka bir deyişle, antimikrobiyal ajanların tüketiminde bir artış, bu bakteride antibiyotiklerin seçim baskısına neden olmaktadır. Sonuç olarak, direnç mekanizmaları değiştirilmektedir (Picao *et al.* 2009). Örneğin, MBL (Metallo-β-laktamaz) familyaları, IMP (Japonya'da ilk kez izole edilen imipenem üzerinde aktif), VIM (Verona Integrin) gibi yatay olarak aktarılabilir gen kasetlerinde bulundukları için gram-negatif bakteriler arasında yayılabilmektedir. Kodlanmış Matallo beta laktamaz, İtalya'da ilk kez izole edilmiştir, GIM (Alman imipenemaz) ve SPM (Sao Paulo Metallo beta laktamaz, Brezilya'da izole edilmiştir), MBL(Mettallo- β-laktamaz) aileleri gram-negatifler arasında yayılabilmektedir (Zafer *et al.* 2014).

Bu patojenin dış zarının, kinolonlara karşı çok önemli bir direnç oluşumuna yol açabilecek küçük hidrofobik moleküllere karşı düşük bir geçirgenliğe sahip olduğu görülmektedir. *E. coli* ile karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa'*nın dış zarı antibiyotiklere karşı daha az geçirgen olmaktadır (10 ila 100 kat) (Aeschlimann 2003).

Anladığımız kadarıyla, önceki bölümde (2.12) açıklandığı gibi, zararlı bakterilerin gelişimini ve kolonizasyonunu engelleyen belirli antibiyotik mekanizmaları vardır. Bir hastalık birden fazla ilaca dirençli olduğunda, "çok ilaca dirençli patojen" olarak adlandırılmaktadır (Fisher and Mobashery 2010). Bakteriyel suşlar, hem mekanik hem de genetik olmak üzere çeşitli yöntemlerle direnç geliştirmektedir. 2.11'de birçok farklı dirençli biyokimyasal ve genetik mekanizmadan bahsedilmiştir: (i) Genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar (ESBL'ler) durumunda hidroliz yoluyla antibiyotik inaktivasyonu; (Bonnet 2004) (ii) Aminoglikozit grup transferi yoluyla antibiyotik inaktivasyonu (Blanchard 2004) (iii) Hedef modifikasyonu ile antibiyotik direnci (Spratt 1994) dahildir.

Antibiyotik direnci genetiği şunları içermektedir: (i) Antibiyotik direnci direnci, florokinolonlara direnç gibi antibiyotik hedeflerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Ruiz 2003) veya dışa akış sistemlerinin mutasyonları, hücre duvarının İmipenem geçirgenliğini azaltan *P. aeruginosa'*nın OprD porin ekspresyonunu azaltmaktadır (Wolter *et al.* 2004). (ii) Antibiyotik direnci, birçok bakteri suşunun bazı antibiyotiklere dirençli hale gelmesine neden olan yatay gen aktarımından kaynaklanmaktadır (Bush and Fisher 2011).

5. SONUÇLAR

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, aşağıdakiler açıklanabilir:

1 *P. aeruginosa* enfeksiyonları tehdidi hastanelerimizde ciddi bir endişe haline gelmiştir ve bu patojenin virülansının yayılmasını önlemek ve *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaç direncindeki artışları önlemek için enfeksiyon kontrol yöntemleri uygulanmalıdır.

2 Biyofilm oluşumunda rol oynayan Cup genlerinin tespit sonuçları, *Pseudomonas aeruginosa*'nın test edilen tüm izolatlarında CupA, CupB geninin ve birçok virülans geninin global düzenleyicisi olan MvaT'nin varlığını göstermiştir, test edilen tüm izolatlarda bu genin varlığını göstermiştir.

3 CupB gen ekspresyonu bulguları, housekeeping gen ile karşılaştırıldığında test edilen tüm izolatlarda düşük kat gen ekspresyonu ve housekeeping gen ile karşılaştırıldığında test edilen tüm izolatlarda yüksek kat gen ekspresyonu olan MvaT geni ortaya çıkmıştır.

4 MvaT geni ile CupB geni arasında ilişki olduğu ortaya çıkmıştır, çünkü gen ekspresyonu sonuçları, test edilen klinik izolatlarda MvaT geninin CupB geninin ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir.

KAYNAKLAR

Adhikari, L., Roy, K., Dechen, C. T., Pal, R. and Kar, S. 2010. Susceptibility Rates of Pseudomonas aeruginosa Strains to Quinolones. J. Lab Physiciansv, 2: 121-7.

Aeschlimann, J. R. 2003. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa and other Gram negative bacteria. Pharmacotherapy, 23: 916-924.

Al Dawodeyah, H. Y., Obeidat, N., Abu-Qatouseh, L. F. and Shehabi, A. A. 2018. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with respiratory tract infection. Germs, 8: 31-38.

Al-Doory, I. A. H. 2012. A diagnostic study of Pseudomonas aeruginosa isolated from contaminated burns and wounds using cultural and molecular methods. Ph.D. Thesis, University of Baghdad, 57 page, Baghdad.

Alfred, E. B. 2005. Microbiological Applications in Laboratory Manuals in General Microbiology (9th ed), McGraw-Hill Company, pp. 201-207, New York.

Al-Hasan, M. N., Wilson, J. W., Lahr, B. D., Eckel-Passow, J. E. and Baddour, L. M. 2008. Incidence of Pseudomonas aeruginosa bacteremia: a population-based study. Am. J. Med, 121: 702-708.

Al-Musawi, D. M. 2014. Correlation of quorum sensing genes with some virulence factors in Pseudomonas aeruginosa. Ph.D. thesis, Al Mustansiriyah University, 78 pages, Baghdad.

Al-Salehy, S. S. and Hasan, A. Y. 2015. Detection of some virulence factors in Pseudomonas aeruginosa associated with diarrhea in Kirkuk City. Kirkuk university journal-scientific studies (KUJSS), 10: 78-89.

Al-Shwaikh, R. M. 2006. Production and characterization of protease from Pseudomonas aeruginosa isolated from some clinical cases and its relation with some antibiotic agents. Ph.D. thesis, AL-Mustansiryia University, 83 pages, Baghdad.

Al-Taei, A. and Delool, R. 2012. Genetic study of ciprofloxacin resistant Pseudomonas aeruginosa. Ph.D. thesis, University of AL-Mustansriyia, 66 pages, Baghdad.

Amzil, K., Hamadi, F., Latrache, H., Mimouni, R., Abou Oualid, H., Azelmad, K., and Mabrouki, M. 2020. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Removal from Two Kinds

of Granite Commonly Found in Catering Kitchen. International Journal of Microbiology, 20, 45-52.

Anandabaskar, N. 2021. Protein Synthesis Inhibitors. In Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology. Springer, pp. 835-868, Singapore.

Anderson, C., Johnson, T. R., Case, C. L., Cappuccino, J. G., and Sherman, N. 2013. Great adventures in the microbiology laboratory (7th ed). Pearson, 175-176.

Anonymous. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 24th supplement 2014. CLSI, 226 pages, Philadelphia.

Anuj, S. N., Whiley, D. M., Kidd, T. J., Bell, S. C., Wainwright, C. E., Nissen, M. D. and Sloots, T. P. 2009. Identification of Pseudomonas aeruginosa by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the ecfX and the gyrB genes. Diagn Microbiol Infect Dis, 63: 127-131

Aramaki, H., and Fujita, M. 1999. In vitro transcription analysis of rpoD in Pseudomonas aeruginosa PAO1. FEMS microbiology letters., 180: 311-316.

Barghouthi, S. A. 2011. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. Indian J Microbiol, 51: 430-444.

Barnes, M. D., Bethel, C. R., Alsop, J., Becka, S. A., Rutter, J. D., Papp-Wallace, K. M. and Bonomo, R. A. 2018. Inactivation of the Pseudomonas-derived cephalosporinase-3 (PDC-3) by relebactam. Antimicrobial agents and chemotherapy, 62: e02406-17.

Bartlett, D. J. and Janaat, S. D. 2013. Clinical Ocular Pharmacology (2nd ed.). Elsevier, 214.

Bdiwee, S. G. 2011. Assessment of the Resistance of the Mycobacterium tuberculosis to antibiotics and Investigating the Associated Bacteria in the Patients. Ph.D. thesis, University of Baghdad, 75 pages, Baghdad.

Benson, H. J. 2002. Microbiological applications: Laboratory manual in general microbiology. 8thEd. McGraw Hill companies, pp. 455.

Benton, B., Breukink, E., Visscher, I., Debabov, D., Lunde, C., Janc, J. and Humphrey, P. 2007. O258 Telavancin inhibits peptidoglycan biosynthesis through preferential targeting of transglycosylation: evidence for a multivalent interaction between telavancin and lipid II. International Journal of Antimicrobial Agents, 29: S51-S52.

Bialvaei, A. Z. and Samadi, K. H. 2015. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. Curr Med Res Opin, 31: 707-721.

Blanc, D. S., Francioli, P. and Zanette, G. 2007. Molecular Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in the Intensive Care Units – A Review. Open. Microb. J., 1: 8-11.

Blanchard, A. 2004. Bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones. Chem. Biol., 11: 565-573.

Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 1-14.

Bosshard, P. P., S. Abels, M. Altwegg, E. C. Bo¨ttger, and R. Zbinden. 2006. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol, 42: 2065-2073.

Brar, R. K., Jyoti, U., Patil, R. K., and Patil, H. C. 2020. Fluoroquinolone antibiotics: An overview. Adesh University Journal of Medical Sciences & Research, 2: 26-30.

Breed, R. S., Murray., E. G. D. and Smith, N. R. 2014. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Igarss, 1: 1-5.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. 2007. Jawetz, Melnick and Adedberg's Medical Microbiology. (24th ed). The McGraw-Hill, pp. 818, NewYork.

Bush, K. and Fisher, J. F. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new b-lactamases from gram-negative bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 65: 455- 478.

Caballero, A., Thibodeaux, B., Marquart, M., Traidej, M. and O'Callaghan, R. 2004. Pseudomonas keratitis: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other Pseudomonas proteases. Investigative ophthalmology & visual science, 45: 522-530.

Case, R. J., Boucher, Y., Dahllof, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F. and Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Applied and environmental microbiology, 73: 278-288.

Castang, S., and Dove, S. L. 2010. High-order oligomerization is required for the function of the H-NS family member MvaT in Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology, 78: 916-931.

Castang, S., and Dove, S. L. 2012. Basis for the essentiality of H-NS family members in Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology, 194: 5101-5109.

Castang, S., McManus, H. R., Turner, K. H. and Dove, S. L. 2008. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 18947-18952.

Cattoir, V., Gilibert, A., Le Glauec, J. M., Launay, N., Bait-Merabet, L. and Legrand, P. 2010. Rapid detection of P.aeruginosa from positive blood cultures by quantitative PCR. Anna. of Clinical Microbiol, 9: 21-25.

Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. and Cornelis, P. 2017. Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins. FEMS microbiology reviews, 41: 698-722.

Choi, J., Marks, J., Zhang, J., Chen, D. H., Wang, J., Vázquez-Laslop, N. and Puglisi, J. D. 2020. Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid. Nature chemical biology, 16: 310-317.

Christaki, E., Marcou, M. and Tofarides, A. 2020. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. Journal of molecular evolution, 88: 26-40.

Clark, S. T., Caballero, J. D., Cheang, M., Coburn, B., Wang, P. W., Donaldson, S. L. and Hwang, D. M. 2015. Phenotypic diversity within a Pseudomonas aeruginosa population infecting an adult with cystic fibrosis. Scientific reports, 5: 1-10.

Clissold, S. P., Todd, P. A. and Campoli-Richards, D. M. 1987. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs, 33: 183-241.

Colaninno, P., Goldman, E. and Green, L. H. 2008. Identification of gram-positive organism. (2nded). Practical Handbook of Microbiology, pp. 53-66.

Cornelis, P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. Appl Microbiol Biotechnol, 86: 1637-1645.

Corrao, G., Zambon, A., Bertù L., Mauri, A., Paleari, V., Rossi, C. and Venegoni, M. 2006. Evidence of tendinitis provoked by fluoroquinolone treatment: a case-control study. Drug Saf, 29: 889-896.

Crabbé, A., De Boever, P., Van Houdt, R., Moors, H., Mergeay, M. and Cornelis, P. 2008. Use of the rotating wall vessel technology to study the effect of shear stress on growth behaviour of Pseudomonas aeruginosa PA01. Environmental microbiology, 10: 2098-2110.

Cramer, N.; Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C. F. and Tümmler, B. 2011. Microevolution of the major common Pseudomonas aeruginosa clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. Environ Microbiol, 13: 1690-1704.

Croom, K. F. and Goa, K. L. 2003. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. Drugs, 63: 2769-2802.

D'Abbondanza, J. A., and Shahrokhi, S. 2021. Burn infection and burn sepsis. Surgical infections, 22: 58-64.

Das, T., Manoharan, A., Whiteley, G., Glasbey, T. and Manos, J. 2020. Pseudomonas aeruginosa biofilms and infections: Roles of extracellular molecules. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms. Elsevier, pp. 29-46.

David, S. R., Fritsch, S., Forster, A., Ihiawakrim, D. and Geoffroy, V. A. 2020. Flocking asbestos waste, an iron and magnesium source for Pseudomonas. Science of The Total Environment, 709, e135936.

Deredjian, A., Colinon, C., Hien, E., Brothier, E., Youenou, B., Cournoyer, B. and Nazaret, S. 2014. Low occurrence of Pseudomonas aeruginosa in agricultural soils with and without organic amendment. Frontiers in cellular and infection microbiology, 4, 53-60.

Del Barrio-Tofio, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G. and Oliver, A. 2019. Spanish nationwide survey on Pseudomonas aeruginosa antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 74: 1825-1835.

Dhar, S., Saraf, R., Singh, K. and Raina, B. 2007. Microbiological Profile of Chronic Burn Wounds among Paitients admitted in Burn Unit. JK Science, 9: 182-185.

Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A. and Zumla, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. Analytical biochemistry, 344: 141-143.

Dicenzo, G. C., and Finan, T. M. 2017. The divided bacterial genome: structure, function, and evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 81: e00019-17.

Diggle, S. P. and Whiteley, M. 2020. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology, 166, 30-6.

Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. and Cámara, M. 2002. Advancing the quorum in Pseudomonas aeruginosa: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. Journal of Bacteriology, 184: 2576-2586.

Dong, L., Pang, J., Wang, X., Zhang, Y., Li, G., Hu, X. and You, X. 2020. Mechanism of pyocyanin abolishment caused by mvaT mvaU double knockout in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Virulence, 11: 57-67.

Dorman, C. J. 2014. H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. Plasmid, 75: 1-11.

Dougherty, T. G. and Pucci, M. J. 2012. Antibiotic discovery and development. Bradford, P.A. and Jones, C.H. Springer science + business media, 168.

Eckburg, P. B., Lister, T., Walpole, S., Keutzer, T., Utley, L., Tomayko, J. and Coleman, S. 2019. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and drug interaction potential of SPR741, an intravenous potentiator, after single and multiple ascending doses and when combined with β-lactam antibiotics in healthy subjects. Antimicrobial agents and chemotherapy, 63: e00892-19.

El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K. and Ashour, H. M. 2015. Pseudomonas aeruginosa: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. Future Microbiology, 10: 1683-1706.

Elshafiee, E. A., Nader, S. M., Dorgham, S. M. and Hamza, D. A. 2019. Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa originating from farm animals and people in Egypt. Journal of veterinary research, 63, 333-340.

Eusebio, N., Pinheiro, T., Amorim, A. A., Gamboa, F., Saraiva, L and Gusmão, L. 2013. Apractical single nucleotide polymorphism multiplex assay for genotyping of Pseudomonas aeruginosa, PLoS ONE., 8, e66083.

Evans, S. R., Tran, T. T. T., Hujer, A. M., Hill, C. B., Hujer, K. M., Mediavilla, J. R. and Bonomo, R. A. 2019. Rapid molecular diagnostics to inform empiric use of ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam against Pseudomonas aeruginosa: PRIMERS IV. Clinical Infectious Diseases, 68: 1823-1830.

Evans-Roberts, K. M., Mitchenall, L. A., Wall, M. K., Leroux, J., Mylne, J. S. and Maxwell, A. 2016. DNA gyrase is the target for the quinolone drug ciprofloxacin in Arabidopsis thaliana. Journal of Biological Chemistry, 291: 3136-3144.

Fadhel, R. 2013. Inhibition of Biofilm Production of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Patients with Diabetic Foot Ulcer Grade II. Ph.D. thesis, College of Science The University of Mustansiriya, 65 pages, Baghdad.

Falagas, M. E., Grammatikos, A. P. and Michalopoulos, A. 2008. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. Expert Rev Anti Infect Ther, 6: 593-600.

Fisher, J. F. and Mobashery, S. 2010. Enzymology of Bacterial Resistance. Comprehensive Natural Products II. Volume 8: Enzymes and Enzyme Mechanisms. Elsevier, 443-487.

Fleitas Martinez, O., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M. and Franco, O. L. 2019. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. Frontiers in cellular and infection microbiology, 9: 74-80.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 12th edition. Mosby Elsevier Publication, pp. 842-846, St. Louis.

Frank, D. W. 2012. Research Topic on Pseudomonas aeruginosa, Biology, Genetics, and Host–Pathogen Interactions. Front Microbiol, 3: 20.

Freeman, L. 1916. Chronic general infection with the Bacillus pyocyaneus. Ann.Surg., 64: 195-202.

Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J. and Levesque, R. C. 2019. The Pseudomonas aeruginosa pan-

genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. Genome biology and evolution, 11: 109-120.

Fujita, M., Tanaka, K., Takahashi, H. and Amemural, A. 1994. Transcription of the principal sigma-factor genes, rpoD and rpoS, in Pseudomonas aeruginosa is controlled according to the growth phase. Molecular microbiology, 13: 1071-1077.

Gailiene, G., Pavilonis, A. and Kareiviene, V. 2007. The peculiarities of Pseudomonas aeruginosa resistance to antibiotics and prevalence of serogroups. Medicina (Kaunas)., 43: 36-42.

Gajdács, M., Burián, K., and Terhes, G. 2019. Resistance levels and epidemiology of non-fermenting gram-negative bacteria in urinary tract infections of inpatients and outpatients (RENFUTI): a 10-year epidemiological snapshot. Antibiotics, 8: 143-148.

Garallah, E. Th. 2015. Molecular analysis of some virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and noncystic fibrosis sources. Master's thesis, University of Mustansiriyah, 111 pages, Baghdad.

Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. 2013. Pseudomonas aeruginosa: New insights intopathogenesis and host defenses. Pathog Dis, 67: 159-173

Gerald, G. B., Roger K. F., and Sumner J. Y. 2011. Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk (9thed). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp. 828, Philadelphia.

Ghaima, K. K., Abdulhassan, A. A., and Mahdi, Z. H. 2018. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in Pseudomonas aeruginosa isolate from burns. Biochem Cell Arch, 18: 721-7.

Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Orlando, F., Mocchegiani, F., D'Amato, G., Silvestri, C., Riva, A., Del Prete M.S., Saba, V. and Scalise, G. 2003. Antiendotoxin activity of antimicrobial peptides and glycopeptides. J Chemother, 15: 129-133.

Gillies, M., Ranakusuma, A., Hoffmann, T., Thorning, S., McGuire, T., Glasziou, P., and Del Mar, C. 2015. Common harms from amoxicillin: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials for any indication. Cmaj, 187: E21-E31.

Giraud, C. and de Bentzmann, S. 2012. Inside the complex regulation of Pseudomonas aeruginosa chaperone usher systems. Environmental microbiology, 14: 1805-1816.

Giraud, C., Bernard, C. S., Calderon, V., Yang, L., Filloux, A., Molin, S., Fichant, G., Bordi, C. and de Bentzmann, S. 2011. The PprA–PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal Pseudomonas aeruginosa chaperone–usher pathway system assembling fimbriae. Environmental microbiology, 13: 666-683.

Goldman, E. and Green, L. H. 2009. Practical Handbook of Microbiology. (2nded). Taylor & Francis Group, pp. 230-244, Boca Raton.

Goljan, E. F. 2011. Rapid Review Pathology (3rded.). Elsevier, pp. 241, Pennsylvania.

Gonzalez, M. R., Fleuchot, B., Lauciello, L., Jafari, P., Applegate, L. A., Raffoul, W. and Perron, K. 2016. Effect of human burn wound exudate on Pseudomonas aeruginosa virulence. Msphere, 1: e00111-15.

Greenwood, D., Barer, M., Slack, R. and Irving, W. 2012. Medical Microbiology. (18thed). Churchill Livingstone, Esevier, pp. 299-301, Edinburgh.

Gruber, T. M., and Gross, C. A. 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annual Reviews in Microbiology, 57: 441-466.

Hachem, R. Y., Chemaly, R. F., Ahmar, C. A., Jiang, Y., Boktour, M. R., Rjaili, G. A. and Raad, I. I. 2007. Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in cancer patients. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51: 1905-1911.

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V. and Grant, G. D. 2016. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa. Toxins, 8: 236-241.

Hamilton, R. J. 2014. Tarascon pharmacopoeia (15th ed.). Jones & Bartlett Publishers, pp. 85, Sudbury.

Hansen, M. C., Nielsen, A. K., Molin, S., Hammer, K. and Kilstrup, M. 2001. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. Journal of bacteriology, 183: 4747-4751.

Harley, J. P. and Prescott, L. M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. (5th.ed).The McGraw-Hill Companies, Inc, pp. 466. NewYork.

Hauser, A. R. 2009. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. Nature Reviews Microbiology, 7: 654-665.

Hauser, A. R. 2013. Antibiotic Basics for Clinicians, (2nded). Wolters Kluwer, p. 26-27.

Hilliam, Y., Kaye, S. and Winstanley, C. 2020. Pseudomonas aeruginosa and microbial keratitis. Journal of medical microbiology, 69: 3-13.

Huszczynski, S. M., Lam, J. S. and Khursigara, C. M. 2020. The role of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. Pathogens, 9: 6-11.

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G. and Gabard, J. 2019. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. The Lancet Infectious Diseases, 19: 35-45.

Jenny, M., and Kingsbury, J. 2018. Properties and Prevention: A Review of Pseudomonas aeruginosa. J Biol Med Res Voffl, 2(3): 18-25.

Jombo, G. T. A., Jonah, P., and Ayeni, J. A. 2008. Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa in contemporary medical practice: findings from urinary isolates at a Nigerian University Teaching Hospital. Nigerian Journal of Physiological Sciences, 23: 1-2.

Jones, C. H., Jacob-Dubuisson, F., Dodson, K., Kuehn, M., Slonim, L., Striker, R. and Hultgren, S. J. 1992. Adhesin presentation in bacteria requires molecular chaperones and ushers. Infection and immunity, 60: 4445-4451.

Kaplan, A. R., Musaev, D. G. and Wuest, W. M. 2021. Pyochelin Biosynthetic Metabolites Bind Iron and Promote Growth in Pseudomonads Demonstrating Siderophore-like Activity. ACS Infectious Diseases, 7: 544-551.

Karlowsky, J. A., Lob, S. H., Young, K., Motyl, M. R. and Sahm, D. F. 2019. Activity of imipenem-relebactam against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from the United States—SMART 2015–2017. Diagnostic microbiology and infectious disease, 95: 212-215.

Keenan, J. E., Speicher, P. J., Thacker, J. K., Walter, M., Kuchibhatla, M. and Mantyh, C. R. 2014. The preventive surgical site infection bundle in colorectal surgery: an effective approach to surgical site infection reduction and health care cost savings. JAMA surgery, 149: 1045-1052.

Kerr, K. G. and Snelling, A. M. 2009. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. Journal of Hospital Infection, 73: 338-344.

King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L. and Lam, J. S. 2009. Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. Innate immunity, 15: 261-312.

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

Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S., Schock, U., Pohl,T. M., Wiehlmann, L. and Tummler, B. 2011. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa PAO1 laboratory strains. J Bacteriol, 192: 1113-1121.

Kodaka, H., Iwata, M.; Yumoto, S. and Kashitani, F. 2003. Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples. Journal of basic microbiology, 43: 407-413.

Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tümmler, B. and Mathee, K. 2005. Characterization of poxB, a chromosomal-encoded Pseudomonas aeruginosa oxacillinase. Gene, 358: 82-92.

Kotlajich, M. V., Hron, D. R., Boudreau, B. A., Sun, Z., Lyubchenko, Y. L., and Landick, R. 2015. Bridged filaments of histone-like nucleoid structuring protein pause RNA polymerase and aid termination in bacteria. Elife, 4: e04970.

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R. and Connolly, L. E. 2016. Aminoglycosides: an overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 6: e027029.

Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A. and Lory, S. 2005. A novel two-component system controls the expression of Pseudomonas aeruginosa fimbrial Cup genes. Molecular microbiology, 55: 368-380.

Kung, V. L., Ozer, E. A. and Hauser, A. R. 2010. The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa. Microbiology and molecular biology reviews, 74: 621-641.

Laina, L., Perrya, J. D., Lee, J., Oliver, M., James, A. L., Foata, C. D. L., Halimi, D., Orenga, S., Galloway, A. and Gould, F. K. 2009. A novel chromogenic medium for isolation of Pseudomonas aeruginosa from the sputa of cystic fibrosis patients. J cyst fibros, 8: 143-149.

Lambert, P. A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J. Royal. Soc. Med, 95: 22-26.

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

Laventie, B. J., Sangermani, M., Estermann, F., Manfredi, P., Planes, R., Hug, I. and Jenal, U. 2019. A surface-induced asymmetric program promotes tissue colonization by Pseudomonas aeruginosa. Cell host & microbe, 25: 140-152.

Leach, K. L., Swaney, S. M., Colca, J. R., McDonald, W. G., Blinn, J. R., Thomasco, L. M., and Mankin, A. S. 2007. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. Molecular cell, 26: 393-402.

Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K. and Kim, B. S. 2005. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. International journal of antimicrobial agents, 25: 290-295.

Lee, K., and Yoon, S. S. 2017. Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. In Journal of Microbiology and Biotechnology, 27: 1053-1064.

Leone, S., Damiani, G., Pezone, I., Kelly, M. E., Cascella, M., Alfieri, A. and Fiore, M. 2019. New antimicrobial options for the management of complicated intra-abdominal infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38: 819-827.

Li, B. and Webster, T. J. 2018. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. Journal of Orthopaedic Research, 36: 22-32.

Li, C., Wally, H., Miller, S. J. and Lu, C. D. 2009. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Journal of bacteriology, 191: 6211-6218.

Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S. and Xie, C. M. 2012. Structure and function of OprD protein in Pseudomonas aeruginosa: from antibiotic resistance to novel therapies. International Journal of Medical Microbiology, 302: 63-68.

Li, J., Turnidge, J., Milne, R.; Milne, R., ROGER L., Nation, R. L. and Coultard, K. 2001. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother, 45: 781-785

Li, Z., Kosorok, M. R., Farrell, P. M., Laxova, A., West, S. E., Green, C. G. and Splaingard, M. L. 2005. Longitudinal development of mucoid Pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. Jama, 293: 581-588.

Lin, Q., Pilewski, J. M. and Di, Y. P. 2020. Cystic Fibrosis Acidic Microenvironment Determines Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa. Frontiers in microbiology, 12: e747834.

Lippa, A. M., Gebhardt, M. J. and Dove, S. L. 2021. H-NS-like proteins in Pseudomonas aeruginosa coordinately silence intragenic transcription. Molecular Microbiology, 115: 1138-1151.

Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical microbiology reviews, 22: 582-610.

Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C. and Plésiat, P. 2011. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of Pseudomonas aeruginosa to ciprofloxacin. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55: 5676-5684.

Lui, Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. and Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance

mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis., 16: 161-168.

Malhotra, S., Hayes Jr, D. and Wozniak, D. J. 2019. Cystic fibrosis and Pseudomonas aeruginosa: the host-microbe interface. Clinical microbiology reviews, 32: e00138-18.

Marks, J., Kannan, K., Roncase, E. J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C. and Mankin, A. S. 2016. Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center. Proceedings of the National Academy of Sciences., 113: 12150-12155.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E. and Lory, S. 2008. Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution. Proc Natl .Acad .Sci. USA., 105: 3100-3105.

Mayhall, C. G. 1999. Hospital epidemiology and infection control. (2nd ed), Lippincott Williams & Wilkins, pp. 189-210, New York.

Meng, L., Zhou, S., Xu, X., Li, D., Lin, Y., Lyu, F. and Dong, M. 2020. A Multi-Scale Approach to Investigate Adhesion Properties of Pseudomonas aeruginosa PAO1 to Geotrichum candidum LG-8, a Potential Probiotic Yeast. Foods., 9: 912-21.

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: 518-523.

Michalska, M. and Wolf, P. 2015. Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. Frontiers in microbiology, 6, 963.

Minoia, M., Gaillard, M., Reinhard, F., Stojanov, M., Sentchilo, V. and van der Meer, J. R. 2008. Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in Pseudomonas. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 20792-20797.

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.

Morello, J. A., Mizer, H. E. and Granato, P. A. 2006. Laboratory manual and work book in microbiology applications to patient care.(18thed), McGraw Hill companies, pp. 89, New York.

Moseley, R. H. 2013. Hepatotoxicity of antimicrobials and antifungal agents. In Drug-induced liver disease. Academic Press, 463-481.

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M. and Lewis, K. 2014. Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Disease. Microbial Ecology, 68: 1-12.

Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2010. DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. Environmental microbiology, 12: 1513-1530.

Munita, J. M. and Arias, C. A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum., 4: 4-12.

Murali, T. S., Kavitha, S., Spoorthi, J., Bhat, D. V., Prasad, A. S. B., Upton, Z. and Satyamoorthy, K. 2014. Characteristics of microbial drug resistance and its correlates in chronic diabetic foot ulcer infections. Journal of medical microbiology., 63: 1377-1385.

Murugan, S., Lakshmi, R. B., Devi, P. U. and Mani, K. R. 2010. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Metallo b-Lactamase producing P.aeruginosa in Diabetic foot infection. Int J Microbiol Res., 1: 123-128.

Nakano, K., Terabayashi, Y., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N. and Ohki, S. 2015. First Complete Genome Sequence of Pseudomonas aeruginosa (Schroeter 1872) Migula 1900 (DSM 50071T), Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. Genome Announc., 3: e00932-15.

Nicastro, G. G., Boechat, A. L., Abe, C. M., Kaihami, G. H. and Baldini, R. L. 2009. Pseudomonas aeruginosa PA14 CupD transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. FEMS microbiology letters, 301: 115-123.

Nicoloff, H., Perreten, V., McMurry, L. M. and Levy, S. B. 2006. Role for tandem duplication and lon protease in AcrAB-TolC-dependent multiple antibiotic resistance (Mar) in an Escherichia coli mutant without mutations in marRAB or acrRAB. Journal of bacteriology, 188: 4413-4423.

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R. and Livermore, D. M. 2011. The emerging NDM carbapenemases. Trends in microbiology, 19: 588-595.

Norgaard-Gron, J. C. 2010. Population dynamics and adaptation of pseudomonas aeruginose during chronic lung infection in cystic fibrosis. Master's thesis, University of Calgary, 92 pages, Calgary.

Ozer, E. A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R. J. and Hauser, A. R. 2019. The population structure of Pseudomonas aeruginosa is characterized by genetic isolation of exoU+ and exoS+ lineages. Genome biology and evolution, 11: 1780-1796.

Palleroni, N. J. 2015. Pseudomonas. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1: 1-8.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. and Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, 37: 177-192.

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. and Jensen, S. O. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clinical microbiology reviews, 31: e00088-17.

Patrick, M., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Emil Lesho, E. and Schaecher, K.2016. Escherichia coli Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of mcr-1 in the USA. Antimicrob Agents and Chemother, 60: 5095-5107.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. and Greenberg, E. P. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91: 197-201.

Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. and Day, M. J. 2004. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. Journal of immunological methods, 286: 203-217.

Petri, W. A. 2011. Penicillins, cephalosporins, and other β-lactam antibiotics. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, (12th Ed), McGraw-Hill, pp. 1477-1504, New York.

Picao, R. C., Poirel, L., Gales, A. C. and Nordmann, P. 2009. Diversity of β-lactamases produced by ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates causing

bloodstream infections in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53: 3908-3913.

Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. and Ohman, D. E. 2001. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid Pseudomonas aeruginosa to opsonic phagocytosis. Infection and immunity, 69: 1895-1901.

Pitt, T. L. 1998. Pseudomonas, Burkholderia and related genera. In B. I. Duerden(ed), Microbiology and microbial infections, pp. 1109-1138, New York.

Pogue, J. M., Ortwine, J. K. and Kaye, K. S. 2017. Clinical considerations for optimal use of the polymyxins: a focus on agent selection and dosing. Clinical Microbiology and Infection, 23: 229-233.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. and Marchand, C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chem. Biol., 17 : 421-433.

Potvin, E., Sanschagrin, F. and Levesque, R. C. 2008. Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa. FEMS microbiology reviews, 32: 38-55.

Poulsen, B. E., Yang, R., Clatworthy, A. E., White, T., Osmulski, S. J., Li, L. and Hung, D. T. 2019. Defining the core essential genome of Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116: 10072-10080.

Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. and Newman, D. K. 2006. Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. Nature chemical biology, 2: 71-78.

Priya, S. and Anitha, K. 2013. Immuno and Molecular screening of Pseudomonas aeruginosa from selected infection. Microbiol. App. Sci., 2: 219-222

Procop, G., Church, D., Hall, G., Janda, W., Koneman, E., Schreckenberger, P. and Woods, G. 2016. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. (7th ed.), Lippincott Williams and Willkins, pp. 1684-637, Baltimore.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. 2004. Clinical Veterinary Microbiology, Mosby, pp. 21-63, London.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and biophysical research communications, 313: 856-862.

Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A. and Franco, O. L. 2017. Bacterial contribution in chronicity of wounds. Microbial ecology., 73: 710-721.

Rajwar, A. and Sahgal, M. 2016. Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, Pseudomonas-specific and rpoD genes. 3 Biotech, 6, 80-90.

Ranjan, K. P., Ranjan, N., Bansal, S. K. and Arora, D. R. 2010. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. Journal of laboratory physicians, 2: 74-77.

Rebouças, E. D. L., Costa, J. J. D. N., Passos, M. J., Passos, J. R. D. S., Hurk, R. V. D. and Silva, J. R. V. 2013. Real time PCR and importance of housekeepings genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. Brazilian Archives of Biology and Technology, 56: 143-154.

Rehman, A. 2020. Evolution of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa Ph.D. thesis, University of Otago, 313 pages, Dunedin.

Richards, D.M. and Brogden, R. N. 1985. Ceftazidime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs, 29: 105-161.

Rocha, A. J., Barsottini, M. R. D. O., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., Moraes, F. L. L. D. and Rocha, S. L. D. 2019. Pseudomonas aeruginosa: virulence factors and antibiotic resistance genes. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62, 1-5.

Rolinson, G.N. 1982. The history and background of augmentin. S Afr Med J, 62: 3-4.

Rossolini, G. M. and Mantengoli, E. 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clinical Microbiology and infection, 11: 17-32.

Ruer, S., Ball, G., Filloux, A. and De Bentzmann, S. 2008. The 'Pusher', a novel protein transporter involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. The EMBO journal, 27: 2669-2680.

Ruer, S., Stender, S., Filloux, A. and de Bentzmann, S. 2007. Assembly of fimbrial structures in Pseudomonas aeruginosa: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. Journal of bacteriology, 189: 3547-3555.

Ruiz, J., 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J. Antimicrob. Chemother., 51: 1109-1117.

Sabnis, A., Hagart, K. L., Klöckner, A., Becce, M., Evans, L. E., Furniss, R. C. D. and Edwards, A. M. 2021. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. Elife, 10, e65836.

Saeed, A., D'Arcy, F., Stack, J., Collum, L. M., Power, W. and Beatty, S. 2009. Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. Cornea, 28: 285-292.

Sainz-Mejas, M., Jurado-Martín, I. and McClean, S. 2020. Understanding Pseudomonas aeruginosa–Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. Cells, 9: 2617-2621.

Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U. and Vahaboglu, H. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of Pseudomonas aeruginosa by real-time quantitative RT-PCR. Journal of medical microbiology, 52: 403-408.

Schmidtchen, A., Holst, E., Tapper, H. and Björck, L. 2003. Elastase-producing Pseudomonas aeruginosa degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. Microbial pathogenesis, 34: 47-55.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature protocols, 3: 1101-1108.

Schroder, O. and Wagner, R. 2000. The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. Journal of molecular biology, 298: 737-748.

Schurek, K. N., Breidenstein, E. B., and Hancock, R. E. 2012. Pseudomonas aeruginosa: a persistent pathogen in cystic fibrosis and hospital-associated infections. In Antibiotic discovery and development. Springer, 679-715.

Shah, D. A., Wasim, Sh. and Abdullah, F. E. 2015. Antibiotic resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa isolated from urine samples of Urinary Tract Infections patients in Karachi, Pakistan. Pak J Med Sci, 31: 341–345.

Shahid, M., Malik, A. and Sheeba. 2003. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains harbouring R-plasmids and AmpC β-lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. FEMS Microbiol. Lett., 228: 181-186.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. and Kamal, M. A. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi journal of biological sciences, 22: 90-101.

Sharma, M., Pathak, S. and Srivastava, P. 2013. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella spp. J Clin Diagn Res, 7: 2173–2177.

Shintani, M., Suzuki-Minakuchi, C. and Nojiri, H. 2015. Nucleoid-associated proteins encoded on plasmids: occurrence and mode of function. Plasmid, 80: 32-44.

Spratt, B. G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science, 264: 388-393.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A. and Olson, M. V. 2000. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406: 67-69.

Strohl, W. R. 1997. Antibiotic Development and Resistance. Biotech Antibiotics. Marcel Dekker Inc, pp. 264, New York.

Subedi, D., Kohli, G. S., Vijay, A. K., Willcox, M. and Rice, S. A. 2019. Accessory genome of the multi-drug resistant ocular isolate of Pseudomonas aeruginosa PA34. PloS one., 14: e0215038.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L. and Zorzet, A. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases, 18: 318-327.

Tan, J.S. and File, T.M. 1995. Antipseudomonal penicillins. Med. Clin. North Am., 79: 679-693.

Tanaka, K., and Takahashi, H. 1991. Cloning and analysis of the gene (rpoDA) for the principal σ factor of Pseudomonas aeruginosa. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1089: 113-119.

Terra, A. C. G., and Salvador, E. A. 2020. In silico integrative analysis predicts relevant properties of exotoxin-derived peptides for the design of vaccines against Pseudomonas aeruginosa. Infection, Genetics and Evolution, 85, 104424.

Thomson, J. M. and Bonomo, R. A. 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β-lactams in peril. Curr. Opin. Microbiol., 8: 518-524

Todar, K. 2011. Pseudomonas aeruginosa. Textbook of Bacteriology. Science Magazine, 304: 14-21.

Trøstrup, H., Lerche, C. J., Christophersen, L. J., Thomsen, K., Jensen, P. Ø., Hougen, H. P., Høiby, N. and Moser, C. 2017. Chronic Pseudomonas aeruginosa biofilm infection impairs murine S100A8/A9 and neutrophil effector cytokines-implications for delayed wound closure?. Pathogens and disease, 75: 381-395.

Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Cámara, M., Ventre, I., Lory, S. and Filloux, A. 2004. Biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa: fimbrial Cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. Journal of bacteriology, 186: 2880-2890.

Vallet-Gely, I., Donovan, K. E., Fang, R., Joung, J. K. and Dove, S. L. 2005. Repression of phase-variable Cup gene expression by H-NS-like proteins in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 11082-11087.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P. and Heuck, C. C. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. (2nd ed). World Health Organization, Geneva., 188: 78-82.

Vardakas, K. Z., Tansarli, G. S., Rafailidis, P. I. and Falagas, M. E. 2012. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother, 67: 2793-2803.

Voynow, J. A., Fischer, B. M. and Zheng, S. 2009. Proteases and Cystic Fibrosis. Int J Biochem Cell Biol, 40: 1238-1245.

Wagemans, J., Delattre, A. S., Uytterhoeven, B., De Smet, J., Cenens, W., Aertsen, A. and Lavigne, R. 2015. Antibacterial phage ORFans of Pseudomonas aeruginosa phage LUZ24 reveal a novel MvaT inhibiting protein. Frontiers in microbiology, 6: 1242-1244.

Westfall, L. W., Carty, N. L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J. A. and Hamood, A. N. 2006. mvaT mutation modifies the expression of the Pseudomonas aeruginosa multidrug efflux operon mexEF-oprN. FEMS microbiology letters, 255: 247-254.

Williams, E. A., Marsden, A. E. and Yahr, T. L. 2019. H-NS family members MvaT and MvaU regulate the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system. Journal of bacteriology, 201: e00054-19.

Winardhi, R. S., Fu, W., Castang, S., Li, Y., Dove, S. L. and Yan, J. 2012. Higher order oligomerization is required for H-NS family member MvaT to form gene-silencing nucleoprotein filament. Nucleic acids research, 40: 8942-8952.

Wolter, D. J., Hanson, N. D. and Lister, P. D. 2004. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol. Lett., 236: 137-143.

Yang, W., Moore, I. F., Koteva, K. P., Bareich, D. C., Hughes, D. W. and Wright, G. D. 2004. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. Journal of Biological Chemistry, 279: 52346-52352.

Yoneyama, H., and Katsumata, R. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Bioscience, biotechnology, and biochemistry., 70: 1060-1075.

Zafer, M. M., Al-Agamy, M. H., El-Mahallawy, H. A., Amin, M. A. and Ashour, M. S. 2014. Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Cancer Patients. Biomed Res Int, 101635: 23-31.

Zhanel, G. G., DeCorby, M., Laing, N., Weshnoweski, B., Vashisht, R., Tailor, F. and Hoban, D. J. 2008. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52: 1430-1437.

Zimmerman, H. J. 1999. Penicillins. In, Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. (2nd ed), Lippincott, pp. 595-606, Philadelphia.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Sura YAHYA RAHEEM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Bilim Fakültesi Biyoteknoloji Bölüm	2013-2017