ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PSEUDOMONAS AERUGINOSA'DA ANTİBİYOTİK STRES ALTINDA ALGD GEN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI tarafından hazırlanan **"Pseudomonas Aeruginosa'da Antibiyotik Stres Altında AlgD Gen Ekspresyonunun İncelenmesi"** adlı tez çalışması 19/07/2022 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 Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN

Eş Danışman : Prof. Dr. Harith J. F. AL-MATHKHURY

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. SERHAT SİREKBASAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi KEVSER KUŞAT
Kimya Anabilim Dalı
Dokuz Eylül 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 "**Pseudomonas aeruginosa'da Antibiyotik Stres Altında AlgD Gen Ekspresyonunun İncelenmesi**" 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 (19/07/2022).

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PSEUDOMONAS AERUGINOSA'DA ANTİBİYOTİK STRES ALTINDA ALGD GEN EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Harith J. F. AL-MATHKHURY

P. aeruginosa'nın, çok çeşitli virülans faktörleri ile donatılmış çoklu ilaca dirençli bir patojendir. Aljinat, *P. aeruginosa'nın* önemli virülans faktörlerinden birini temsil etmekte olup, biyofilmin hücre dışı matris malzemesi olarak işlev gördüğünden terapötik zorluğu karmaşıklaştırır ve artırır. Sonuç olarak, bu çalışma, antibiyotik stresi altında eksprese edilen *algD* geninin miktarını tespit etmeyi amaçlamıştır. *AlgD* gen ekspresyonunun kontrol edilmesi, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma kapasitesini azaltabilir; böylece terapötik zorluğu azaltır. Bu çalışmada toplam 175 klinik örnek toplanmış, sadece 50 izolat *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, en yüksek izolasyon yüzdesi sırasıyla yanık ve yara örneklerinden %56 ve %44 olarak gözlemlenmiştir. Disk Difüzyon yöntemi, Amikasin direncinin (%36), ardından Seftazidim (%24), Gentamisin (%22), Sefepim (%18) ve son olarak İmipenem (%2) olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca tüm izolatlar Siprofloksasin ve Meropenem'e duyarlı olarak gözlemlenmiştir. Çoğu izolat 128 µg/mL MIK geliştirmiştir. İlgi çekici olan, bu çalışmada *P. aeruginosa'nın* tüm izolatları biyofilm oluşturmuştur; burada sırasıyla 38, 9 ve 3 izolat zayıf, orta ve güçlü biyofilmler geliştirmiştir. PCR çalışması, 15 *P. aeruginosa* izolatından 10'unda *algD* tespit edildiğini ortaya koymuştur. Tüm bu on izolat, alt MİK'te Amikasin ile tedavi edildiğinde azaltılmış bir biyofilm sunsa da qPCR sonuçları, *algD'nin* toplam altı izolatta (PA8, PA35, PA47, PA49, PA39, PA44) yukarı regüle edildiğini gösterirken, diğer dört izolatta (PA1, PA19, PA27, PA36) aşağı regüle edildiğini göstermiştir.

2022, 88 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa*, Biyofilm, Aljinat, *AlgD* gen, Antibiyotikler, MİK

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATING THE *ALGD* GENE EXPRESSION UNDER ANTIBIOTICS STRESS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Harith J. F. AL-MATHKHURY

Obviously, *P. aeruginosa* is a multi-drug pathogen equipped with wide range of virulence factors. Alginate represented one of important virulence factors of *P. aeruginosa* being acts as an extracellular matrix material of biofilm; a matter complicates and increase the therapeutic challenge. Consequently, the present study aimed to detecting the amount of *algD* gene expressed under the stress of antibiotics. Thus, controlling *algD* gene expression may reduce the capacity of *P. aeruginosa* to establish biofilm; thereby reduce the therapeutic challenge. A total of 175 clinical specimens were collected, only 50 isolates were identified as *P. aeruginosa*. However, the highest percentage of isolation were 56% and 44% from burn and wound specimens, respectively. A Disk Diffusion method showed that the resistance to Amikacin was the most frequent (36%), followed by Ceftazidime (24%), Gentamicin (22%), Cefepime (18%), and finally Imipenem (2%). What's more, all isolates were sensitive to Ciprofloxacin and Meropenem. Most isolates developed MIC of 128 µg /mL. of interest, all isolates of *P. aeruginosa* in this study formed biofilm; where, 38, 9, and 3 isolates developed weak, moderate, and strong biofilms, respectively. PCR study revealed that out of 15 *P. aeruginosa* isolates, *algD* was detected in 10 isolates. Albeit all these ten isolates presented a reduced biofilms when treated with Amikacin at sub-MIC, the results of qPCR demonstrated that the *algD* was upregulated in six isolates (PA8, PA35, PA47, PA49, PA39, PA44) and in the other four isolates (PA1, PA19, PA27, PA36) showed a downregulation in the expression of *algD*.

2022, 88 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Alginate, *AlgD* gene, Antibiotics, MIC

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

“Pseudomonas aeruginosa'da Antibiyotik Stresi Altında AlgD Gen Ekspresyonunun İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Derecesi Gereksinimlerini Karşılamak üzere sunulmuştur. Bu araştırmanın amacı, antibiyotikler stres altında eksprese eden *algD* genini nicel olarak tahmin etmektir.

Öncelikle bana bu çalışmayı başlatma ve tamamlama gücü verdiği için Tanrı'ya şükrediyorum. Bu çalışmayı onayladıkları için Çankırı Karatekin Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ediyor, çalışmam ve tez yazım sırasında bana tavsiye ve destek veren, doğru yöntemlere yönlendiren danışmanlarım Dr. Öğretim Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN ve Prof. Dr. Harith J. F. AL-MATHKHURY’ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Kendilerine yönlendirdiğim tüm soruları her zaman büyük bir istekle yanıtladılar ve bana yönlendirdikleri öneriler kendimi takip edebilmem adına çok yardımcı oldu. Çalışmalarım hakkında esirgemediğiniz rehberliğiniz, destekleriniz ve geri bildirimleriniz için teşekkür ederim. Ayrıca bana en iyi desteği veren sınıf arkadaşlarıma teşekkür ediyorum, yanımda olmanız paha biçilemez.

Son olarak, bu eserimi, istisnai bir ebeveyn olan, eğitimime ve sağlığıma her zaman büyük önem veren babama (Allah ona rahmet etsin) ithaf ediyorum ve aileme; annem, güzel karım, çocuklarıma en derin şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca kardeşlerime de teşekkür etmek istiyorum. Desteğiniz ve sürekli dualarınız için teşekkür ederim ailem.

Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

Çankırı, Temmuz 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Çalışmanın Hedefi **3**
2 LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 *Pseudomonas Aeruginosa* **4**
2.2 *P. Aeruginosa* Patojenitesinin Mekanizmaları **5**
2.2.1 Quorum sensing- (QS) **5**
2.2.2 Aljinat **6**
2.3 *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Direnç Mekanizmaları **12**
2.3.1 İçsel antibiyotik direnci **13**
2.3.2 Edinsel antibiyotik direnci **13**
2.3.3 Adaptif antibiyotik direnci **15**
2.4 Biyofilm Yapısı ve Oluşumu **15**
3 MATERYAL VE METOT **23**
3.1 Ekipman ve Aletler **23**
3.2 Kimyasal ve Biyolojik Materyaller **23**
3.3 Antibiyotikler ve Antibiyotik Diskler **24**
3.4 Kitler **25**
3.5 Primer Dizileri **25**
3.6 Kültür Ortamı (Besiyeri) **26**
3.7 Kültür Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu **26**
3.8 Laboratuvarda Hazırlanan Ortam **27**
3.8.1 Kanlı agar **27**
3.8.2 Setrimid agar **27**

3.9 Mevcut Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Reaktifler 27
3.9.1 Kristal viyole solüsyonları 27
3.9.2 Katalaz reaktifi 27
3.9.3 Etidyum bromür boyası 28
3.9.4 Oksidaz reaktifi 28
3.9.5 Tris borat EDTA tamponu (TBE, IX) 28
3.9.6 Magnezyum sülfat $MgSO_4$ 1M 28
3.9.7 McFarland standardı (0,5) 28
3.10 Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması 29
3.10.1 Numune toplama ve bakteri izolasyonu 29
3.10.2 *P. aeruginosa*'nın tanımlanması 29
3.11 *P. aeruginosa'nın* Korunması ve Bakımı 31
3.11.1 Kısa süreli muhafaza 31
3.11.2 Orta süreli muhafaza 31
3.11.3 Uzun süreli muhafaza 31
3.12 Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT) 31
3.13 Amikasinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi 32
3.14 Biyofilm Oluşum Testi 33
3.15 Antibiyotiğin Alt-MİK'inin Biyofilm Oluşumuna Etkisi 35
3.16 *AlgD* Tespiti 35
3.16.1 DNA ekstraksiyonu 36
3.16.2 DNA miktar tayini 36
3.16.3 Öncül (primer) hazırlığı 37
3.16.4 PCR reaksiyonu ve termal döngü protokolü 37
3.16.5 Agaroz jel elektroforezi 38
3.17 *AlgD*'nin Gen İfadesi 39
3.17.1 RNA pürifikasyonu 39
3.17.2 RNA ve cDNA veriminin belirlenmesi 40
3.17.3 Primer hazırlığı 40
3.18 İstatistiksel Analiz 42
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 43
4.1 *P. Aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Tanımlanması 43

4.2 *P. Aeruginosa*'nın Antibiyotik Duyarlılığı 45
4.3 *P. Aeruginosa* İçin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) 51
4.4 Biyofilm Oluşumunun Tespiti..... 53
4.5 Amikasinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi 57
4.6 *AlgD* Geninin Tespiti 60
4.7 *AlgD* İfadesi 62
4.7.1 Rölatif ölçme..... 62
5.1 SONUÇ 65
5.2 ÖNERİLER..... 65
KAYNAKLAR 67
EKLER..... 83
ÖZGEÇMİŞ..... 88

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre

KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	Tamamlayıcı DNA
CRP	C-reaktif protein
eDNA	Ekstraselüler deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkaritler
KCl	Potasyum klorür
LPS	Lipopolisakkaritler
ÇİD	Çoklu ilaç dirençli
MST	Mikro seyreltme testi
OD	Optik yoğunluk
OMV	Dış zar veziküller
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PMOL	Pikomol
QS	Çevreyi algılama
RNA	Ribonükleik asit
RND	Direnç-nodülasyon- hücre bölünmesi
RT-qPCR	Ters transkripsiyon-kantitatif PCR
SD	Standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Aljinat biyosentetik operonu ve önerilen biyosentetik modeli 7
Şekil 2.2 Biyofilm gelişiminin beş aşamasının temsili 20
Şekil 4.1 *P. aeruginosa* izolatları tarafından biyofilm oluşumunun kutu grafiği. 58
Şekil 4.2 *P. aeruginosa* örneklerinin *algD* genlerinin amplifikasyon sonuçları 61
Şekil 4.3 Alt-MİK'de amikasin stresi altında *P. aeruginosa* izolatlarında *algD* geni oranların değişimi 64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan ekipman ve aletler 23
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik materyaller 24
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve antibiyotik diskler 25
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kitler 25
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler 26
Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan besiyerleri 26
Çizelge 3.7 Mikrotiter plak yöntemi ile bakteri yapışmasının sınıflandırılması 34
Çizelge 3.8 Reaksiyon karışımının bileşenleri 37
Çizelge 3.9 PCR amplifikasyon programı 38
Çizelge 3.10 qRT-PCR için reaksiyon karışımının bileşenleri 41
Çizelge 3.11 AlgD gen ekspresyonunda kullanılan qRT-PCR amplifikasyon programı 41
Çizelge 4.1 Örnek tipine göre çalışılan izolat sayıları ve yüzdeleri 43
Çizelge 4.2 *P. aeruginosa*'nın morfolojik ve biyokimyasal tanımlaması 44
Çizelge 4.3 Örnek tipine göre *P. aeruginosa* izolatlarının ve diğer türlerinin sayı ve yüzdeleri 45
Çizelge 4.4 P. aeruginosa için disk difüzyon testi 47
Çizelge 4.5 *P. aeruginosa*'nın antibiyotik grup tiplerine karşı direnç yüzdesi duyarlılığı (50 izolat) 48
Çizelge 4.6 Kullanılan antibiyotiklere karşı her bir izolatın duyarlılık ve dirençlilik durumu 49
Çizelge 4.7 P. aeruginosa'nın çoklu ilaca dirençli, orta düzeyde direnç ve duyarlılık yüzdesi 51
Çizelge 4.8 Amikasinin P. aeruginosa izolatları üzerindeki MİK etkisi 52
Çizelge 4.9 Amikasin MİK ve örnek tipine göre P. aeruginosa izolat sayısı 53
Çizelge 4.10 P. aeruginosa için biyofilm oluşum testi sonuçları 54
Çizelge 4.11 İzolat kaynağına göre P. aeruginosa biyofilm yoğunluğunun yüzdesi 55
Çizelge 4.12 P. aeruginosa izolatlarının biyofilm yoğunluğu ve Amikasin MİK sunuçları 56
Çizelge 4.13 Alt-MİK'te Amikasin stresi altında biyofilm yoğunluğu 59
Çizelge 4.14 RNA konsantrasyonu (ng/µL) 61
Çizelge 4.15 P. aeruginosa'da algD geninin gen ifadesi ve oran değişimi 63

1 GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonadaceae familyasına ait, çok çeşitli ortamlarda yaşayabilen Gram negatif bir bakteridir (Silby *et al*. 2011). *P. aeruginosa* solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, yanık enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar, keratit, orta kulak iltihabı ve bakteriyemiye neden olabilen fırsatçı bir patojendir. Fırsatçı bir patojen olmasına rağmen, bağışıklığı yeterli bir insan konakçı ile temas ettiğinde, *P. aeruginosa* tipik olarak hiçbir tehdit oluşturmaz (Lang *et al*. 2004). Bununla birlikte, kanser hastaları, yanık kurbanları ve kistik fibrozlu hastalar gibi bağışıklığı baskılanmış kişiler bu patojenle enfeksiyona karşı daha savunmasızdır (Hirsch and Tam 2010). Birçok antimikrobiyallere karşı yüksek toleransı nedeniyle, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar yaşamı tehdit eder ve tedavisi oldukça zordur (Samad *et al*. 2017).

Diğer bakteri dizileri ile karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa*'nın (5,5-7 Mbp) genomu nispeten büyüktür. *P. aeruginosa* genomunun bu geliştirilmiş kodlama kapasitesi çevredeki değişkenlere yüksek düzeyde uyum ve büyük ölçüde çok yönlülük sağlar (Klockgether *et al*. 2011).

İlaç tedavisi sırasında gereksiz antibiyotik kullanımı, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarının seçilimini arttırarak, mikroorganizmaya karşı ampirik antibiyotik tedavisinin etkisiz kalmasına neden olur. Dolayısıyla, bu bakterinin mevcut antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme yeteneği nedeniyle, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi büyük bir zorluk haline gelir (Pang *et al*. 2019). Son zamanlarda, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'yı enfeksiyonların tedavisi için yeni antibiyotik üretiminin önemli ve gerekli olduğu üç bakteriyel organizmadan biri olarak sınıflandırmıştır (Tacconelli *et al*. 2018).

P. aeruginosa, doğal olarak konağının farklı bölgelerini başarılı bir şekilde kolonize etmesine izin veren çoklu virülans faktörleri içerdiğinden çeşitli antibiyotiklere dirençlidir. Bu virülans faktörlerinden biri aljinattır, Bakteriyel aljinat, pl-4 glikosidik

bağlar, D-mannuronik asit ve bunun C-5 epimeri L-guluronik asitten oluşan lineer bir eksopolisakkarittir. (Chitnis and Ohman 1990, Theagarajan *et al*. 2019). *P. aeruginosa* aljinat, klinik antibiyotiklerin yayılmasını sınırlayan ve hücreleri insan antibakteriyel savunma mekanizmalarından koruyan farklılaşmış biyofilmlerin oluşumuna izin veren hücre dışı bir matris malzemesi olarak işlev görür (Monday and Schiller 1996, Lyczak *et al*. 2002).

AlgD operonu 12 gen içerir; *algD*, bu operonda GDP-mannoz dehidrojenazı kodlayan ilk gendir. Aljinat üretimi için *algD*'nin transkripsiyonel aktivasyonu gerektiğinden, *algD*, aljinat sentezinde birincil kontrol adımı olarak kabul edilir. Antibiyotikler, *algD* geninin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinde farklılık gösterir. *AlgD* geni, aljinatın biyosentezinde önemli bir rol oynar (Ohman 2009).

P. aeruginosa, olumsuz çevresel koşullara olan direnci, oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbidite oranı ve kliniğe olan yansımaları vb. çeşitli nedenlerle üzerinde çalışılması gerekli olan bir organizmadır. *P. aeruginosa*, toprak ve su gibi çok çeşitli ortamlara uyum sağlama ve insan akciğerine, derisine, kulağına ve gözüne şaşırtıcı bir şekilde girme yeteneğine sahiptir. Enfeksiyon ve hastalıkta önemi giderek artan biyofilmlerin kayda değer ve önemli bir bileşenidir. Ek olarak, *P. aeruginosa* antibiyotik direnci insidansı giderek artmakta ve fırsatçı bir patojen olarak hızla ün kazanmaktadır. (Meletis and Bagkeri 2013). Son yıllarda matriks ekzopolisakkaritlerinin biyofilmlerin temel bileşenleri olarak tanımlanmış olmalarına rağmen, bu ekzopolisakkaritleri kodlayan genlerin uzamsal ve zamansal diferansiyel ekspresyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Ekzopolisakkaritlerin üretimi hakkında bilgi, *P. aeruginosa*'nın yayılmayı ve etkilenmeyi nasıl önlediğine dair farkındalığı artırır. Bu nedenle ekzopolisakkaritlerin oluşumundan sorumlu aljinatın oluşumunda büyük rol oynayan *algD* geninin gen ekspresyonu üzerinde en fazla etkiye sahip antibiyotiklerin araştırılması gerekmektedir.

P. aeruginosa, bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir insan patojeni olduğu için tıbbi bir öneme sahiptir. Bakterilerin yayılma ve antibiyotiklere direnç gösterme gücü, çok çeşitli virülans

faktörleri içermelerinden kaynaklanmaktadır ve bu faktörlerden en önemlisi alijinattır. Aljinat, ekzopolisakkaritlerin oluşumundan, dolayısıyla biyofilm oluşumundan sorumludur, bu da antibiyotiklerin bakterilere yayılmasını ve vücudun bakterilere karşı direncinin etkilenmesini engeller. Bu türün biyofilm oluşumunu, bakteri yayılımını ve etkisini azaltmanın yanı sıra antibiyotik direnci geliştirmeye devam ettiği göz önüne alındığında, bu yüzden daha fazla çalışması yap gerekmektedir.

Bu tez aşağıdaki soruları cevaplamayı amaçlamaktadır:

- *P. aeruginosa*'nın farklı izolatlarında *algD* ne kadar ifade edilir?
- Biyofilm yoğunluğu ve *algD* ifadesi arasındaki ilişki nedir?
- Alt MİK'teki antibiyotik stresinin *algD* ifadesi üzerindeki etkisi nedir?

1.1 Çalışmanın Hedefi

- Hastalıkların yayılmasını ve nedenlerini sınırlamadaki önemi nedeniyle bilimsel, tıbbi ve araştırma gerçekliğinin ilerlemesine katkıda bulunmak.
- *P. aeruginosa'nın* patojenitesinin azaltılmasına katkıda bulunmak.
- *P. aeruginosa*'nın yayılmasında önemli bir virülans faktörü olan Ekzopolisakkarit oluşumunu önlemede en etkili antibiyotikleri bilmek
- Antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunun stresi altında ifade edilen *algD* geni miktarının saptanması. Sonuç olarak, *algD* gen ekspresyonunun kontrol edilmesi, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma kapasitesini azaltabilir; böylece virülanslarını ve antibiyotik dirençlerini azaltırlar.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Pseudomonas Aeruginosa*

P. aeruginosa, toprakta ve suda yaygın olarak bulunan fırsatçı bir Gram negatif aerobik bakteridir. (Tiwari *et al*. 2017). *P. aeruginosa* kendi cinsindeki yaklaşık 53 türün en yaygınlarından birisidir. Çubuk şeklindeki ve 0,5-0,8 μm x 1,5-3,0 μm boyutlarındaki bu bakteriler, hareketlilik için genellikle bir polar flagellum'a sahiptir. Bu bakteriler fırsatçıdır ve genellikle zayıflamış dokuları veya bağışıklığı baskılanmış bireyleri etkiler. *P. aeruginosa*, ilk kez 19. yüzyılın ortalarında, bu bakterilerin oluşturduğu pigmentlerin bandajlarda neden olduğu mavi ve yeşil renk değişikliği nedeniyle cerrahi yara örtülerinde ilk kez tanımlanmıştır. Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) türleri, antibiyotiğe dirençli bir patojen olarak ün salmıştır ve bu dirençli kökenler karbapenemler dahil hemen hemen tüm antibiyotiklere dirençlidir (Yokoyama *et al*. 2018).

P. aeruginosa, Gram negatif bakteriyemilerin %15'ine ve hastane kaynaklı enfeksiyonların %10'una sebep olmaktadır (Rosenthal. *et al*. 2016, Theagarajan *et al*. 2019). *P. aeruginosa* en yaygın hastane patojenleri arasındadır (Gellatly and Hancock 2013). *P. aeruginosa*, antimikrobiyallere olan toleransı ve düşük besin koşullarında hayatta kalabilme yetenekleri nedeniyle hastane enfeksiyonları arasında en yaygın dördüncü enfeksiyon olarak gözlemlenmektedir (Lyczak *et al*. 2002). Pnömoni, orta kulak iltihabı, keratit, gastrointestinal enfeksiyonlar ve folikülite ek olarak, yara ve idrar yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir (Gellatly and Hancock 2013). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının büyüklüğünden dolayı değil, aynı zamanda onu enfekte eden çok çeşitli dokulardan dolayı, burada *P. aeruginosa* genomu, adaptasyon kabiliyetine ve metabolik çok yönlülüğüne katkıda bulunur. *P. aeruginosa*, genomik plastisite bölgelerinin yanı sıra farklı suşlarda korunmuş genlerin 'çekirdek' bölgelerini içeren, bilinen en büyük bakteri genomlarından birine sahiptir (Gellatly and Hancock 2013).

2.2 *P. Aeruginosa* Patojenitesinin Mekanizmaları

P. aeruginosa, konak organ ve doku yoluyla tutunma, kolonizasyon, sonlandırma ve yayılma için kullandığı çeşitli mekanizmaları ve virülans faktörlerine sahiptir (Almarzoqi *et al*. 2016). *P. aeruginosa* hem hücre yüzeyi bileşenleri (lipopolisakkaritler, flagella, fimbria, lektinler, mukus) hem de hücre dışı bileşenleri (eksotoksin A; ekzoenzimler S, T, U ve Y; tip IV proteaz, alkalin proteaz, nöraminidaz, elastaz, fosfolipaz ve pigment piyosiyanin) olmak üzere birçok virülans faktörü içermektedir (Alhazmi 2015). Aljinat, proteazlar, ramnolipid, metabolitler, fenazinler, piyosiyanin ve lipopolisakkarit gibi virülans faktörleri *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında önemli roller oynar (Rada and Leto 2013).

Çalışmalar, akut enfeksiyonlardan izole edilen *P. aeruginosa*'nın fenotip açısından kronik enfeksiyonlardan izole edilenlerden önemli ölçüde farklı olduğunu göstermiştir. Akut enfeksiyonlardan gelen izolatlar birçok virülans faktörüne sahipken, Kistik Fibroz akciğeri gibi kronik enfeksiyonlardan gelen birçok izolat, flagella ve pili gibi inflamatuar bakteriyel özelliklerin bazılarından yoksundur ve tip 3 salgılama sistemi gibi diğer virülans mekanizmaları aşağı regüle edilmiştir (Smith *et al*. 2006, Hogardt and Heesemann 2010). Ek olarak, kronik enfeksiyonlardan elde edilen izolatların, biyofilmleri daha kolay oluşturduğu ve ekzopolisakkarit aljinatı aşırı eksprese ettiği ve bu suşların mukoid hale gelmesine izin verdiği gösterilmiştir (Kipnis *et al*. 2006).

2.2.1 Quorum sensing- (QS)

Quorum sensing (QS-Çevreyi algılama), birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri tarafından, spesifik genlerin ekspresyonu ve mikrobiyal topluluğun yoğunluğunu ayarlamak gibi farklı faktörleri algılamak ve bunlara yanıt vermek için kullanılan genel bir düzenleyici mekanizmadır. *P. aeruginosa*'daki QS, hücrelerin yoğunluğunu kontrol etmek, virülans faktörlerinin üretimini düzenlemek, biyofilm oluşumunu indüklemek ve çevredeki değişiklikleri ve besin kullanılabilirliğini izlemek için kullanılan karmaşık bir sistemdir. QS, patojenik bakteriler için dokuya zarar veren virülans faktörlerinin üretimini bakteriler birikip konak savunma mekanizmalarını çözmeye ve enfeksiyona

neden olmaya hazır olana kadar geciktirerek konakçı bağışıklık tepkilerini en aza indirmek için bir yöntem sağlar (Deep *et al*. 2011).

P. *aeruginosa*'daki virülans, biyofilm oluşumu ve diğer bazı süreçlerin birbirine bağlı iki Quorum sensing sisteminde yer aldığı gösterilmiştir. Birinci sistem (Las), lasI ile kodlanmış bir asil-HSL sentaz ve lasR ile kodlanmış transkripsiyonel aktivatörden oluşur. İkinci sistem (Rhl), bir rhl I kodlu asil-HSL sentaz ve bir rhlR kodlu transkripsiyonel aktivatörden oluşur (Deep *et al*. 2011). *P*. *aeruginosa*'da patojenik virülans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu, QS ile düzenlenir. LasR, lasI, rhlR ve rhlI genlerinin QS'yi düzenlediği bulunmuştur. *P*. *aeruginosa*'da biyofilm oluşumu ile quorum algılanması arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Aboushleib *et al*. 2015).

Biyofilm üretimi için *P*. *aeruginosa*'nın hareketli durumundan durağan durumuna geçişi ve tekrar geri dönüşü, Las ve Rhl'nin çekirdek algılama sistemleri aracılığıyla hücreden hücreye sinyalleşmeye ve antibiyotikler gibi çevresel göstergelere bağlıdır.

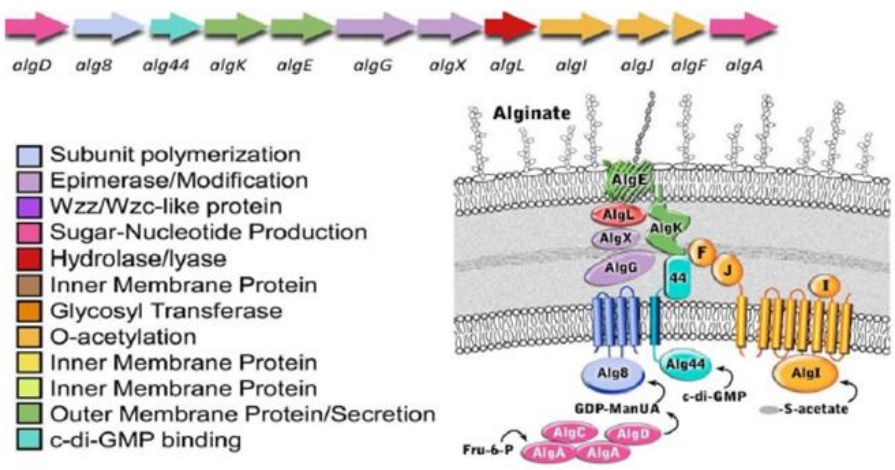
Örneğin, aljinat polisakaritin uyarılmış ifadesi nedeniyle, antibiyotik imipenem'in biyofilmlerin kalınlaşmasına neden olduğu gösterilmiştir. *P*. *aeruginosa* EPS için bağlanmadan sonra üç polisakkarit üretilir, bakteriler biyofilmde mikrokoloniler olarak çoğalır ve bir EPS matrisi üretir. Mukoid suşlar tarafından aşırı aljinat üretimi vardır (López *et al*. 2010).

2.2.2 Aljinat

Biyofilmler, antibiyotiklere karşı dirençlerini, konakçının bağışıklık tepkisini ve çevresel stresleri etkileyen morfolojide büyük farklılıklar gösterebilir. Biyofilm matrisinin yapısı bu çeşitliliğin bir yönüdür. *P*. *aeruginosa* tarafından üç matris ekzopolisakkarit oluşturulur; aljinat, *Psl* ve *Pel*. Bu ekzopolisakkaritlerin her birinin biyofilm oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir (Ryder *et al*. 2007) ve her birinin biyofilm üretiminde ve bakteriyel hayatta kalmadaki rolünü tanımlayan sayısız özelliği olduğu

saptanmıştır. Aljinat, bağışıklık sistemi direncinde önemli bir rol oynar. Aljinatın, antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etkilerini ve insan antibakteriyel koruma mekanizmaları üzerindeki etkilerini azaltmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir (Nivens *et al*. 2001, Pier *et al*. 2001).

Yapısal olarak aljinat, iki üronik asitten oluşan (β-D-mannuronik asit ve onun C5 epimeri olan β-L-guluronik asit) çok yüksek moleküler ağırlıklı lineer bir ekzopolisakkarittir. Aljinat, *P. aeruginosa*'da, *P. aeruginosa* hücrelerine gevşek bir şekilde yapışan, kapsül benzeri bir ekzopolisakkarit olarak oluşturulur ve süpernatan topluluğunda çok fazla bulunur. 12 alg geni operonunun gen ürünleri, aljinat tarafından sentezlenir (Şekil 2.1); (Franklin *et al.* 2011). Bu proteinlerin bazıları, periplazmik boşluk boyunca, iç zardan dış zara uzanan bir kompleks oluşturur. Aljinat biyosentezindeki ilk aşama, *algD* tarafından katalize edilir ve *P. aeruginosa* klinik izolatlarında sıklıkla bulunan mukoid fenotip ile sonuçlanır (Deretic *et al*. 1987).



Şekil 2.1 Aljinat biyosentetik operonu ve önerilen biyosentetik modeli (Franklin *et al.* 2011). 12 gen operonu, aljinat sentezi için gerekli olan bir protein hariç hepsini kodlar ve bu proteinlerin çoğu, iç zardan dış zara uzanan bir kompleks oluşturur.

GDP-mannuronatın öncüsü, merkezi karbon metabolizmasından bir metabolit olan fruktoz-6-fosfattan *algD, algC* ve *algA* tarafından sentezlenir. *AlgD,* bir GDP-mannoz dehidrojenazdır; bu enzimin katalize ettiği reaksiyon geri döndürülemez. Aljinat, *algE*

tarafından dış zar yoluyla salgılanır. Aljinat hücre yüzeyine bağlı değildir (Deretic *et al*. 1987).

Aljinat, mukoid izolatların prevalansı nedeniyle üzerinde en çok çalışılan ekzopolisakkaritler arasındadır. Mukoid suşlar, kolonilere mukus benzeri bir görünüm veren aljinatın aşırı üretimi ile karakterize edilir.

Biyofilm yapısının kendisinin sağladığı dirence ek olarak, aljinatın antimikrobiyallere karşı bakteriyel direnci arttırdığına dair kanıtlar vardır. Bazı çalışmalar, aljinatın varlığı nedeniyle bakterilerin mukoid biyofilmlerdeki antibiyotiklere mukoid olmayanlara göre biraz daha dirençli olduğunu göstermiştir (Hentzer *et al*. 2001). Bu durum, direncin sadece aljinatın varlığından değil, aynı zamanda mukoid biyofilmlerde bulunan büyük miktarda aljinattan da kaynaklandığını göstermektedir. Aljinat, kapsüler polisakkarit olarak adlandırılır; bu, yapısal işlevden ziyade büyük ölçüde savunma işlevine sahip olduğu anlamına gelmektedir (Mann and Wozniak 2012). Örneğin; aljinat üretimi, aminoglikozitlerin emilimini ve erken bakterisidal etkisini azaltır ve monosit ve nötrofil tarafından hem in vitro hem de in vivo opsonik olmayan fagositozu inhibe eder (Boyd and Chakrabarty 1995).

Aljinatın önemli ölçüde su tutma kapasitesi olduğuna inanılmaktadır; bu kapasite kimyasal özelliklerinin hyaluronik asit gibi polisakkaritlere benzerliğine bağlı olarak aljinatın biyofilmleri kurumaya karşı korumasına olanak sağlayabilir. Aljinat ayrıca antibiyotikler ve konak moleküller tarafından biyofilm matrisine penetrasyonu sınırlayarak koruma sağlar ve böylece *P. aeruginosa*'nın patogenezine katkıda bulunur. Aljinat üreten ve mukoid suşlar yüksek yoğunlukta canlı hücreye sahipken, aljinat eksikliği olan suşlar bu alanda az sayıda canlı hücre göstermiştir (Ghafoor *et al*. 2011).

2.2.2.1 Aljinat biyosentezinin genetik düzenlenmesi:

Aljinat biyosentez yolu dört farklı aşamaya ayrılabilir: (i) sitoplazmada öncü substratın sentezi, (ii) polimerizasyon ve sitoplazmik membran transferi, (iii) periplazmik modifikasyon ve (iv) dış zar üzerinden dışasalım.

AlgD promotörü (P *algD*), aljinat biyosentezi için *P. aeruginosa*'da 12 gen operonunun (*algD*, 8, 44, K, E, G, X, L, I, J, F, A) ekspresyonunu düzenler (Ohman 2009). Aljinat operon ifadesi, yüksek düzeyde düzenlenir ve *algD*'nin promotörünün kontrolü altındadır. Sitoplazmada meydana gelen öncül sentez, *algD*, *algA* ve *algC* genleri tarafından kodlanan proteinleri içeren bir dizi dört enzimatik adım yoluyla aktif öncü GDP-mannuronik aside dönüştürülen merkezi metabolit fruktoz-6-fosfattan başlatılır (Ramsey and Wozniak 2005, Ahmed 2007). Son adımda, *algD* tarafından kodlanan GDP-mannuronat üretilir. Aljinat sentezi için bu son adım geri döndürülemez ve spesifiktir. *P. aeruginosa*'daki biyosentetik gen kümesi, *algC* hariç, *algD*'nin transkripsiyonel regülasyonu altında 10 dakikadadır. *P. aeruginosa*'da *algR*, *algB*, *algC* ve *algD*'nin transkripsiyonel regülasyonu *algT*'ye bağlıdır (May and Chakrabarty 1994, Snook *et al*. 2003).

Aljinat biyosentezinin düenlenmesi karmaşıktır ve spesifik gen ürünlerini kapsamaktadır
(Gacesa 1998). Aljinat sentezini doğrudan katalize eden *algD, alg8, alg44, algK, algE* (*alg76*), *algG, algX* (*alg60*), *algL, algI, algJ, algF, algA* ve *algC* dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyosentetik genler, *algC* hariç *P. aeruginosa* kromozomunda 34 dakikalık 18 kb'lik bir bölge içinde kümelenir (Chitnis and Ohman 1993, Gacesa 1998).

AlgD gen transkripsiyonel aktivasyonu, aljinat sentez yolu düzenlemesinde elzem bir noktadır ve aljinat değişikliği ve düzenleyici genler tarafından düzenlenir (Deretic *et al*. 1987, Barthe *et al*. 2015). *AlgC* dışındaki tüm biyosentetik genler, *algD* promotörünün kontrolü altında *P. aeruginosa*'da polisistronik bir şekilde kopyalanır. Bunlardan *algD*, üç çeşitli promotörden kopyalanır (Deretic *et al*. 1987, Barthe *et al*. 2015).

Aljinat sentezini bakteri kromozonunun en az üç farklı bölgesini içeren karmaşık bir süreç düzenlemektedir. Yüksek seviyeli aljinat üretimi için *algR* (*algR*1), *algQ* (*algR*2) ve *algP* (*algR*3) içeren 9. dakikadaki küçük bir gen kümesi (Deretic *et al*. 1994) ve 13. dakikada bulunan *algB* (Leech *et al*. 2008) gereklidir. Bu genetik konumlar, proteinleri öncelikle DNA bağlama ve bükme yoluyla hareket edecek şekilde ifade eder (Ohman 2009). *AlgU* (*algT*), mucA (*algS*) ve mucB (*algN*) içeren başka bir gen kümesi 68. dakikada bulunur ve bunlar toplu olarak etkileşime girerek *algU*'dan alternatif bir RNA polimeraz sigma faktörünün ifadesi yoluyla mukoid olmayandan mukoide dönüşümden sorumlu olan bir moleküler anahtar oluşturur (Ohman 2009). *AlgZ, algR* (*algR*1), *algQ* (*algR*2), *algP* (*algR*3) ve *algB*, aljinat üretiminin düzenlenmesini kontrol eden beş gendir (Boyd and Chakrabarty 1995, Ahmed 2007).

Anti-sigma faktörü MucA, *algD* gen düzenlemesinde anahtar bir unsurdur (Hay *et al*. 2014). Alternatif sigma faktörü *algU* (*algT* ve σ22 olarak da bilinir), aljinat sentezinin ana düzenleyicisidir (Wood and Ohman 2009). Diğer dört gen, mucA, mucB, mucC ve mucD içeren bir operonda, ürünlerin etkinliklerini modüle eden *algU* kodlanır. *AlgU*'nun aktivitesi, indüklenmemiş koşullar altında MucA tarafından yalıtılır edilir ve oksidatif stres gibi stres koşulları algılandığında bakteri *algU* salgılar. Bu durum aljinat biyosentez operonu gibi (*algD, alg8, alg44, algK, algE, algG, algX, algL, algI, algJ, algF, algA* ve *algC*) *algU*'ya bağlı promotörlerin aktivasyonuna izin verir (Wood and Ohman 2009). MucC rolü belirsiz olsa da MucA, MucB ve MucD'nin tümü *AlgU* düzenlemesi için önemlidir. MucA mutasyonlarının inaktive edilmesi, *AlgU*'nun ve dolayısıyla aljinat biyosentetik operonunun kuralsızlaştırılmasına katkıda bulunur, bu da aljinatın ve mukoid morfotipin aşırı üretimine neden olur. Ek olarak, *P. aeruginosa*'daki aljinat genlerinin ekspresyonu, iki bileşenli bakteriyel transdüksiyon sistemlerinin üyeleri dahil olmak üzere birçok protein tarafından düzenlenir. Bu düzenleyici proteinlerden ikisi, aljinat gen ekspresyonunu transkripsiyonel olarak aktive eden DNA-bağlanma tepki düzenleyicisi *algR*1 ve aktivitesini arttırmak için fosforilasyon yoluyla *algR*1'i değiştiren kinaz *algR*2'dir (Roychoudhury *et al*. 1993). Fonksiyonel bir RNA polimeraz σ$^{\Delta}$54 alt biriminin yanı sıra hem *algR*I hem de *algR*2 genlerinin, *algD* promotörünü iş birliği içinde aktive ettiği gösterilmiştir (Kato *et al*. 1990).

2.2.2.2 *AlgD* geni

AlgD geni, aljinat sentezi yoluyla bakteriyel immun sistemi direncinde önemli rol oynamaktadır (Béatrice *et al*. 2005). *AlgD* translasyonu başlangıcı, transkripsiyonun başlangıcından itibaren +367 baz çiftindedir (Ohman 2009). *P. aeruginosa* aljinat üretiminin önemli özelliklerinden birisi, aljinat genlerinin tipik olarak sessiz olmasıdır. Ancak açlık, dehidrasyon, kuruma, artan ozmolarite ve fosforilkolin varlığı gibi çevresel faktörler *algD* promotör aktivasyonunda yer alan bir dizi düzenleyici proteine neden olmaktadır (Ahmed 2007).

AlgD geninin ekspresyonu, karbon, fosfat, nitrojen, oksijen konsantrasyonu gibi çevresel koşullara ve *algD* transkripsiyonunun aktive edildiği büyüme hızı sınırlamalarına bağlıdır. Ayrıca ortamdaki sükroz, KCl ve NaCl'nin varlığı da *algD*'nin transkripsiyonunu uyararak aljinat üretimine sebep olmaktadır (Hay *et al*. 2014). *AlgD* geni, özellikle besin kıtlığı, oksijen temini ve yavaş büyüme hızı ile ilgili olarak çevresel strese yanıt olarak ifade edilir (Almarzoqi *et al*. 2016). *AlgP* (*algR*3 olarak da bilinir) (Konyecsni and Deretic 1990), IHF (Delic-Attree *et al*. 1996), CRP ve DNA süperhelisitesini kontrol eden enzimler (DeVault *et al*. 1990) gibi *algD* genlerinin ifadelerini etkileyebilecek birkaç gen vardır.

P. aeruginosa'da, σ22'nin (*algT*) kontrolü altında bir aljinat gen ekspresyon hiyerarşisi vardır; ancak algB ve algR yanıt düzenleyicilerinin transkripsiyonu için *algT* gereklidir, *algB* ve *algR*, *algD* ve onun biyosentetik genlerinin ekspresyonu için önemlidir. Ek olarak, *algR* ve *algB*'nin her birindeki mutasyonlar düzenleyici genlere tepki gösterir dolayısıyla *algD* ifadesini azaltarak veya ortadan kaldırarak mukoid kaybına katkıda bulunur (Wozniak 1994). Birçok protein, tam transkripsiyonel aktivasyon için *algD* dizilerini bağlar. *AlgR* genleri arasındaki dizi benzerliği, *algD* gen ekspresyonunu pozitif olarak kontrol eder (Berry *et al*. 1989).

AlgD ifadesi, bakteriyel iki bileşenli sinyal iletim sistemleri üstfamilya düzenleyicilerine ve özel bir alternatif sigma faktörüne dayanır, σE (*algT* veya *algU* olarak da bilinir). Aslında σ22 (*algU*), RNA polimeraz ile bir kompleks oluşturur (Hay

et al. 2014). Bu RNAP-σ22 kompleksi, *algD*'nin transkripsiyonunu pozitif olarak düzenler (Wood and Ohman 2009). *AlgT* (*algU*) alternatif sigma faktörü, *algD* ifadesini uyarır. *AlgT* geni, mucA-mucB-mucC-mucD olan diğer 4 gene kıyasla bir operona aittir. Membran bağlı bir sitoplazmik protein olan MucA, *algT*'ye bağlanma yoluyla *algD* ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen bir anti-sigma faktörü olarak işlev görür. *AlgD* gen transkripsiyonu MucB ve MucD tarafından negatif olarak kontrol edilir (Govan and Deretic 1996). *AlgT*, *algD*'nin transkripsiyonundan sorumlu tek faktör olmayabilir. *AlgD*'nin transkripsiyonu, bazı özel koşullarda RpoN (σ54) gerektirir. σ54'ün σE'ye bağlı *algD* ifadesi üzerindeki olumsuz düzenleyici etkisi σ54'ün *algD*'nin promotörüne bağlanmasına ve bunun transkripsiyona bağımlı σE ile etkileşimine dayanır (Boucher *et al*. 2000). Maksimum *algD* ifadesi için iki adet *algD*-IHF bağlama bölgesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. *AlgD* transkripsiyonunun başlangıç bölgesine göre -80 ila -68 konumlarını kapsayan düşük afiniteli bir IHF bağlama bölgesi (bölge 1), jel bandı mobilite değişim deneyleri ve lokasyona dayalı mutajenez ile karakterize edilmiştir. Ek olarak, +79 ila +105 (bölge 2) nükleotidlerini kapsayan *algD* mRNA'nın başlangıç bölgesinin aşağı akışında yer alan bir dizinin, IHF'yi site 1'den yaklaşık 90 kat daha fazla afinite ile bağladığı gösterilmiştir. Bu elementlerin mutagenezi, *algD* transkripsiyonu için yüksek seviye IHF bağlantısı gerektirdiğini göstermiştir. Ek olarak, +110'dan +835'e kadar olan dizilerin ortadan kaldırılması, *algD* geninde yer alan temel bir elemente işaret ederek *algD* ekspresyonunu 10 kat azaltmıştır (Wozniak 1994).

2.3 *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

P. aeruginosa, çok sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu veya enfeksiyon tanımlandıktan sonra antibiyotik direnci geliştirdiği için tedavisi zor bir mikroorganizmadır. Antibiyotik sınıfları şunları içerir; sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozitler ve florokinolonlar (Moradali *et al*. 2017). *P. aeruginosa*, genlerinde belirli mutasyonlar geçirerek veya bu genleri yatay gen transferi yoluyla edinerek antibiyotik direnci geliştirir. Örneğin; mikroorganizmalar tarafından geliştirilen tipik antibiyotik direnç mekanizmaları, azalmış hücresel geçirgenlik, artan akış (ilaç akışı), mutasyon veya antibiyotik hedeflerindeki değişiklikler, antibiyotik modifikasyonu içerir (Blair *et al*. 2015). Ayrıca, matris materyali nedeniyle düşük biyofilm büyümesi ve bozulmuş ilaç

difüzyonu gerçekleşir (Ma 2014). *P. aeruginosa* birçok mekanizmaya sahip olduğu için antibiyotiklere karşı direnç kazanmış veya birden fazla ilaca dirençli olmuştur (Ma 2014).

2.3.1 İçsel antibiyotik direnci

P. aeruginosa, mevcut antibiyotiklerin neredeyse tamamına karşı içsel dirence sahiptir. *P. aeruginosa*'nın içsel antibiyotik direnci, belirli bir antibiyotiğin kendisinde bulunan yapısal veya işlevsel özellikler yoluyla aktivitesini azaltmadaki doğuştan gelen kapasitesini ifade eder (Blair *et al.* 2015). İçsel antibiyotik direnci ikiye ayrılır:

a) Dış membran geçirgenliği, İç direnç, antibiyotikleri hücre dışına pompalayan akış sistemleri ve β-laktamazlar gibi antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimi dahil olmak üzere yavaş geçirgenlik ve ikincil mekanizmaların bileşiminden gelir (Pang *et al*. 2019). Hücre içi hedefleri karşılamak için, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin çoğu, hücre zarına nüfuz edebilmelidir.
b) Bakteriyel akış pompaları, toksik bileşiklerin ve ilaçların hücre dışına atılmasında önemli bir rol oynar ve beş gruba ayrılır: (i) ATP bağlayıcı kaset ailesi, (ii) küçük çoklu ilaç direnci ailesi, (iii) ana kolaylaştırıcı üst ailesi, (iv) direnç-nodülasyon-bölünme (RND) ailesi ve (v) çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesi. Aslında, RND ailesinin akış pompasına ait proteinler, *P. aeruginosa*'daki antibiyotiklere dirençte anahtar rol oynamaktadır.

2.3.2 Edinsel antibiyotik direnci

Mutasyonel değişiklikler veya yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin edinilmesi yoluyla bakteriler antibiyotik direnci kazanabilir. Kazanılan direnç, çoklu ilaca dirençli suşların gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunur ve *P. aeruginosa*'nın eradike edilmesinin zorluğunu artırır (Smith 2017). Edinsel antibiyotik direnci ikiye ayrılır:

- Birincisi, mutasyonlar yoluyla direnç: Mutasyon değişiklikleri, antibiyotik hedeflerinde değişikliklere, antibiyotik alımının azalmasına ve antibiyotik inaktive edici enzimlere ve dışa akış pompalarının aşırı ekspresyonuna neden olabilir; bunların hepsi antimikrobiyal moleküllerin varlığında bakterilerin hayatta kalmasını sağlar. DNA oksidatif onarım sisteminin inaktivasyonu, *P. aeruginosa*'daki mutasyon frekanslarını artırarak β-laktamaz üretiminin artmasına neden olur (Smith 2017). Belirli bir porinin ekspresyonu veya işlevi, spontan mutasyonlar tarafından bozulabilir, böylece bakteriyel membran geçirgenliğini azaltır ve antibiyotik direncini arttırır (Fernández and Hancock 2012). *P. aeruginosa*'da OprD'deki bir eksiklik, karbapenemlere, özellikle imipenem'e karşı yüksek düzeyde direnç sağlar (Fang *et al*. 2014). Antibakteriyel hedeflere müdahale, hedefleri koruyarak ve hedef konumlarını değiştirerek gerçekleştirilebilen antibiyotik antimikrobiyal aktiviteyi inhibe etmek amacıyla bakteriler tarafından yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu nedenle, *P. aeruginosa*'nın hedef bölgelerindeki mutasyonel değişiklikler, antibiyotik direncine katkıda bulunurken, kinolon hedef bölgelerindeki değişiklikler en iyi karakterize edilmiş örneklerden biridir (Aldred *et al*. 2014, Lin *et al.* 2015). Ribozomal mutasyonlara sahip *P. aeruginosa* suşları tarafından aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde direnç gösterilmiştir. Örneğin, *P. aeruginosa*'nın bazı klinik izolatları, sefalosporinlere karşı direnci önemli ölçüde artıran ampC genindeki mutasyonların neden olduğu aşırı β-laktamaz üretimine sahiptir. Mutasyonun neden olduğu edinsel direncin iyi karakterize edilmiş başka bir mekanizması, *P. aeruginosa*'da antibiyotik inaktive edici enzimlerin aşırı ekspresyonuna neden olur (Smith 2017). Polimiksinler [Polimiksinler B ve E (kolistin olarak da bilinir)], Gram-negatif bakterilerin dış zarındaki lipopolisakaritlere (LPS) bağlanan ve hücre zarının geçirgenliğini artıran ve antibiyotik emilimini artıran bir grup polipeptit antibiyotiktir. Polimiksinlere ve antimikrobiyal peptitlere karşı Adaptif direnç, PhoPQ ve PmrAB sistemlerinin değiştirilmiş ekspresyonu yoluyla oluşturulması amacıyla kanıtlanmıştır. Bu durum sadece polimiksin ve antimikrobiyal peptitlere değil, aynı zamanda LPS bağlantısına dayanan aminoglikozitlere karşı direnci etkileyen bir yağ asidi bileşiminin lipid modülasyonuna yol açmaktadır (Zavascki *et al*. 2007).

- İkincisi, direnç genleri; Plazmitler, transpozonlar, integronlar ve profajlar, antibiyotik direnç genleri taşıyabilir ve bakteriler bu genleri yatay gen transferi yoluyla aynı veya farklı bakteri türlerinden alabilir (Breidenstein *et al*. 2011). Yatay gen transferinin ana mekanizmaları konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyonu içerir (Arber 2014). İntegronlar, bölgeye özgü rekombinasyon yoluyla belirli bir genetik bölgeye hareketli bir geni sokan genetik faktörlerdir ve *P. aeruginosa* suşları arasında antibiyotik direncinin yayılmasında çok önemli bir rol oynarlar (Khosravi *et al*. 2017).

2.3.3 Adaptif antibiyotik direnci

Adaptif direnç, çevresel bir uyarana yanıt olarak gen ekspresyonundaki geçici bir değişiklik nedeniyle bir bakterinin antibiyotik saldırısından kurtulma yeteneğini arttırır ve uyaranın ortadan kaldırıldığı durumlarda tersinebilir (Sandoval-Motta and Aldana 2016). Adaptif direnç, bakteriler öldürücü olmayan antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kaldığında ve duyarlılığın azalmasıyla sonuçlanan belirli gen ekspresyonu değişikliğine uğradığında meydana gelir. *P. aeruginosa*'daki adaptif direncin en iyi karakterize edilen mekanizmaları biyofilm oluşumu ve kalıcı hücre üretimidir (Taylor *et al*. 2014).

2.4 Biyofilm Yapısı ve Oluşumu

Biyofilm, kalın ve yapısal bir matriks ile kaplanmış bir koruyucu mikroorganizma popülasyonudur. Biyofilmler ilk olarak 17. yüzılda mikrobiyolog Antonie Van Leewenhoek tarafından diş yüzeyinde gözlenmişti (Donlan and Costerton 2002). Biyofilm matrisi, büyük ölçüde aljinat adı verilen salgılanmış ekzopolisakkaritlerden oluşan hücre dışı bir polimerik malzemeden (EPS) oluşur, aynı zamanda proteinler, nükleik asitler ve diğer molekülleri de içerir (Mann and Wozniak 2012). Biyofilm yapısını oluşturan bileşenler:

a) Ekzopolisakkaritler: Biyofilm matrisinde, *Pel* (pellikül, glikoz bakımından zengin polisakkarit 99), *Psl* (Polisakkarit Sentez Lokus, bir Penta sakarit tekrarlayan D-mannoz, D-glukoz ve L-ramnoz birimi) ve koruyucu polisakarit aljinat (1-4)-bağlı β-D-mannuronat ve C-5 epimeri α-L guluronate gibi birikmiş polisakkaritler bulunur. *Psl*, biyofilm matrisinin birincil polisakkarit bileşenidir ve hücreden yüzeye ve hücreden hücreye bağlanma için kullanılır. *Pel*'in, biyofilmlerde hücrenin diğer hücreye bağlanması yoluyla rol oynadığı gösterilmiştir. Yapısal stabilitede aljinat önemli bir işlev görür ve ayrıca *P. aeruginosa*'yı hidrofobik ajanlardan, kurumadan ve inflamatuar sürecin etkilerinden korur (Colvin *et al.* 2012). Aljinatın, biyofilmin antibiyotik tedavisine ve insan antibakteriyel koruma mekanizmalarına karşı hassasiyetini daha da azalttığı gösterilmiştir (Nivens *et al*. 2001). Aljinat üretimi, kompleman stimülasyonunu ve makrofaj fagositozunu azaltır (Jain and Ohman 2005).

b) Ekstrasellüler DNA (eDNA-Ekstraselüler deoksiribonükleik asit): eDNA, LPS modülasyonunda yer alan genleri uyarır ve ayrıca antibiyotik direncini kolaylaştırmak için antibiyotikler gibi toksik yüklü molekülleri yakalayabilir. Genellikle açlık sırasında bir enerji kaynağı olarak kullanılır (Mulcahy *et al*. 2008).

c) Matriks Proteinleri: Biyofilm sağlamlığı için gerekli olan amiloid lifleri, *P. aeruginosa*'daki Fap (Fonksiyonel Amiloid) gibi matris proteinleri tarafından üretilir. *P. aeruginosa* biyofilm hidrofobikliği ve sertliği, fonksiyonel bakteriyel amiloid tarafından arttırılır; CupA, CupB ve CupC fimbria, lektin A ve B, adhesin CdrA, biyofilmin ilk oluşumu sırasında bakteriyel bağlanmaya aracılık eder (Wei and Ma 2013).

d) Sürfaktanlar: Ramnolipidler, biyofilm olgunlaşması için önemli olan amfipatik glikolipidlerdir. Bunlar biyofilm içindeki besinleri ve oksijeni almak için gereken kanalların oluşumu için gereklidirler. Ayrıca, mantar benzeri mikrokolonileri yeni ortamların kolonizasyonuna başlayacak hücrelerden ayırt etmede de rol oynarlar (De Kievit 2009).

e) Dış zar vezikülleri (OMV): OMV'ler, biyofilm yapılanmasına yardımcı olmak için eDNA ile etkileşime girer. OMV'ler, QS molekülleri ve hemolitik fosfolipaz C, peptidoglikan parçalayıcı enzimler, pro-elastaz, alkalin fosfataz, plazmitler,

hemolizin ve gen transferini kolaylaştıran genomik DNA dahil olmak üzere hücreden hücreye temas için virülans mekanizmalarında, savunma ve ilaca karşı dirençte yer alan farklı molekül türlerini barındırır (Schooling and Beveridge 2006).

Hem ekosistemde hem de insan enfeksiyonlarında biyofilmler çok yaygındır. Bilinen bakteriyel enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilmler tarafından tutulduğu tahmin edilmektedir (Fux *et al*. 2005). Bir biyofilm hacminin sadece %10-20'si bakterilerden oluşur (Høiby *et al*. 2001). Bakterilernin biyofilm oluşturma şekli, insan bağışıklık tepkisine ek olarak kimyasal dezenfektanlara, ısıya, deterjanlara ve antibiyotiklere karşı daha toleranslı hale getirir (Corcoran *et al*. 2014). Biyofilmler hücreleri UV ışığı, kuruma, sıcaklık ve asitlik değişimleri gibi çevresel baskılardan korur ve onları antibiyotik streslerine karşı korur (Hall-Stoodley *et al*. 2004). Biyofilmler, bu bakteri popülasyonlarının büyümesi için daha uygun bir ortam sağlar. Biyofilmler orta kulak iltihabı, doğal kapak endokarditi, periodontitis, kronik bakteriyel prostatit'in yanı sıra, CF (kistik fibroz) (Donlan and Costerton 2002), kronik rinosinüzit (Sanderson *et al*. 2006), kronik osteomiyelit ve protez eklem enfeksiyonlarında (Del Pozo and Patel 2009), intravenöz (iv) kateter ve stentlerde (Tacconelli *et al*. 2009) ve kronik yaralar (Bjarnsholt *et al*. 2008) gibi pek çok enfeksiyonda yaygın olarak görülmektedir. Antibiyotik toleransları nedeniyle biyofilmler ciddi bir halk sağlığı sorununa neden olmakta ve hastaları sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlarda birincil komplikasyonu haline getirmektedir (Patel *et al*. 2016). Genellikle kontakt lensler, idrar sondaları, protez kalp kapakçıkları, santral venöz kateterler ve rahim içi cihazlar gibi abiyotik yüzeylerde bulunurlar ve bu nedenle potansiyel sağlık riskleri oluştururlar. Aljinat adı verilen bir ekzopolisakkaritin aşırı üretimi, *P. aeruginosa*'ya seçici bir avantaj sağlar ve hayatta kalmasını destekler (Damron and Goldberg 2012).

Biyofilmlerde *P. aeruginosa*'nın tobramisin ve siprofloksasin gibi antibiyotiklere karşı aşırı derecede artan direnci olduğu gösterilmiştir ve biyofilm hücreleri planktonik yaşam tarzlarına döndüğünde bu etki tersine dönmüştür (Walters III *et al*. 2003). Biyofilm matrisi, antimikrobiyallerin içinden geçmesi gereken fiziksel bir bariyer sunan bu dirence ana katkıda bulunur (Donlan and Costerton 2002). Biyofilm matrisinin

antimikrobiyal penetrasyonu azalttığı gösterilmiştir. Tobramisinin, *P. aeruginosa* biyofilminde daha yavaş nüfuz ettiği gösterilmiştir (Walters III *et al*. 2003). *P. aeruginosa* matrisinin aljinatı, %2'lik bir süspansiyonda gentamisin ve tobramisin antibiyotiklerinin difüzyonunu inhibe etmiştir; süspansiyon aljinat liyaz ile tedavi edildiğinde, matrisin antimikrobiyal özelliklerini gösteren inhibisyon tersine dönmüştür (Donlan and Costerton 2002).

Antibiyotik penetrasyon farklılıkları, biyofilmin bileşimin kalınlığına ve ayrıca antimikrobiyalin yapısına bağlıdır. Tobramisin gibi aminoglikozit antibiyotikler, siprofloksasin gibi florokinolonlardan daha zayıf penetre olurlar, ancak siprofloksasinin biyofilmler yoluyla penetrasyonu geciktirdiği gösterilmiştir (Walters III *et al*. 2003). Aljinat baskın matrisler negatif yüklüdür ve katyonik antibiyotiklerin geçişini geciktirir, bunun nedeni muhtemelen antimikrobiyal ve matris arasındaki kimyasal etkileşimlerdir (Fux *et al*. 2005). Ayrıca, antimikrobiyallerin çoğu mikrokoloninin iç kısmına nüfuz etmeden biyofilmdeki sıvı kanallarından geçebilir (Walters III *et al*. 2003). Bu faktörlerin tümü biyofilmlerin antibiyotiklere karşı direncine katkıda bulunabillirler. Çalışmalar, en yavaş büyüyen hücrelere sahip biyofilmlerin antibiyotiğe daha dirençli olduğunu göstermiştir (Donlan and Costerton 2002).

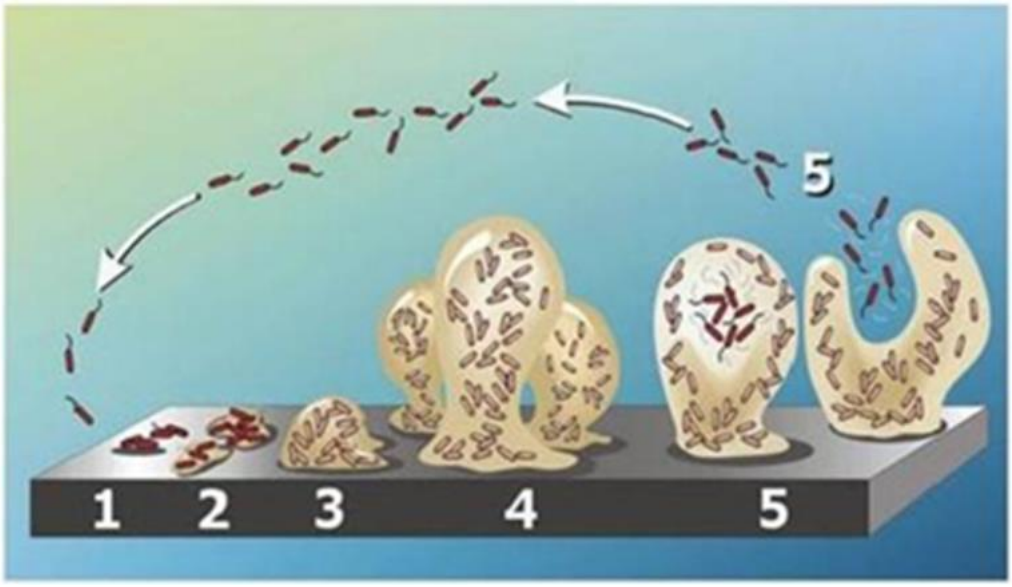
Biyofilm yapıları çok karmaşıktır; mikrokolonilerden oluşurlar, besinlerin, suyun ve atıkların taşınması için kanallar içerirler, bu da besinlere, oksijene ve atıklara değişen maruziyetlere sahip çeşitli mikro-ortamlara yol açar (Hall-Stoodley *et al*. 2004). Kalınlık tipik olarak 13-60 μm arasında değişmektedir (Høiby *et al*. 2001). Biyofilm yapıları organizmanın genetiğine olduğu kadar içinde büyüdüğü koşullara da bağlıdır (Stapper *et al*. 2004). Yüzeylerin ilk kolonizasyonu sırasında, bir biyofilm genellikle yatay olarak büyür ve yatay alan sınırlıysa dikey büyüme de gerçekleşebilir. Fiziksel ve çevresel koşullar ile gen ekspresyonundaki farklılıklar, biyofilm morfolojisinde çeşitliliğeneden olur. Bu nedenle, biyofilmlerin antibiyotiklere karşı sahip olduğu varsayılan üç direnç yolu vardır (Stewart and Costerton 2001, Abebe 2020).

İlk olarak, biyofilm kalınlığı, antibiyotiğin bakterileri etkileyebileceği biyofilme nüfuz etmesini önler ve sonuç olarak bakteriler, alt inhibitör konsantrasyonlara maruz kalır ve

bu da bakterilerin öldürülmesinin azalmasına yol açar. İkincisi, antibiyotik etkisi, biyofilmlerde biriken besin tükenmesi ve atık bölgeleri ve biyofilmlerdeki genellikle hipoksik koşullar tarafından önlenir. Üçüncüsü, antibiyotik alt-inhibitör konsantrasyonlarına maruz kalma durumu, antibiyotiğe daha dirençli bakterilerin seçilmesine yardımcı olur.

Biyofilm oluşumu ile ilgili kronik enfeksiyonların ve problemlerin kontrolüne yönelik stratejiler, biyofilm oluşumunun genetik ve moleküler mekanizmalarının en iyi şekilde anlaşılmasını sağlayabilir. Whiteley *et al*. 2001 tarafından yürütülen bir araştırma da, DNA mikrodizi sonuçlarına dayalı olarak serbest yaşayan hücrelere kıyasla *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinde 73 genin farklı şekilde eksprese edildiğini bulmuştur. Bunların arasında 34'ü yukarı regüle edilmiş genler, 39'u ise aşağı regüle edilmiş genler. Biyofilmlerin oluşumu, kısmen QS sinyalleri tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Quorum sensing mekanizmasının *Psl, Pel* ve aljinat üretiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Allesen-Holm *et al*. 2006). Ayrıca, hücrelerin yüzeye ilk bağlanmasında, eDNA, ekzopolisakkarit (*Psl, Pel* ve aljinat) (Ma *et al*. 2009), demir siderofor pyoverdin, biosurfaktan rhamnolipid (Harmsen *et al*. 2010), tip IV pili, flagella, Cup fimbria gibi proteinli yüzey uzantıları (Klausen *et al*. 2003) dahil olmak üzere biyofilm matrisinin gelişiminde çeşitli bileşenler rol oynar.

Biyofilm oluşumu ve gelişimi, genellikle beş aşamada sınıflandırılan karmaşık bir süreçtir (Şekil 2.2). *P. aeruginosa* yaygın olarak bakteriyel biyofilmlerin incelenmesi için bir model organizma olarak kullanılır.



Şekil 2.2 Biyofilm gelişiminin beş aşamasının temsili (Ma *et al.* 2009)

Birinci aşamada, pili, flagella ve fimbria gibi çeşitli yüzey molekülleri veya uzantıları, *P. aeruginosa* tarafından hareketlilik ve tutunma için gereklidir (Kostakioti *et al*. 2013). Hücre yüzeyine tutunan proteinyapılı fimbrialar doğada bakterinin yüzeye tutunmasında görev alırlar. Benzer şekilde, başlangıçtaki bakteri bağlanmasını kolaylaştırmak için pili olarak bilinen uzun protein lifleri üretilir (Abebe 2020). *P. aeruginosa* flagellum, kümelenme ve seğirme hareketliliği sergileme kabiliyeti nedeniyle biyofilm oluşumunun başlamasında önemli bir rol oynamaktadır (Jyot *et al*. 2007). Pili yokluğunda, *P. aeruginosa* bir biyofilm oluşturamaz. *P. aeruginosa* bir yüzeyle ilişkilendirildikten kısa bir süre sonra, hücreler içinde gen ekspresyonu değişir ve proteinlerin %25'inin artış meydana gelir (Sauer *et al*. 2002). 15 dakika içinde, ekzopolisakkarit üretiminde anahtar bir protein olan *AlgC*'nin yukarı regülasyonu gerçekleşir (O'Toole *et al*. 2000). Bakteri yüzeyine tutunan filamentli protein yapıları olarak tanımlanan flagella, bakteri motilitesi için gereklidir. Gram negatif bakterilerin çoğunluğu biyofilm gelişimi için flagellaya ihtiyaç duyar (O'Toole *et al*. 2000).

İkinci aşama, erken bağlanan bakterilerin çoğaldığı, bölündüğü ve diğer organizmaları çektiği, bu sırada çoklu gen değişikliklerinin meydana geldiği geri dönüşü olmayan bağlanmadır, bu olgunlaşma aşaması, ilk bağlanmadan sadece birkaç dakika sonra başlar. Ayrılabilir ek, geri döndürülemez hale gelir (Høiby *et al*. 2010). Bakteriler,

açillenmiş homoserin laktonlar (Gram-negatif bakterilerde) gibi kimyasal sinyaller salgılamaya başlar. Ek olarak, *P. aeruginosa* Las quorum algılama sistemi uyarılır. Las sistemi, biyofilmin düzgün bir şekilde oluşması için önemlidir (Stoodley *et al*. 2002). Böylece bakterilerin birbirleriyle ilişki kurmasına ve popülasyon yoğunluğunun kontrol altına alınmasına olanak sağlanır (Fuqua 2006). Kimyasal sinyaller belirli bir eşik seviyesine ulaştığında, sesil hücreler tarafından bir EPS salgılanır (Thormann *et al*. 2004). Bu aşamada, besinleri ve sinyal moleküllerini dağıtmak için tasarlanmış su kanallarının oluşumu başlar. Biyofilmler bir kez olgunlaştıktan sonra dirençlidir ve antibiyotiklere ve ultraviyole ışığa karşı toleranslıdır (Donlan and Costerton 2002).

Gelişimin üçüncü aşamasında, biyofilm yapısı büyür, su kanalları ve özel nişler oluşturur. Çekirdek algılama mekanizması Rhl1, ekzopolisakkaritlerin üretimini de etkileyen bir stres yanıtının indüklenmesi için temel bir sigma faktörü olan RpoS'nin ifadesini indükler (Stoodley *et al*. 2002). Las, rhl ve PQS sistemlerini içeren hücreden hücreye bağlantı mekanizmalarının, biyofilm matrisinin farklı bileşenlerinin üretiminin düzenlenmesi yoluyla *P. aeruginosa*'da olgun, farklılaşmış biyofilmlerin oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Sigma faktörlerinden RpoS sistemi, polisakkaritlerin sentezinde yer alan operonların ifadesi için de gereklidir (Rasamiravaka *et al*. 2015).

Dördüncü aşamada biyofilm tamamen olgunlaşır. Bu genellikle, biyofilm için ortalama 100 μm kalınlık olarak tanımlanır, mikroplaka okuyucu tarafından ölçüdü. Biyofilmi oluşturan planktonik hücrelere göre saptanabilir proteinlerin ifadesinde altı kattan fazla farklılık vardır (Stoodley *et al*. 2002).

Biyofilm gelişiminin son aşamasında, hücre ölümü ve otolize bağlı olarak biyofilmin merkezinde bir boşluk oluşmaya başlar, böylece tohumlanma veya sürünün dağılması ve içi boş bir höyük oluşturma süreci başlar (Ma *et al*. 2009). Bu boşluk, sonunda salınan planktonik, hareketli hücrelerle dolar (Hall-Stoodley *et al*. 2004). Biyofilm yaşam döngüsünün önemli bir aşaması, bakterilerin bir biyofilmden dağılmasıdır. Bakteriyel biyofilm ayrılmasında temel rol oynayan bütünleyici faktörler (biyofilmin içinde ve dışında) vardır. Rhamnolipid, ayrılma işlemi için gereklidir ve bu ayrılma mekanizması, bakterilerin ayrılmasına karşı antibiyotik duyarlılığını hızla geri

kazandırır (Boles *et al*. 2005). Besinlerin biyofilm içindeki hücrelere perfüzyonu ve atıkların uzaklaştırılması, bir biyofilmin korunması için esastır. Bakteriler bir biyofilmden farklı şekillerde yayılır. İlk olarak, açlık sırasında bakterilerin kendileri tarafından belirli bir planlı şekilde indüklenen aktif dağılım vardır (Dunne Jr 2002).

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Ekipman ve Aletler

Bu çalışmada kullanılan ekipman ve aletler Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1Çalışmada kullanılan ekipman ve aletler

EKİPMAN ve ALETLER	FİRMA ve MENŞEİ
Otoklav	Fanem / Brezilya
Biyogüvenlik kabini	Chcbiolus / Çin
Santrifüj	Fisher Scientific / ABD
Işık mikroskopu	Olympus / Japonya
Derin dondurucu	Uneva / Çin
Dijital kamera	Canon / Japonya
Elektronik tartı	Kern / Kore
Jel görüntüleme sistemi	Major Science / Tayvan
Etüv	Iso / Türkiye
Termal cycle	Dragon Lab / Çin
Biyogüvenlik kabini	CHC / Kore
Mikropipetler	Dragon Lab / Çin
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek / ABD
Mikroplaka yıkayıcı	Bio Tek / ABD
Mikro spin santrifüj	My Fugene / Çin
Mikrodalga fırın	Gosonic / Çin
Mikro qPCR döngüleyici	Bio Molecular System / Avustralya
Mikro tüp	Bio Molecular System / Avustralya
OWL elektroforez sistemi	Thermo / ABD
Petri kabı	Qclab / Çin
Yassı tüp	J.W.R. / Çin
Yazıcı	Epson / Endonezya
Kuantus florometre	Promega / ABD
Buzdolabı	Teka / İspanya
Termal ısı döngüleyici	Thermo Fisher Scientific / ABD
Vorteks	Fanem / Brezilya
Su banyosu	Memmert / Almanya
0,5ml. 1,5 mL ve 0.2mL tüp	JET BIOFIL / Singapur
96 oyuklu mikroplaka	Citotest / Çin

3.2 Kimyasal ve Biyolojik Materyaller

Bu çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve biyolojik materyaller Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik materyaller

KİMYASALLAR ve BİYOLOJİK MATERYALLER	FİRMA ve MENŞEİ
Mutlak etanol	GCC / BK
Agaroz jel	Promega / ABD
Baryum klorür ($BaCl_2.2H_2O$)	Difco / ABD
Kloroform	LiChrosolv / Almanya
Kristal viyole	Himedia / Hindistan
DNA ladder (100 bp)	Promega / ABD
Etanol (70%)	ROMIL pure chemistry / BK
Etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml)	Promega / ABD
Asetik asit	Macron / ABD
Glikoz	Himedia / Hindistan
Gliserol	GCC / BK
Gram boyama seti	Himedia / Hindistan
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	BDH / BK
İzopropanol	ROMIL pure chemistry / BK
McFarland bulanıklık standart tüpü (No. 0.5)	Biomerieux / Fransa
Metanol	CARLO ERBA / Fransa
$MgCl_2$	Promega / ABD
N, N, N, N-tetrametil-p-fenilen diamin-dihidroklorür	BioMerieux / Fransa
Serum fizyolojik	Pioneer / Irak
Nükleaz free Su	Promega / ABD
Proteinaz K çözeltisi	ABIOpure / ABD
QuantiFluor boya	Promega / ABD
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Scharlau / İspanya
TAE tamponu (Tris-acetate-EDTA) 40X	Promega / ABD
TRIzol reaktifi	Thermo scientific / ABD

3.3 Antibiyotikler ve Antibiyotik Diskler

Bu çalışmada kullanılan Antibiyotikler ve Antibiyotik Diskler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

P. aeruginosa, çok sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu veya enfeksiyon tanımlandıktan sonra antibiyotik direnci geliştirdiği için tedavisi zor bir mikroorganizmadır. Antibiyotik sınıflarına şunları içerir; sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozitler ve florokinolonlar (Moradali *et al*. 2017). Bu sebeple her grüpten bazi antibiyotik seçtim.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve antibiyotik diskler

ANTİBİYOTİK	KISALTMA	KONSANTRASYON	FİRMA ve MENŞEİ
Amikasin (disk)	AK	30 µg	Liofilchem / İtalya
Sefepim (disk)	CPM	30 µg	Mast Group / B.K.
Seftazidim (disk)	CAZ	30 µg	Mast Group / B.K.
Siprofloksasin (disk)	CIP	5 µg	Liofilchem / İtalya
Gentamisin (disk)	CN	10 µg	Bioanalyse / Türkiye
İmipenem (disk)	IPM	10 µg	Bioanalyse / Türkiye
Meropenem (disk)	MEM	10 µg	Bioanalyse / Türkiye
Amikasin çözeltisi	AK	500 mg/2mL	Amikaver / Türkiye
Nalidiksik asit (toz)	NA	15 mg	Himedia / Hindistan

3.4 Kitler

Mevcut çalışmada kullanılan tüm kitler Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kitler

TEST	KİT	FİRMA ve MENŞEİ
Gen tespiti	ABIOpureTM Total DNA	ABIOpure / ABD
	GoTag Green Master Mix, Quantifluor dsDNA System	Promega / ABD
	Primerler	Macrogen / Kore
Gen ifadesi	GoTaq® 1-Step RT-qPCR System, Quantifluor RNA System.	Promega / ABD
	Primerler	Macrogen / Kore

3.5 Primer Dizileri

Bu çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.5'te listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler

PRİMER İSMİ	SIRA (5´- 3´)	BAĞLANMA SICAKLIĞI (°C)	AMPLİKON BOYUTU (bp)
algD	F- GCTCAACCTGTCGCGCTACT R- GAACTCGCCACCACTTCGTC	60	423
fbp (HK)	PA5110 For. CCTACCTGTTGGTCTTCGACCCG PA5110 Rev. GCTGATGTTGTCGTGGGTGAGG	60	423

3.6 Kültür Ortamı (Besiyeri)

Bu çalışmada kullanılan ortamlar Çizelge 3.6'da listelenmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan besiyerleri

ORTAM (BESİYERİ)	ŞİRKET/ MENŞEİ
Kanlı Agar	Himedia / Hindistan
Beyin Kalp İnfüzyon Suyu	Himedia / Hindistan
Setrimid Agar Ortamı	Himedia / Hindistan
MacConkey Agarı	Himedia / Hindistan
Mueller Hinton Agar	Neogen / B.K.
Mueller Hinton Sıvısı	Himedia / Hindistan
Besin Agarı	Neogen / B.K.
Besin Broth	Neogen / B.K.
Tryptone-Soy Broth	Himedia / Hindistan

3.7 Kültür Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çizelge 3.6'da listelenen tüm besiyerleri, ticari firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı ve 1 atmosfer basınç altında 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi, ardından gerektiği gibi steril Petri kaplarına veya test tüplerine dağıtıldı. Daha sonra test 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı.

3.8 Laboratuvarda Hazırlanan Ortam

3.8.1 Kanlı agar

Kanlı agar, üretici firmanın prosedürüne göre hazırlandı. Daha sonra 45°C'ye soğutuldu ve ardından %5 (h/h) insan kanı eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra steril Petri kaplarına döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı (Madigan *et al.* 2006). Bu besiyeri, bakterilerin izolasyonu ve kültivasyonu için kullanıldı.

3.8.2 Setrimid agar

Setrimid agar, 46,7 g Setrimid agarın 10 mL gliserol içeren 1000 mL Distile su içinde çözülmesi ve ardından 1 atmosfer basınç altında (121 °C) 15 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edilmesiyle hazırlandı. 45 °C'ye soğutulduktan sonra petri kaplarına döküldü. Pigment üretimini ve bakterilerin toksik madde Setrimidi tolere etme yeteneğini saptamak için ortama (15 mg) Nalidiksik asit ilave edildi (Atlas and Snyder 2006)

3.9 Mevcut Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve Reaktifler

3.9.1 Kristal viyole solüsyonları

Son konsantrasyon (%0,5) olacak şekilde, 100 mL distile su'da (0,5 gm) kristal viyole eklenerek hazırlandı ve sonra kullanıma kadar 25°C'de tutuldu (Baker *et al*. 2014).

3.9.2 Katalaz reaktifi

Bir stok çözeltisinden (%30) %3'lük bir hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı ve koyu renkli bir şişede 3-8°C'de saklandı. Bu reaktif, katalaz varlığını tespit etmek için kullanıldı.

3.9.3 Etidyum bromür boyası

Bu boya (10 mg/mL) distile su ile hazırlandı, daha sonra serin bir yerde ve koyu renkli bir reaktif şişesinde saklandı (Sambrook and Russell 2006).

3.9.4 Oksidaz reaktifi

Bu reaktif, Sitokrom oksidaz enziminin tespiti için kullanıldı. 1 g N, N, N, N-tetrametil-p-fenilen diamin-dihidroklorürün 100 mL distile su içinde çözülmesiyle taze olarak hazırlandı ve oda ısısı'de ve koyu renkli bir şişede saklandı.

3.9.5 Tris borat EDTA tamponu (TBE, IX)

Bu çözelti (10 Lm) stok TBE-10X'in (90 Lm) distile su ile karıştırılmasıyla hazırlandı, daha sonra elektroforezde kullanılana kadar 4°C'de tutuldu (Sambrook 1989).

3.9.6 Magnezyum sülfat $MgSO_4$ 1M

24,65 g $MgSO_4$ 75 mL su distile içinde çözüldü, sonra 100 mL hacme getirildi ve otoklavda (15 dakika, 121°C) sterilize edildi.

3.9.7 McFarland standardı (0,5)

0,5 McFarland standardı, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi standartlarını takip ederek, 99,95 mL of 0,18 M Sülfürik aside (1% w/v H_2SO_4) 0,048 M baryum klorür (%1,17 w/v $BaCl_2$. $2H_2O$) eklenerek hazırlandı. Absorbans, 625 nm dalga boyunda bir spektrofotometrede ölçüldü ve standart için absorbans aralığı 0,08-0,13 olarak Kabul edildi. Daha sonra tüp homojen olması için vorteks ile iyice karıştırıldı iyice karıştırılmıştır. Buharlaşma ile kaybı önlemek için sıkıca kapatılmış ve oda sıcaklığında ışıksız ortamda saklandı. Kullanımdan önce tüp elle kuvvetlice çalkalandı. Bu karışım, antibiyotik duyarlılık testi için bulanıklık standardizasyonu,

Biyofilm oluşturma testi ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ölçümü için kullanıldı.

3.10 Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

3.10.1 Numune toplama ve bakteri izolasyonu

Kasım 2020'den Mart 2021'e kadar olan dönemde, Bağdat'ta bulunan Burn hastanesi, Al-Askandria Hastanesi ve Al-Yarmouk Eğitim hastanelerine başvuran hastalardan 175 farklı ve tekrarlanmayan örnek toplandı. Toplanan örnekler 100 adet yanık sürüpüntüsü ve 75 adet yara sürüpüntüsü içeriyordu. Kontaminasyonu önlemek için aseptik teknikler takip edildi.

Toplanan örnekler Kanlı agar ve MacConkey agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi inkübe edildi. Daha sonraki deneyler için, MacConkey agar üzerinde geliştirilen renksiz laktoz olmayan fermenter koloniler seçildi.

3.10.2 *P. aeruginosa*'nın tanımlanması

P. aeruginosa'ların tanımlanmasında, koloni morfolojisi, ortamın kıvamı, rengi, koloni yüksekliği, karakteristik kokusu, pigmentasyonu, oksidaz enziminin varlığı ve pH değişiklikleri gibi özellikleri gözlemlenerek mikroskobik ve makroskopik olarak tanımlandı. Daha sonra, morfolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak tanımlama gerçekleştirildi.

A. Mikroskobik inceleme

İzolatlar, Gram boyama özelliklerine göre incelendi. İmmersiyon objektifi (x100) kullanılarak mikroskobik ön değerlendirme yapıldı.

B. Setrimid besiyerinde büyüme

Setrimid agar, *P. aeruginosa*'ya seçici olduğundan, bu bakterinin izolasyonu ve ön tanımlanması için selektif katı besiyeri olarak kullanıldı. Setrimid agar besiyerine ekimi yapılan örnekler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bakterilerin bu besiyerinde büyüme ve pigment üretme yeteneği incelendi.

C. 42℃'de Büyüme

İzolatar 42 °C'de, 18-24 saat boyunca Besin agar ve Setrimid agar besiyerlerinde inkübe edildi. 42℃'de üremesi ve pigmentasyon görünümü pozitif sonuç olarak kabul edildi.

D. Laktoz fermantasyon testi

İzolatlar, azaltma yöntemiyle MacConkey agar kültürlendi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi pozitif sonuç, laktoz fermantasyonu ile ilişkili pembe koloniler ile gösterilirken, soluk sarı koloniler, laktoz fermantasyonu yönünden negatif olarak değerlendirildi.

E. Katalaz üretim testi

Bu test, bakterilerin hidrojen peroksiti oksijene ve suya dönüştüren katalaz üretme yeteneğini saptamak için kullanıldı. Besin agar besiyeri üzerinden alınan koloniler temiz bir mikroskop lamına aktarıldı ve ardından birkaç damla %3 hidrojen peroksit eklendi. Gaz kabarcıklarının varlığı katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

F. Oksidaz testi

Filtre kâğıdı, oksidaz reaktifi ile satüre edildi ve daha sonra, 24 saat boyunca inkübe edilen Besin agardan bir koloni steril bir tahta çubuk kullanılarak filtre kağıdına aktarıldı. 10-30 saniye içinde mor bir renk gelişmesi pozitif sonuç olarak kaydedildi.

Kolonide herhangi bir renk değişikliği gözlemlenmediğinde sonuç negatif olarak değerlendirildi.

3.11 *P. aeruginosa'nın* Korunması ve Bakımı

Bakteriyel izolatlar şu şekilde muhafaza edilmiştir:

3.11.1 Kısa süreli muhafaza

Saf bakteri izolatları, üniversal tüplerde 20 mL'lik eğimli steril Besin agar üzerinde, agar yatık yüzeyin sürme yoluyla büyütüldü, 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve daha sonra 4°C'de maksimum 3 ay saklandı (Harley 2016).

3.11.2 Orta süreli muhafaza

Bakteriyel izolatlar birkaç ay boyunca saplama kültüründe muhafaza edildi. Bu tür kültürler, 5 mL Besin agar ortamı içeren vidalı kapaklı test tüplerinde hazırlandı ve 4°C'de saklandı (Maniatis *et al*. 1982).

3.11.3 Uzun süreli muhafaza

Bakteriyel izolatlar, 0,8 mL Beyin Kalp İnfüzyon Suyuna 0,2 mL steril gliserol eklenerek hazırlanan %20 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon suyunda saklandı, daha sonra katı bir besiyerinde üretilen saf bakteri kolonileri -20°C'de 1-2 yıl boyunca saklandı (Benson 2002).

3.12 Antibiyotik Duyarlılık Testi (ADT)

İzolatların duyarlılıklarının belirlenmesinde Disk Difüzyon metodu kullanıldı.

A. Mueller-Hinton agar, imalatçı firma talimatlarına göre hazırlandı ve otoklavda 1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri sıcaklığı yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kaplarına döküldü.
B. İnokülümlar, 0,5 McFarland bulanıklık standartlarına göre ayarlanarak 1,5 x 10^8 CFU/ml'ye eşit kültür elde etmek için gece boyunca inkübe edilen 3-5 koloninin 5 ml'lik bir BKİS tüpüne aktarılmasıyla hazırlandı.
C. Plakalar, inokulumun içine steril bir pamuk çubuk batırılarak aşılandı. Fazlalık pamuk çubuğu sıvı seviyesinin üzerinde tüpün yanında sıkıştırarak ve döndürerek giderildi.
D. Pamuk çubuk, her uygulamadan sonra plakayı 60°C'lik bir açıyla döndürerek ortamın tüm yüzeyine dört kez sürüldü. Son olarak sürüntü agar yüzeyinin kenarından geçirildi.
E. Petri kapları oda sıcaklığında birkaç dakika kurumaya bırakıldı.
F. Seçilen antibiyotik diskleri steril forseps kullanılarak besiyeriüzerine (her plaka 4 veya 3 diskli) yerleştirildi. Diskler oda sıcaklığına ısıtıldı ve ardından agar yüzeyine dağıtıldı; forseps ile hafifçe bastırıldı.
G. Antibiyogram uygulanan petri kapları etiketlendi ve 18-24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
H. *P. aeruginosa* ATCC (27853) kalite kontrol suşu olarak kullanıldı.

3.13 Amikasinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Mikroorganizmanın görünür büyümesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu belirlemek için sıvı mikro seyreltme testi (MDT) aşağıdaki şekilde yapıldı (Andrews 2002)

A. Steril bir test tüpü içinde bir stok solüsyondan (500 mg/2 mL) 2048 µg/mL konsantrasyonda bir Amikasin solüsyonu hazırlandı.
B. 100 µL hacminde Muller Hinton Sıvısı, 1'den 11'e kadar steril 96 kuyucuklu U-şekilli tabanlı polistiren mikroplakalara eklendi.

C. Çalışma stoğundan 1 No'lu kuyucuğa 100 µL hacim eklendi, dikkatlice karıştırıldı ve daha sonra fazladan 100 µL atılana kadar 11. kuyucuğa kadar aktarıldı. Böylelikle, farklı Amikasin konsantrasyonları (1024'ten 1 µL/mL'ye kadar) elde edilmiş oldu. Bununla birlikte, 12 No'lu kuyucuğa 100 µL distile su ilave edildi.
D. Negatif kontrol olarak Kabul edilen 11 numaralı kuyucuk haricindeki tüm kuyucuklar, 0,5 McFarland standartlarına (1,5 x 10^8 CFU/mL) benzer şekilde 10 µL bakteri süspansiyonu ile aşılandı. 12 numaralı kuyucuk pozitif kontrol olarak kabul edildi. Daha sonra mikroplakası 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi.
E. Her bir bakteri izolatı için MIK, görünür bir büyüme göstermeyen en düşük konsantrasyon olarak yorumlandı. Sonuçlar standart kesme noktası değerleriyle karşılaştırıldı; CLSI 'ye göre hassas (≤ 16 µg/mL), orta (32 µg/mL) ve dirençli (≥ 64 µg/mL) olarak belirlendi.

3.14 Biyofilm Oluşum Testi

P. aeruginosa'nın 50 izolat için biyofilm oluşturma yeteneği ve biyofilm miktarı, (Atshan *et al*. 2012) tarafından tarif edildiği gibi değerlendirildi. Kısaca:

A. Toplam elli adet izolat (BKİS) içinde aşılandı ve 37°C'de 18 saat boyunca inkübe edildi.
B. Tüm izolatlar, %1 glikoz içeren BKİS kullanılarak seyreltildi. Bakteri izolatının süspansiyonu, 0,5 McFarland bulanıklık standartlarına ayarlandı.
C. Her izole edilmiş kültürden bir hacim (200 µL), steril 96 kuyucukl U-şekilli tabanlı polistiren Mikroplakaların üç kuyucuğuna ilave edildi. Negatif kontrol olarak altı kuyucuğa bakteri içermeyen bir ortam yerleştirildi.
D. Plakanın kapakları kapatıldı ve aerobik koşullar altında 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi.
E. İnkübasyon periyodundan sonra planktonik hücreler, bağlanmamış bakterileri uzaklaştırmak için iki kez deiyonize su ile durulandı ve daha

sonra plakadan filtre kağıdı vasıtasıyla fazla su alındı, kurutuldu ve 1 saat boyunca 65°C'de sabitlendi.

F. Mutlak metanol (200 µL), oda sıcaklığında 10 dakika boyunca her bir kuyucuğa ilave edildi. Daha sonra, iki kez deiyonize su ile durulandı ve daha sonra kuruması için plaka filtre kağıdı ile fazla su alındı.
G. Yapışkan hücreler, her bir oyuğa 200 µL %0,5 kristal viyole eklenerek boyandı ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca bırakıldı.
H. Boyama reaksiyonu tamamlandıktan sonra, distile su ile tekrar tekrar yıkama (2-3 yıkama) ile fazla leke çıkarıldı.
I. Plakalar, filtre kağıdı vasıtasıyla kurutuldu ve tamamen kuruması için yaklaşık 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakıldı.
J. Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µL Etanol ve Glacial asetik asit (1:1 h/h) ilave edildi ve 10 dakika bırakıldı.
K. Her bir kuyucukta oluşan Biyofilm miktarı, bir mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçüm yapıldı.

OD_{630} değerlerine dayalı olarak Tablo 3.7'de ve bireysel *P. aeruginosa* izolatı için elde edilen bakteriyel yapışmanın sınıflandırılması, gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 Mikrotiter plak yöntemi ile bakteri yapışmasının sınıflandırılması

ORTALAMA OD_{630}	BİYOFİLM YOĞUNLUĞU
$OD \leq OD_C$*	Biyofilm olmayan üretici
$OD_C < OD \leq 2OD_C$	Zayıf
$2OD_C < OD \leq 4OD_C$	Ortalama
$OD < 4OD_C$	Güçlü

Kesme değeri (OD_c) = Negatif kontrollerin ortalama OD'si + 3 (Kontrolün standart sapması)

Test edilen tüm izolatlar ve negatif kontroller için biyofilm oluşturma kapasitesi hesaplandıktan sonra cut-off değeri (OD_C) belirlendi. Cut-off değeri (OD_C), negatif kontrolün OD'sinin üzerindeki üç Standart Sapma (SD) olarak tanımlanır, burada OD_C

değeri her bir mikrotitre plakası için ayrı ayrı hesaplanır. Sıfır olarak sunulduğunda negatif bir değer elde edildi ve herhangi bir pozitif değer biyofilm üretimi için bir göstergeydi.

3.15 Antibiyotiğin Alt-MİK'inin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

A. Toplam yirmi beş seçilmiş izolat, 37°C'de (Beyin Kalp İnfüzyon Suyu) içinde gece boyunca (18 saat) büyütüldü.
B. Bakteri izolatlarından oluşan bir süspansiyon, çift güçlü Muller Hinton Sıvısı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklık standartlarına ayarlandı.
C. MIK'de (128 µg, 256 µg ve 512 µg) amikasin, azırlandısu kullanılarak h distile.
D. Bir Mikrotiter plakası kullanılarak, her izolat için altı adet oyuğa çift kuvvetli Muller Hinton Sıvı'ın bir alikotu (100 µL) ilave edildi.
E. Hazırlanan amikasin hacminden üç kuyucuğa 100 µL, diğer üçe ise 100 µL su distile eklendi.
F. Her bir izolat için altı adet oyuğa bir miktar (10 µL) bakteri süspansiyonu (adım b) ilave edildi.
G. Negatif Kontrol olarak altı adet oyuğa 100 µL DS ile toplam 100 µL çift kuvvetli Mueller Hinton Sıvısı eklendi.
H. Mikrotitre plakası aerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.
I. Daha sonra, biyofilm yoğunluğu, mikroplaka okuyucu kullanılarak OD_{630} ölçülerek doğrudan ve spektrofotometrik olarak ölçüldü.
J. Bakteri yapışmasının sınıflandırılması, Çizelge 3.7'de belirtildiği gibi özetlendi.

3.16 *AlgD* Tespiti

Toplam 15 adet seçilmiş izolat, 37°C'de BKİS'de gece boyunca (18 saat) büyütüldü. İzolatlar, amikasin alt-MİK testi altında biyofilm oluşumu sonuçlarında önemli farklılıkların ve biyofilm yoğunluğunun görünümüne bağlı olarak seçilmiştir. *AlgD* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile moleküler tespiti, *algD* genini amplifiye etmek için ekstraksiyon Kiti ve *algD*'ye özgü primer kullanılarak bu izolatlar için gerçekleştirildi.

3.16.1 DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, üretici şirketin (ABIOpure) Ekstraksiyon protokolüne göre bakteri üremesinden izole edildi ve bu süreçte aşağıdaki adımlar izlendi:

A. Pelletteki hücreler için, 1 mL gecelik 2 dakika 13,000 x g'de santrifüjlendi. Süpernatant daha sonra atıldı.
B. Hücre pelleti, 200 µL Tampon CL içinde tamamen yeniden süspanse edildi.
C. Protein sindirimi ve hücre lizizi için 200 µL buffer CL ve hücre peletine 20 µL Proteinaz K solüsyonu (20 mg/mL) ilave edildikten sonra tüp vorteks kullanılarak kuvvetlice karıştırıldı ve 56°C'de 30 dakika inkübe edildi.
D. İnkübasyondan sonra numuneye 200 µL buffer BL eklendi ve tüp vorteks ile kuvvetlice karıştırıldı ve 70°C'de 30 dakika inkübe edildi.
E. Etanolden numuneye 200 µL ilave edildi ve numuneyi iyice karıştırmak için vorteks kullanıldı.
F. Tüm karışımlar dikkatli bir şekilde mini kolona aktarıldı, daha sonra 10,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
G. Buffer BW'den mini kolona 600 µl eklendi, ardından 10,000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
H. Buffer TW'den 700 µL eklendi. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Geçiş atıldı ve mini kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.
I. Mini kolon, kalan yıkama tamponunu çıkarmak için 1 dakika boyunca tam hızda (13,000 xg) santrifüjlendi, daha sonra mini kolon, yeni bir 1,5 mL tüpe yerleştirildi.
J. Buffer AE'den 100 µL ilave edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, ardından 5,000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.

3.16.2 DNA miktar tayini

Quantus Florometre, aşağı akış uygulamaları için numunelerin iyiliğini tespit etmek amacıyla ekstrakte edilmiş DNA konsantrasyonunu tespit etmek için kullanıldı. 1 µL

DNA için 199 µL seyreltilmiş QuantiFluor Dye karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra DNA konsantrasyonları ölçüldü.

3.16.3 Öncül (primer) hazırlığı

Liyofilize primerler, bir stok solüsyonu olarak 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyon verecek şekilde üretici firmanın talimatlarına göre belirli bir miktarda nükleaz içermeyen su içinde çözündürüldü ve dondurucuda -20°C'de saklandı. Bu primerlerin çalışma solüsyonu, 10 pmol/µL'lik bir çalışma primer solüsyonu elde etmek için 90 µL nükleaz içermeyen suya 10 µL primer stok solüsyonu eklenerek hazırlandı.

3.16.4 PCR reaksiyonu ve termal döngü protokolü

Bu yöntem, kit imalat şirketi (Promega/ABD) tarafından desteklenen genomik DNA amplifikasyon koşullarına göre gerçekleştirildi. PCR, her numune için 15 µL 'lik bir son hacimde gerçekleştirildi; burada, tüp başına tek 14 µL Ana karışım başına alikuot Çizelge 3.8'de olduğu gibi 1 µL Şablon ekler ve amplifikasyon koşulları Çizelge 3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.8 Reaksiyon karışımının bileşenleri

REAKSİYON KARIŞIMININ BİLEŞENLERİ	HACİM
Ana karışım	**7,5** µL
İleri primer	1 µL
Ters primer	1 µL
Nükleazsız su	4,5 µL
Kalıp DNA	1 µL
Son hacim	15 µL

Çizelge 3.9 PCR amplifikasyon programı

AŞAMA	°C	ZAMAN d:s	SİKLUS
İlk denatürasyon	95	05:00	1
Denatürasyon	95	00:30	30
Bağlanma	60	00:30	
Uzama	72	00:30	
Son uzama	72	07:00	1
Ekstansiyon	10	10:00	

3.16.5 Agaroz jel elektroforezi

PCR amplifikasyonundan sonra, amplifikasyonun varlığını doğrulamak için agaroz jel elektroforezi uygulandı. PCR, ekstrakte edilen DNA kriterlerine tamamen uygun seviyede gözlemlendi.

Solüsyonlar

A. Agaroz hazırlanması

- 100 mL 1X TAE tamponuna 1,5 g (%1,5 için) agaroz miktarı ilave edildi.
- Çözelti, tüm jel partikülleri çözünene kadar kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
- 1 µL Ethidium Bromide (10 mg/mL) alikosu ilave edildi ve karıştırılmak ve kabarcık oluşumunu önlemek için karıştırıldı.
- Çözeltinin 50-60°C'de soğumasına izin verildi.

B. Yatay agaroz jelin dökümü

Agaroz çözeltisi, her iki kenarı selofan bantlarla kapatıldıktan sonra jel tepsisine döküldü ve agarozun oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmasına izin verildi. Tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel, jel tepsisine yerleştirildi. Tepsi, tampon, jel yüzeyi üzerinde 3-5 mm'ye ulaşana kadar 1X TAE-elektroforez tamponu ile doldurulduu.

C. DNA yükleme

PCR ürünleri doğrudan yüklendi. PCR ürünü için 5 µl doğrudan oyuklara yüklendi. 60 dakika boyunca 100 v/mAmp'de elektrik gücü uygulandı. DNA, Katottan, Artı Anot kutuplarına hareket etmektedir. Jel içindeki etidyum bromür lekeli bantlar, Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.17 *AlgD*'nin Gen İfadesi

3.17.1 RNA pürifikasyonu

RNA, alt-MİK'de Amikasin ile işlenmiş 10 *P. aeruginosa* izolatlarından izole edildi, işlenmemiş izolatlar, GoTaq® 1-Step RT-qPCR sisteminin protokolüne göre kontrol olarak sunuldu ve aşağıdaki adımlar göre:

A. Örnek lizis

Pelet hücreler için, 1,5 mL hücre kültürü, 13,000 xg'de 2 dakika boyunca santrifüj edilerek çökeltildi, daha sonra süpernatan atıldı ve pelete 0,75 mL TRIzol™ Reaktifi ilave edildi. Bundan sonra lizat, birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleme yapılarak homojenleştirildi.

B. Üç fazlı ayırıcılar

Her tüp için lizata 0,2 mL kloroform eklendi, ardından tüp kapağı sabitlendi. Ardından, tüm karışımlar 2-3 dakika inkübe edildi, ardından 10 dakika 12,000 x g'de santrifüjlendi, karışım bir alt organik faz, interfaz ve renksiz bir üst sıvı faza ayrıldı. Son olarak, RNA'yı içeren sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı.

C. RNA çökeltme

Sıvı faza 0,5 mL izopropanol hacmi eklenerek 10 dakika inkübe edilmesinin akabinde 10 dakika boyunca 12,000 x g'de santrifüjlendi. Toplam RNA çökeltildi ve tüpün dibinde beyaz jel benzeri bir pelet oluşturuldu. Daha sonra süpernatant atıldı.

D. RNA yıkama

Her tüp için 0,5 mL %70 hacminde etanol eklenip vorteksle kısa süre karıştırıldıktan sonra 10,000 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Etanol daha sonra peleti aspire etti ve havayla kuruttu.

E. RNA çözünürlüğü

Pelet, 50 µL Nükleazsız Su içinde yeniden hidratlandı, ardından bir su banyosunda veya 55–60°C'ye ayarlanmış bir ısı bloğunda 10-15 dakika süreyle inkübe edildi.

3.17.2 RNA ve cDNA veriminin belirlenmesi

Kuantus Florometre, aşağı akış uygulamaları için numunelerin kalitesini tespit etmek amacıyla ekstrakte edilmiş RNA veya cDNA konsantrasyonunu tespit etmek için kullanıldı. 1 µL RNA veya cDNA için 199 µL seyreltilmiş QuantiFlour Dye karıştırıldı. Oda sıcaklığında karanlık bir yerde 5 dakika inkübasyondan sonra RNA konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.17.3 Primer hazırlığı

3.17.3.1 Reaksiyon kurulumu ve termal ısı döngü protokolü

Ters transkripsiyon ve PCR, Çizelge 3.10'da gösterilen üretici şirket (Promega/ABD) tarafından desteklenen GoTaq® 1-Step RT-qPCR sistemine uygun şekilde her numune

için 10 µL 'lik bir nihai hacimde tek adımda gerçekleştirmiş olup, mplifikasyon koşulları Çizelge 3.11'de sunuldu.

Çizelge 3.10 qRT-PCR için reaksiyon karışımının bileşenleri

ANA KARIŞIM BİLEŞENLERİ	HACİM
qPCR Temel Karışımı	5
RT karışımı	0,25
MgCl2	0,25
İleri primer	0,5
Ters primer	0,5
Nükleazsız su	2,5
RNA	1
Toplam hacim	10

Çizelge 3.11 *AlgD* gen ekspresyonunda kullanılan qRT-PCR amplifikasyon programı (Alshalchi and Anderson 2014)

ADIM	°C	ZAMAN (d:sn)	SİKLUS
RT. enzim aktivasyonu	37	15:00	1
İlk denatürasyon	95	5:00	
Denatürasyon	95	00:20	40
Yeniden birleşme	60	00:20	
Ekstansiyon	72	00:20	

3.17.3.2 Gen ifadesi hesaplaması

Ekspresyon seviyeleri, rölatif ölçme yöntemiyle tanımlandı. Döngü eşikleri (ΔCt) ve sargı değişkenleri arasındaki fark, tedavi edilen gruplar ve her bir genin kalibratörleri arasında değerlendirildi (Livak and Schmittgen 2001). Bu değerler, Denklem (3.1), Denklem (3.2) ve Denklem (3.3)'de gösterildiği gibi *fbp* ifadesine normalleştirildi

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.1)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Arıtılmış} - \Delta C_t \text{ kontrol} \quad (3.2)$$

$$\Delta C_t = C_t \text{ test edilmiş gen} - C_t \text{ referans gen} \quad (3.3)$$

Her saniyede bir (1°C) artışla (60°C ile 95°C) arasında değişen sıcaklıklarda bir erime eğrisi elde edildi.

3.18 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatiksel analiz SPSS 22 programı yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Kategoriler göre veriler sayı ve yüzde olarak formüle edildi. Antibiyotiklerin biyofilm üzerindeki etkisini değerlendirmek için T-testi kullanıldı. Ayrıca, değişim oranları ile antibiyotik alt-MİK arasındaki korelasyonu kontrol etmek için bir Pearson korelasyon katsayısı kullanıldı. Kabul edilen istatistiksel anlamlı farkın seviyesi 0,05'in altında olanladır.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *P. Aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Tanımlanması

Mevcut çalışmada toplam 175 klinik örnek toplanmıştır, Çizelge 4.1'de özetlendiği gibi örneklerin sadece 96'sı (%54,9) izolat Gram negatif bakterilere aittir. Gram negatif bakterilere ilişkin yanık örnekleri en yüksek izolasyon yüzdesini (%56,25) oluştururken, yara örnekleri izolasyon (%43,75) tür. İlerideki çalışmalar için Gram-negatif izolatlar seçilmiştir.

Çizelge 4.1 Örnek tipine göre çalışılan izolat sayıları ve yüzdeleri

NUMUNELER	TOPLAM MİKTAR	GRAM POZİTİF BAKTERİLERİN SAYISI (%)	GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN SAYISI (%)
Yanık örnekleri	100	46 (58,2%)	54 (56,25%)
Yara örnekleri	75	33 (41,8%)	42 (43,75%)
Toplam	175	79 (45,1%)	96 (54,9%)

Gram boyanma ve koloni morfolojisi özellikleri kullanılarak *P. aeruginosa* varlığını doğrulamak için MacConkey agarda (37°C'de 24 saat boyunca) kültürlenen 96 Gram-negatif izolat için mikroskobik inceleme yapıldı. Sonuçlar, incelenen tüm hücrelerin tek veya çiftler halinde düzenlenmiş, çubuk şeklinde göründüğünü ve spor oluşumunun olmadığını ortaya koydu.

Çizelge 4.2 biyokimyasal testlerin sonuçlarını özetlemektedir; test edilen tüm izolatlar, *P. aeruginosa* için kritik bir tanı testi olarak kabul edilen oksidaz testi için pozitiftir. Bu enzim, donör bakteri ve pigment arasında elektron taşınmasını başlatarak koyu mor rengin azalmasına neden olur. Ayrıca, tüm izolatlar katalaz için pozitif olarak test edildi (Harley 2016).

Çizelge 4.2 *P. aeruginosa*'nın morfolojik ve biyokimyasal tanımlaması

TEST	SONUÇLAR
Gram boyama	Negatif
MacConkey Agarı	Soluk yükseltilmiş koloniler
Oksidaz	Pozitif (Mor renk)
Katalaz	Pozitif (Kabarcıklar)
42℃'de besin Agarı	Pozitif
42℃'de setrimid agar	Floresan yeşil renk, yüksek koloniler ve üzüm benzeri koku ile büyüme

MacConkey agarda üreyen izolatlar besin agarında yeniden kültürlendi ve 42°C'de inkübe edildi, çünkü bu durum 4°C'de büyüyen ancak 42°C'de büyümeyen *P. floresan* ve *P. putida* gibi diğer *Pseudomonas* spp. arasında *P. aeruginosa* için önemli bir tanısal özelliktir (Greenwood *et al*. 2012). Sadece 50 (%52) izolatın bu özel sıcaklıkta bu besiyerinde büyüme kabiliyetine sahip olduğunu gösterilmiştir. Koloni, düzenli bir halka biçimine ve kremsi bir renge sahip olmakla birlikte, çoğu piyosiyanin (suda çözünür pigment) üretmiştir. Bu 50 izolat (42 °C'de Besi ağarında üreyen) Setrimid agarda yeniden kültürlendi. İzolatların tanımlanmasını doğrulamak amacıyla Gram pozitif bakterilerin büyümesini önlemek için Nalidiksik asit eklenerek 42°C'de inkübe edildi.

50 izolatın tamamı, *P. aeruginosa*'yı bu besiyerinde üreyemeyen diğer *Pseudomonas* türlerinden ayıran Setrimid agarı üzerinde büyütüldü. *P. aeruginosa*, diğer bakteriler için toksik olan Setrimid'e direnç gösterme yeteneğine sahiptir. Ortamın demir içeriği, *P. aeruginosa* tarafından piyosiyanin ve floresan sarı-yeşil pigment üretimini uyarır (Çizelge 4.3.) Setrimid, bakteri hücrelerinden *Pseudomonas* spp.'den daha fazla salınan bir kuaterner amonyum katyonik deterjan (asetil trimetil amonyum bromür) görevi görür. (Tang and Stratton 2013).

Mevcut çalışma, klinik izolatların çoğunun besin agarında piyosiyanin ürettiğini belirten çalışma sonuçlarıyla (Sameet *et al.* 2020, Al-Fridawy *et al*. 2020, Lahij *et al*. 2021) nispeten uyuşmaktadır. Bu pigmentin üretiminde izolatların kaynaklarının farklılık göstermeyebileceğini, ancak varyasyonların bu izolatların zorlandığı koşullardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Al-Fridawy *et al*. 2020).

Çizelge 4.3'te sunulan mevcut çalışma sonuçları, yanık ve yara örneklerine ait toplam 50 izolattan sırasıyla 28 (%56) ve 22 (%44) olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, Lahij *et al*. 2021, Al-Fridawy *et al*. 2020 tarafından elde edilen çalışmalarla uyumludur. Bu çalışmalarda *P*. *aeruginosa*'nın hastanelerde yanık ve yara enfeksiyonlarına en çok neden olan bakteri türlerinden biri olduğunu bulunmuştur. Bu bakteriler, vücudun savunmasında bir dengesizlikten yararlanan kullanan fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir (Greenwood *et al*. 2012).

Çizelge 4.3 Örnek tipine göre *P*. *aeruginosa* izolatlarının ve diğer türlerinin sayı ve yüzdeleri

NUMUNELER	İZOLAT SAYISI (%) (%)		TOPLAM (%)
	P. *aeruginosa* (n= 50)	Diğerleri (n= 46)	
Yanık örnekleri	28 (% 56)	26 (% 56,5)	54 (% 56,25)
Yara örnekleri	22 (% 44)	20 (%43,5)	42 (% 43,75)
Toplam (%)	50 (% 52)	46 (% 48)	96 (% 100)

P. *aeruginosa* ile oluşan yanık enfeksiyonu oranının yüksek olmasının nedenleri daha çok hastane ortamında oluşabilecek kontaminasyondan, kullanılan aletlerden ve hastanelerde çalışanların kaynaklanmaktadır. Ayrıca yanmış doku, bakteri üremesi için uygun bir ortam olarak kabul edilir. Başta Gram pozitif bakteriler olmak üzere diğer bakteri türleri ile çoklu enfeksiyonlar gelişebilir (Lahij *et al*. 2021, Al-Fridawy *et al*. 2020).

Ek olarak, genel hijyen de meydana gelen eksiklikler, bu bakterilerle artan enfeksiyonlarla ilişkilidir. Ayrıca, nemli bir ortamda hayatta kalmanın evrensel doğası ve birçok antibiyotiğe karşı direnç, *P*. *aeruginosa*'yı hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde yaygın bir patojen haline getirmektedir (Mohammad 2013).

4.2 *P. Aeruginosa*'nın Antibiyotik Duyarlılığı

Bu çalışmada 50 adet *P*. *aeruginosa* izolatı Kirby-Bauer'in standardize disk difüzyon testi (DDT) ile antibiyotik duyarlılık testine tabi tutuldu. Bu teknik, klinik olarak önemli

olan toplam yedi adet farklı antibiyotik kullanılarak yapıldı. Çizelge 4.4'te ve Çizelge 4.5'te gösterilen mevcut bulgular, Amikasine direncin en sık (%36) olduğunu, bunu Seftazidim (%24), Gentamisin (%22), Sefepim (%18), İmipenem (%2) izlediğini ortaya koydu. Ancak tüm izolatlar Siprofloksasine duyarlıydı.

Çizelge 4.4 *P. aeruginosa* için disk difüzyon testi

İzolat Kodu	İzolat Türü	(CN) 10 µg	(MEM) 10 µg	(IPM) 10 µg	(AK) 30 µg	(CIP) 5 µg	(CPM) 30 µg	(CAZ) 30 µg
PA1	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA2	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA3	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA4	Yanık	D	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA5	Yanık	O	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA6	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA7	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	D	Du
PA8	Yanık	Du	Du	Du	D	Di	O	O
PA9	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	D	D
PA10	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA11	Yanık	D	O	Di	D	Du	Du	O
PA12	Yanık	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA13	Yanık	Du	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA14	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	D
PA15	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA16	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA17	Yanık	D	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA18	Yanık	D	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA19	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	O	D
PA20	Yanık	Du	Du	Du	O	Du	O	D
PA21	Yanık	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA22	Yanık	Du	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA23	Yanık	D	O	O	O	Du	Du	Du
PA24	Yanık	Du	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA25	Yanık	D	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA26	Yanık	D	Du	O	O	Du	Du	O
PA27	Yanık	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA28	Yanık	D	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA29	Yara	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA30	Yara	O	Du	Du	Du	Du	Du	Du
PA31	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA32	Yara	D	O	Du	D	Du	Du	D
PA33	Yara	D	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA34	Yara	Du	Du	Du	D	Du	D	D
PA35	Yara	Du	Du	Du	D	Du	O	Du
PA36	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	O
PA37	Yara	Du	Du	Du	O	Du	D	D
PA38	Yara	Du	Du	Du	Du	Du	D	D
PA39	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA40	Yara	Du	Du	Du	D	Du	D	D
PA41	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA42	Yara	Du	Du	Du	Du	Du	D	D
PA43	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA44	Yara	Du	Du	Du	Du	Du	D	D
PA45	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA46	Yara	Du	Du	Du	O	Du	D	D
PA47	Yara	O	Du	Du	O	Du	Du	Du
PA48	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA49	Yara	Du	Du	Du	D	Du	Du	Du
PA50	Yara	D	Du	Du	D	Du	Du	Du

Du= Duyarlı, O=Orta, D= Dirençli

Al-Fridawy *et al*. 2020, *P*. *aeruginosa* izolatlarının yaklaşık % 70'inin amikasine direnç gösterdiğini bildirmiştir; Sameet *et al*. 2020, ise izolatlarının yaklaşık %29,09'unun Gentamisin oranında Amikasin dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak bu sonuçlar, Amikasin'e karşı (% 27,27) oranını gösteren Sameet *et al*. 2020, tarafından yürütülen yerel bir çalışmanın sonuçlarından daha büyüktür.

Çizelge 4.5 *P. aeruginosa*'nın antibiyotik grup tiplerine karşı direnç yüzdesi duyarlılığı (50 izolat)

ANTİBİYOTİK (DİSK GÜCÜ)	DİRENÇLİ	ORTA DÜZEY	DUYARLI
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Amikasin (30 µg)	18 (% 36)	11 (% 22)	21 (% 42)
Seftazidim (30 µg)	12 (% 24)	4 (% 8)	34 (% 68)
Gentamisin (10 µg)	11 (% 22)	3 (% 6)	36 (% 72)
Sefapim (30 µg)	9 (% 18)	4 (% 8)	37 (% 74)
İmipenem (10 µg)	1 (% 2)	1 (% 2)	48 (% 96)
Meropenem (10 µg)	0 (% 0)	3 (% 6)	47 (% 94)
Siprofloksasin (5 µg)	0 (% 0)	0 (% 0)	50 (% 100)

Mevcut çalışmada Seftazidim ve Sefepime karşı direnç (sırasıyla %24 ve %18). Bu çalışmada Seftazidime karşı direnç, Sameet *et al*. 2020, Shehab and Jassim 2019, tarafından yürütülen yerel çalışmanın gösterdiği (%40), (%59,2)'den daha azdı. Bu çalışmada Sefepime karşı direnç, Al-Fridawy *et al.* 2020, Shehab and Jassim 2019, tarafından gerçekleştirilen yerel çalışmanın gösterdiği (% 70), (% 49)'dan daha azdır. Ek olarak, mevcut çalışmada saptanan Seftazidim'e karşı direnç, Jayaprakash and Ummer 2016, tarafından Hindistan'da yürütülen ve yüzdeyi (%49,63) saptayan çalışma sonucundan daha az gözlemlenmiştir.

Mevcut çalışmada karbapenemlerin (Imipenem ve Meropenem) sonucu (sırasıyla % 2 ve % 0), Nader *et al*. 2017, tarafından yürütülen yerel bir çalışmanın sonucundan daha az olarak saptanmış olup, (%79,2) olarak saptanan imipenem direnci için sonuçlar, El-Shahed *et al*. 2020, tarafından imipenem direnci için elde edilen (%66,7) çalışmanın

sonuçlarından daha olarak saptanmıştır. Ek olarak bu sonuçlar, Juayang *et al*. 2017, tarafından yürütülen ve İmipenem ve meropenem direnci için sırasıyla (%16) ve (%17,1) oranını saptayan çalışmanın sonuçlarından daha az olarak gözlemlenmiştir.

Mevcut çalışmadaki florokinolonların (siprofloksasin) için saptanan (%0) sonuç, Al-Fridawy *et al*. 2020, tarafından elde edilen yakın tarihli bir yerel çalışmadan (%60) ve daha önce Nader *et al*. 2017, tarafından yürütülen başka bir yerel çalışmadan (%29) daha az olarak saptanmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, mevcut bulgu, siprofloksasine karşı yüksek duyarlılık sıklığını (%100), Jayaprakash and Ummer 2016, tarafından yürütülen bir çalışmanınkinden (%40,74) daha yüksek olarak saptamıştır.

Mevcut çalışmada, direnç ve duyarlılık yüzdesinde yüksek farklılıklar bulundu. Sonuçlar, diğer çalışmalardan farklı olsa da bazı yerel araştırmalarla uyumluydu, daha önce bahsedildiği gibi. Bu tür bir farklılığın, çevre koşulları bölge sağlık hizmetleri ve rastgele antibiyotik kullanımı nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.6'te ve Çizelge 4.7'de özetlenen mevcut çalışmanın bulguları, *P. aeruginosa* izolatlarının %8'inin üç veya daha fazla kullanılan antibiyotikte en az bir gruba dirençli olduğu ve çoklu ilaç direnci (ÇİD) olarak kabul edildiğini görülürken, %92'sinin birden fazla antibiyotiğe duyarlı olduğu belirtilmiştir.

Çizelge 4.6 Kullanılan antibiyotiklere karşı her bir izolatın duyarlılık ve dirençlilik durumu

İzolat Kodu	İzolat Türü	Dirençli ve duyarlı antibiyotikler
PA1	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA2	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA3	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA4	Yanık	CN hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA5	Yanık	MEM, IPM, CIP, CAZ, CPM, (D) // CN, AK (O)
PA6	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA7	Yanık	CPM hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA8	Yanık	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // CAZ, CPM, (O) //AK
PA9	Yanık	CN, MEM, IPM, AK, CIP, (D) // CAZ, CPM
PA10	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA11	Yanık	CIP, CPM, (D) // MEM, CAZ, (O) // CN, IPM, AK
PA12	Yanık	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı

Çizelge 4.6 Kullanılan antibiyotiklere karşı her bir izolatın duyarlılık ve dirençlilik durumu (Devam)

PA13	Yanık	AK (O) hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA14	Yanık	CAZ hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA15	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA16	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA17	Yanık	CN hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA18	Yanık	CN hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA19	Yanık	CN, MEM, IPM, AK, CIP, (D) // CPM, (O) //CAZ
PA20	Yanık	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // CPM, AK, (O) //CAZ
PA21	Yanık	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA22	Yanık	AK (O) hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA23	Yanık	CIP, CAZ, CPM, (D) // MEM, IPM, AK, (O) //CN
PA24	Yanık	CN (O) hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA25	Yanık	CN hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA26	Yanık	MEM, CIP, CPM, (D) // IPM, AK, CAZ, (O) //CN
PA27	Yanık	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA28	Yanık	MEM, IPM, CIP, CAZ, CPM, (D) // AK (O) // CN
PA29	Yara	Kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA30	Yara	CN (O) hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı)
PA31	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA32	Yara	IPM, CIP, CPM, (D) // MEM, (O) // CN, AK, CAZ
PA33	Yara	MEM, IPM, CIP, CAZ, CPM, (D) // CN, AK
PA34	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // AK, CAZ, CPM
PA35	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, CAZ, (D) // CPM (O) // AK
PA36	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, CPM, (D) // CAZ (O) // AK
PA37	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // AK (O) // CAZ, CPM
PA38	Yara	CN MEM, IPM, AK, CIP, (D) // CAZ, CPM
PA39	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA40	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // AK, CAZ, CPM
PA41	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA42	Yara	CN, MEM, IPM, AK, CIP, (D) / CAZ, CPM
PA43	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA44	Yara	CN, MEM, IPM, AK, CIP, (D) // CAZ, CPM
PA45	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA46	Yara	CN, MEM, IPM, CIP, (D) // AK (O) // CAZ, CPM
PA47	Yara	MEM, IPM, CIP, CAZ, CPM, (D) // CN, AK, (O)
PA48	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA49	Yara	AK hariç kullanılan 7 antibiyotiğe de duyarlı
PA50	Yara	MEM, IPM, CIP, CAZ, CPM, (D) // CN, AK

D= Duyarlı, O=Orta, ve diğerleri Dirençli

Çizelge 4.7 *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaca dirençli, orta düzeyde direnç ve duyarlılık yüzdesi

SINIFLANDIRMA	Sayı	%
Birden fazla antibiyotik grubuna duyarlı	46	% 92
Çoklu ilaç dirençli	4	% 8
Toplam	50	% 100

4.3 *P. Aeruginosa* İçin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)

Bu test, MTP kullanılarak 50 (%100) izolatın tamamı için gerçekleştirilmiştir. Amikasinin farklı seyreltilmiş konsantrasyonu (1-1024 µg/mL) kullanılmış ve (0,5) McFarland bakteriyel bulanıklığına göre bakteri süspansiyon standardı kullanılmıştır. Amikasin MİK değerlerinin (duyarlı, orta direnç) olarak yorumlanması, sırasıyla kılavuzlarına bağlı olarak sınır değerlere (≤ 16, 32, ≥ 64 µg/mL) göre yapılmıştır.

Bu çalışmanın bulguları, izolatların 18'inin (%36) DDT ile amikasine dirençli olduğunu ortaya koyarken, amikasinin MİK sonuçları toplam 50 adet izolattan 30'unun (%74) dirençli olduğunu, 13'ünün (%12) duyarlı olduğunu ve 7'sinin ise (%14) orta izolat olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9).

Çoklu ilaca dirençli Gram-negatif patojenler, sağlık hizmeti kaynaklı enfeksiyonların giderek artan bir nedeni olduğundan, bu izolatlar için güvenilir antimikrobiyal duyarlılık testlerinin mevcut olması zorunludur. Disk difüzyon yöntemi mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan tekniklerden biridir. Ancak, bu yöntemin bazı antimikrobiyal ajanlarla ilgili yüksek hata oranları, bu yöntemin broth mikrodilüsyon yöntemine kıyasla güvenilir olmadığını göstermektedir ve bu sonuncusu CLSI tarafından altın standart olarak kabul edilir (Rechenchoski *et al*. 2017).

Bu çalışmada, 15 *P. aeruginosa* izolatının hem disk duyarlılık testinde hem de amikasin için MİK sonucunda dirençli, 4 izolatın her iki testte orta ve 4 izolatın her iki testte de duyarlı olduğu belirlendi. Böylece uyumlu izolatların toplamı her iki testte de 23/50 olarak saptanır. Sonuçlardaki bu farklılık, deneyler sırasındaki koşullardan veya antibiyotik firmaları arasındaki farklılaşmadan kaynaklanabilir.

Mevcut çalışmanın sonuçları, *P. aeruginosa*'ya karşı amikasin MİK'inin El-Demerdash and Bakry 2020, tarafından sunulan (% 57) direnç, (% 10) orta ve (% 33) duyarlı olduğu bir çalışmanın sonuçlarından daha yüksek olduğunu gösterdi. Ek olarak, *P. aeruginosa*'ya karşı amikasin MİK'inin Pronoza *et al*. 2015, tarafından sunulan (%62) duyarlı ve (%38) orta dereceli olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.8 Amikasinin *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki MİK etkisi

İzolatların Kodu	**İzolatların Türü**	**MİK µg/ml**	**MİK Sonucu**		**İzolatların Kodu**	**İzolatların Türü**	**MİK µg/ml**	**MİK Sonucu**
PA1	Yanık	512	D		PA26	Yanık	32	O
PA2	Yanık	512	D		PA27	Yanık	128	D
PA3	Yanık	256	D		PA28	Yanık	8	Du
PA4	Yanık	256	D		PA29	Yara	128	D
PA5	Yanık	512	D		PA30	Yara	16	Du
PA6	Yanık	512	D		PA31	Yara	32	O
PA7	Yanık	512	D		PA32	Yara	64	D
PA8	Yanık	512	D		PA33	Yara	64	D
PA9	Yanık	128	D		PA34	Yara	128	D
PA10	Yanık	64	D		PA35	Yara	256	D
PA11	Yanık	32	O		PA36	Yara	128	D
PA12	Yanık	128	D		PA37	Yara	128	D
PA13	Yanık	32	O		PA38	Yara	8	Du
PA14	Yanık	16	Du		PA39	Yara	128	D
PA15	Yanık	128	D		PA40	Yara	64	D
PA16	Yanık	64	D		PA41	Yara	64	D
PA17	Yanık	128	D		PA42	Yara	128	D
PA18	Yanık	64	D		PA43	Yara	128	D
PA19	Yanık	128	D		PA44	Yara	128	D
PA20	Yanık	32	O		PA45	Yara	128	D
PA21	Yanık	32	O		PA46	Yara	128	D
PA22	Yanık	32	O		PA47	Yara	256	D
PA23	Yanık	128	D		PA48	Yara	16	Du
PA24	Yanık	128	D		PA49	Yara	256	D
PA25	Yanık	16	Du		PA50	Yara	128	D

Du= Duyarlı, O=Orta, D= Dirençli

Çizelge 4.9 Amikasin MİK ve örnek tipine göre *P. aeruginosa* izolat sayısı (n= 50)

MİK (µg/mL) **Numune**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**	**1024**	**D%**	**O%**	Du **%**
Yanık örnekleri	0	0	0	1	2	6	3	8	2	6	0	% 74	% 14	% 12
Yara örnekleri	0	0	0	1	2	1	4	11	3	0	0			
Toplam	0	0	0	2	4	7	7	19	5	6	0	50		
%	0	0	0	4	8	14	14	38	10	12	0	100		

D=Dirençli, O=Orta, Du= Duyarlı

INFORM küresel sürveyans programı amikasinin *P. aeruginosa'ya* karşı yüksek bir etkiye sahip olduğunu bulmuştur, burada Sader *et al*. 2017, Sutherland *et al*. 2016, tarafından sunulan bir çalışmada amikasine duyarlılık oranı sırasıyla (%97), (%95) olmuştur, amikasin MİK testi kullanarak

4.4 Biyofilm Oluşumunun Tespiti

P. aeruginosa'nın biyofilm üretme yeteneği, bu çalışmada, biyofilm biyokütlesinin saptanması için standart bir test olarak kabul edilen önceden sterilize edilmiş 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakaları kullanılarak değerlendirilmiştir (Azeredo *et al.* 2017). Bu yöntem, bakterilerin MTP yüzeylerine yapışmasıyla oluşan biyofilm miktarını belirlemek için bir mikroplaka okuyucu tarafından 630 nm'de absorpsiyon için sayısal bir değer verdiği biyofilm oluşumunu saptamak için kantitatif bir analizdir; (Azeredo *et al*. 2017, Schinner *et al*. 2020)(Ek 4).

Absorbans (soğurma) okumaları, incelenen izolatlar tarafından mikrotitre kuyucuğunun yüzeyinde oluşturulan biyofilm kalınlığının yoğunluğunu temsil ediyordu. CV (ODc) değerini hesaplamak için, aşağıdaki denklem uygulandı {(ODc değeri ayırma) = Negatif kontrollerin ortalama OD'si + 3 (Standard Sapması)}, burada ilk olarak negatif kontrol kuyucuklarının OD'si hesaplandı (0,0473) bundan sonra OD değeri eklendi (3* Standart Kontrol Sapması), CV (ODc) sonucu (0,490), 2ODc (0,0981) ve 4ODc (0,196) idi. Ve bir önceki bölümde (3.2.7) belirtilenlere göre Çizelge (4.7)'de bulgular üç kategoriye

(zayıf, orta ve güçlü) ayrılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.10'da ve Çizelge 4.11'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.10 *P. aeruginosa* için biyofilm oluşum testi sonuçları

İzolat Kodu	İzolat Türü	K1	K2	K3	Ortalama	SD	Biyofilm Sonuçları
PA1	Yanık	0,063	0,054	0,052	0,0563	0,0058	Zayıf
PA2	Yanık	0,067	0,066	0,063	0,0653	0,0020	Zayıf
PA3	Yanık	0,063	0,062	0,074	0,0663	0,0066	Zayıf
PA4	Yanık	0,102	0,095	0,109	0,102	0,007	Orta
PA5	Yanık	0,08	0,079	0,073	0,0773	0,0037	Zayıf
PA6	Yanık	0,081	0,067	0,069	0,0723	0,0075	Zayıf
PA7	Yanık	0,073	0,078	0,081	0,0773	0,0040	Zayıf
PA8	Yanık	0,058	0,056	0,06	0,058	0,002	Zayıf
PA9	Yanık	0,074	0,073	0,067	0,0713	0,0037	Zayıf
PA10	Yanık	0,079	0,081	0,083	0,081	0,002	Zayıf
PA11	Yanık	0,1	0,088	0,096	0,0946	0,0061	Zayıf
PA12	Yanık	0,054	0,055	0,055	0,0546	0,0005	Zayıf
PA13	Yanık	0,059	0,061	0,056	0,0586	0,0025	Zayıf
PA14	Yanık	0,101	0,103	0,098	0,1006	0,0025	Orta
PA15	Yanık	0,24	0,223	0,225	0,2293	0,0092	Güçlü
PA16	Yanık	0,053	0,054	0,052	0,053	0,001	Zayıf
PA17	Yanık	0,084	0,079	0,089	0,084	0,0070	Zayıf
PA18	Yanık	0,065	0,061	0,056	0,0605	0,0063	Zayıf
PA19	Yanık	0,158	0,147	0,135	0,1466	0,0115	Orta
PA20	Yanık	0,053	0,06	0,058	0,057	0,0036	Zayıf
PA21	Yanık	0,13	0,123	0,128	0,127	0,0036	Orta
PA22	Yanık	0,098	0,102	0,1	0,1	0,002	Orta
PA23	Yanık	0,088	0,079	0,068	0,0783	0,0100	Zayıf
PA24	Yanık	0,068	0,07	0,074	0,0706	0,0030	Zayıf
PA25	Yanık	0,071	0,072	0,071	0,0713	0,0005	Zayıf
PA26	Yanık	0,081	0,07	0,074	0,075	0,0055	Zayıf
PA27	Yanık	0,127	0,116	0,132	0,125	0,0081	Orta
PA28	Yanık	0,07	0,069	0,073	0,0706	0,0020	Zayıf
PA29	Yara	0,115	0,114	0,118	0,1156	0,0020	Orta
PA30	Yara	0,205	0,198	0,197	0,2	0,0043	Güçlü
PA31	Yara	0,086	0,085	0,088	0,0863	0,0015	Zayıf
PA32	Yara	0,128	0,134	0,138	0,1333	0,0050	Orta
PA33	Yara	0,093	0,09	0,091	0,0913	0,0015	Zayıf
PA34	Yara	0,069	0,065	0,073	0,069	0,004	Zayıf
PA35	Yara	0,073	0,063	0,07	0,0686	0,0051	Zayıf
PA36	Yara	0,08	0,09	0,072	0,0806	0,0090	Zayıf
PA37	Yara	0,083	0,089	0,075	0,0823	0,0070	Zayıf
PA38	Yara	0,057	0,06	0,068	0,0616	0,0056	Zayıf
PA39	Yara	0,055	0,059	0,059	0,0576	0,0023	Zayıf
PA40	Yara	0,059	0,061	0,06	0,06	0,001	Zayıf
PA41	Yara	0,073	0,069	0,078	0,0733	0,0045	Zayıf
PA42	Yara	0,22	0,216	0,215	0,217	0,0026	Güçlü
PA43	Yara	0,059	0,058	0,058	0,0583	0,0005	Zayıf
PA44	Yara	0,12	0,111	0,114	0,115	0,0045	Orta
PA45	Yara	0,083	0,079	0,081	0,081	0,002	Zayıf
PA46	Yara	0,078	0,069	0,063	0,07	0,0075	Zayıf
PA47	Yara	0,075	0,067	0,065	0,069	0,0052	Zayıf
PA48	Yara	0,093	0,071	0,082	0,082	0,011	Zayıf
PA49	Yara	0,072	0,067	0,068	0,069	0,0026	Zayıf
PA50	Yara	0,078	0,078	0,076	0,0773	0,0011	Zayıf
Kontrol		0,047	0,047	0,048	0,0473	0,0005	

K= kuyucuk, SD= Standart sapma, CV (OD_C) = 0.0490, 2CV = 0.0981, 4CV = 0.1962
Üretici olmayan = ≤ CV, Zayıf = CV&2CV arasında, orta= 2CV&4CV arasında, Güçlü = ≥ 4CV

Çizelge 4.11'de listelenen yukarıdaki sonuçlara göre, bu çalışma 50 izolattan 38'inin (%76), 9'unun (%18) ve 3'ünün (%6) sırasıyla zayıf, orta ve güçlü biyofilm oluşturduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.11 İzolat kaynağına göre *P. aeruginosa* biyofilm yoğunluğunun yüzdesi

NUMUMELER (İZOLAT SAYISI)	ZAYIF (%)	ORTA (%)	GÜÇLÜ (%)
Yanık örnekleri (28)	21 (% 42)	6 (% 12)	1 (% 2)
Yara örnekleri (22)	17 (% 34)	3 (% 6)	2 (% 4)
Toplam	38 (% 76)	9 (% 18)	3 (% 6)
OD_{630} sınırları	0,0490- 0,0981	0,0981- 0,196	≥ 0,196

İzolatlar arasındaki biyofilm kalınlığındaki farklılıklar, her bir izolatın bir biyofilm oluşturma yeteneği, yapışmayı başaran birincil hücre sayısındaki farklılıklar ve her izolat tarafından üretilen çekirdek algılama sinyal moleküllerinin (oto indükleyiciler) nitelik ve niceliklerindeki farklılıkları da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Örnekler arasında biyofilm yoğunluğunun dağılımını yöneten belirli bir model yoktur. Diğer bir deyişle, biyofilm yoğunluğu numuneye özgüdür. Belki de bu tür bulguların arkasındaki sebep, her suşun genetik yapısındaki çeşitliliktir. Biyofilm kalınlığına, gen düzenlemesindeki eşlik eder. *P. aeruginosa*'daki mikrokolonilerin oluşumu ve kalınlığı birçok faktöre bağlanmıştır. Bunlara tip IV pili, flagella, serbest DNA, aljinat, *Pel* ve *Psl* polisakkaritleridir. Faktörlerden biri eksik olsa bile biyofilm yine de iyi performans gösterebilir (Maita and Boonbumrung 2014, Thi *et al*. 2020).

Toplam 50 izolattan 37'si amikasine dirençli olmasına rağmen biyofilm oluşturabilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşumu ile amikasin MİK arasındaki korelasyon katsayısı zayıft (r = -0,1). Bu çalışmanın sonuçları Çizelge 4.12'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.12 *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm yoğunluğu ve Amikasin MİK sunuçları.

İzolat Kodu	İzolat Türü	MİK (µg/ml)	Biyofilm Sonuçları	İzolat Kodu	İzolat Türü	MİK (µg/ml)	Biyofilm Sonuçları
PA1	Yanık	512	Z	PA26	Yanık	32	Z
PA2	Yanık	512	Z	PA27	Yanık	128	O
PA3	Yanık	256	Z	PA28	Yanık	8	Z
PA4	Yanık	256	O	PA29	Yara	128	O
PA5	Yanık	512	Z	PA30	Yara	16	G
PA6	Yanık	512	Z	PA31	Yara	32	Z
PA7	Yanık	512	Z	PA32	Yara	64	O
PA8	Yanık	512	Z	PA33	Yara	64	Z
PA9	Yanık	128	Z	PA34	Yara	128	Z
PA10	Yanık	64	Z	PA35	Yara	256	Z
PA11	Yanık	32	Z	PA36	Yara	128	Z
PA12	Yanık	128	Z	PA37	Yara	128	Z
PA13	Yanık	32	Z	PA38	Yara	8	Z
PA14	Yanık	16	O	PA39	Yara	128	Z
PA15	Yanık	128	G	PA40	Yara	64	Z
PA16	Yanık	64	Z	PA41	Yara	64	Z
PA17	Yanık	128	Z	PA42	Yara	128	G
PA18	Yanık	64	Z	PA43	Yara	128	Z
PA19	Yanık	128	O	PA44	Yara	128	O
PA20	Yanık	32	Z	PA45	Yara	128	Z
PA21	Yanık	32	O	PA46	Yara	128	Z
PA22	Yanık	32	O	PA47	Yara	256	Z
PA23	Yanık	128	Z	PA48	Yara	16	Z
PA24	Yanık	128	Z	PA49	Yara	256	Z
PA25	Yanık	16	Z	PA50	Yara	128	Z

MİK= minimal inhibitör konsantrasyon, Biyofilm yoğunluğu (Z=Zayıf, O=Orta, G=Güçlü).

Maita and Boonbumrung 2014, amikasin, gentamisin, seftazidim, sefepim, imipenem, meropenem, sefoperazon/sulbaktam ve piperasilin/sulbaktam gibi antibiyotiklere dirençli izolatların biyofilm üretenler arasında üretmeyenlere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

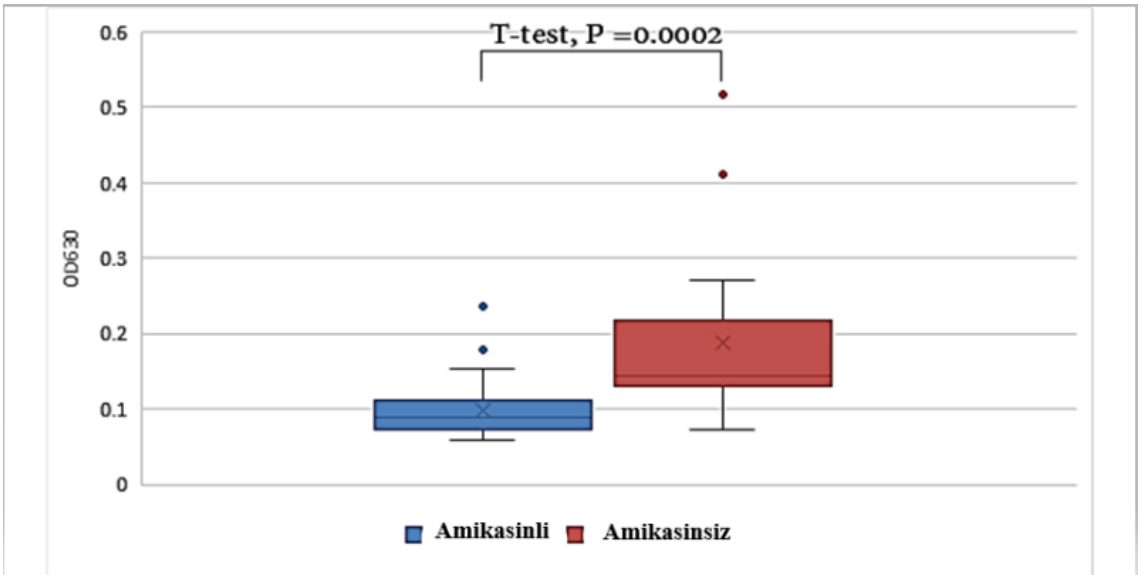
Antimikrobiyal maddelere direnç, biyofilm enfeksiyonlarının en önemli özelliğidir. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma yeteneği, antibiyotik tedavilerini verimsiz kılar ve bu nedenle kronik bulaşıcı hastalıklara neden olur. Bakteriyel biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlar kalıcıdır ve yok edilmesi çok zordur (Saha *et al.* 2018). Bu direncin yüksek derecesi ve biyofilm formundaki büyümenin yanı sıra çeşitli virülans faktörlerinin varlığı, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların yönetimindeki zorlukların nedenleridir. Böylece *P. aeruginosa*'nın bir biyofilm olarak büyüme yeteneği, *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere direnci ile açıklanmaktadır (Ratajczak *et al.* 2021).

Abdulhaq *et al.* 2020, yılında yaptığı çalışmasında *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunun tespiti için iki farklı yöntem kullanmış ve bu iki yöntemi karşılaştırmıştır. Kongo red agar (KRA) testinin (% 44,23), Mikrotiter plaka tahlili MPA'nın (% 94,23) izolatları biyofilm üreticisi olarak saptadığı gözlemlenmiştir. MPA'nın etkinliği, Pakistan'da Samad *et al.* 2017, tarafından da bildirilen CRA'dan daha olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar sıvı ortamda gerçekleştirilen biyofilm oluşumunun daha güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

4.5 Amikasinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Şekil 4.1'de gösterilen sonuçlar, amikasin ile tedavinin biyofilm azalmasına neden olduğunu gösterdi ($P<0,05$).

Olivares *et al.* 2017, amikasin ve tobramisinin *P. aeruginosa* izolatlarının erken yapışmasını önleyebildiğini göstermiştir. Antimikrobiyallerin bu engelleyici etkisi, biyofilm oluşumunun adaptif tepkiler tarafından yönetildiğini ve çevresel koşullara bağlı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Nouraldin *et al.* 2016, amikasinin güçlü *P. aeruginosa* biyofilm üreten izolatların %50'sinde ve orta düzeyde biyofilm üreten izolatların %66,7'sinde biyofilmi azalttığını belirtmiştir. Abidi *et al.* 2013, antibiyotik direnci ile biyofilm oluşumu arasındaki bağlantıyı araştırmış ve çoklu ilaca dirençli izolatlarda biyofilm üretiminin ilaca duyarlı izolatlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1 *P. aeruginosa* izolatları tarafından biyofilm oluşumunun kutu grafiği. Kutular 25. ile 75. persentil arasında değişir ve medyan çizgi ile kesişir. Noktalar ortalamayı gösterir. Kutu aralığının altında ve üstünde uzanan çizimler sırasıyla maksimum ve minium değerleri temsil eder. Aykırı değerler, bireysel veri noktaları olarak belirtilir.

Ayrıca Çizelge 4.13'da ve (Ekler 1,2,3'ta) altı izolat dışında (PA6, PA23, PA29, PA45, PA49, PA50) tüm izolatların biyofilm yoğunluğunun önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.13 Alt-MİK'te Amikasin stresi altında biyofilm yoğunluğu

İzolasyon Kodu	Amikasin stresi altında				Amikasinsiz			T-testi/ anl.	
	Alt-MIK µg/mL	Ortalama	SD	Biyofilm yoğunluğu	Ortalama	SD	Biyofilm yoğunluğu	T test	anl. (sig.)
PA12	64	0,0803	0,0032	Z	0,139	0,0134	O	0,0133	sig.
PA15	64	0,0976	0,0035	Z	0,198	0,0105	O	0,0016	sig.
PA19	64	0,1153	0,0005	Z	0,136	0,0011	O	0,0001	sig.
PA23	64	0,124	0,004	O	0,136	0,0026	O	0,0167	sig.
PA27	64	0,0973	0,0020	Z	0,518	0,0055	G	7E-06	sig.
PA29	64	0,1536	0,0011	O	0,121	0,0075	O	0,0156	sig.
PA34	64	0,0893	0,0005	Z	0,204	0,0216	O	0,0116	sig.
PA36	64	0,0896	0,0035	Z	0,221	0,0015	O	2E-05	sig.
PA39	64	0,0903	0,0035	Z	0,144	0,0030	O	4E-05	sig.
PA42	64	0,0763	0,0028	Z	0,214	0,0462	O	0,0352	sig.
PA43	64	0,1083	0,0035	Z	0,212	0,0065	O	0,0001	sig.
PA44	64	0,0703	0,0015	Z	0,133	0,001	O	3E-06	sig.
PA45	64	0,1786	0,0072	O	0,145	0,0120	O	0,0226	sig.
PA50	64	0,236	0,006	O	0,2303	0,0037	O	0,4692	Insig.
PA3	128	0,097	0,001	Z	0,177	0,0176	O	0,0056	sig
PA4	128	0,06566	0,0015	Ü	0,2113	0,005	O	0,0002	sig
PA35	128	0,077	0,0055	Z	0,27	0,0270	O	0,0107	sig
PA47	128	0,09433	0,0115	Z	0,135	0,0379	O	0,0100	sig
PA49	128	0,07666	0,0011	Z	0,2303	0,0069	Z	0,0038	sig
PA1	256	0,0586	0,0047	Ü	0,0716	0,0025	Z	0,0237	sig
PA2	256	0,065	0,003	Ü	0,0906	0,0020	Z	0,0004	sig
PA5	256	0,0863	0,0025	Z	0,4113	0,0115	G	0,0002	sig
PA6	256	0,116	0,011	Z	0,112	0,0137	Z	0,7149	Insig.
PA7	256	0,066	0,0088	Ü	0,0946	0,0045	Z	0,0159	sig
PA8	256	0,0666	0,0055	Ü	0,1276	0,0045	Z	0,0001	sig
Kont. 1	-	0,05733	0,0005	-	-	-	-	-	-
Kont. 2	-	0,0596	0,0030	-	-	-	-	-	-

MİK= minimal inhibitör konsantrasyon, Ü= Üretici olmayan, Z=Zayıf, O=Orta, G=Güçlü. 1= 64 konsantrasyon için kontrol, Kontrol 2= 128 & 256 konsantrasyon için kontrol. anl. (sig.) = anlamlı (significant), (Insig.) = anlamlı değil (Insignificant)

Test edilen izolatların %92'si, amikasinli ve amikasinsiz biyofilm oluşumu arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Bu sonuçlar Wojnicz and Tichaczek-Goska 2013, tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmuştu.

Hattie Al-Draghi and Al-Kareem Saeed 2020, alt-MİK'teki amikasinin biyofilm oluşumunu azaltı, ancak bu çalışma ile karşılaştırıldığında sonuçlarda farklılıklar oldu. Bu tür bir varyasyon, çalışılan izolatların türleri ve bunların kaynağının yanı sıra izolatların genetik yapısı veya alt-MİK deneyine eşlik eden laboratuvar koşulları nedeniyle normal kabul edilebilir.

Son olarak, bir çalışma antibiyotiklerin antibiyotik sınıfına ve bakteri suşuna bağlı olarak biyofilm oluşumunu önemli ölçüde indükleyebileceğini veya antibiyotiklerin biyofilm oluşumunu azalttığını göstermiştir (Hattie Al-Draghi and Al-Kareem Saeed 2020).

4.6 *AlgD* Geninin Tespiti

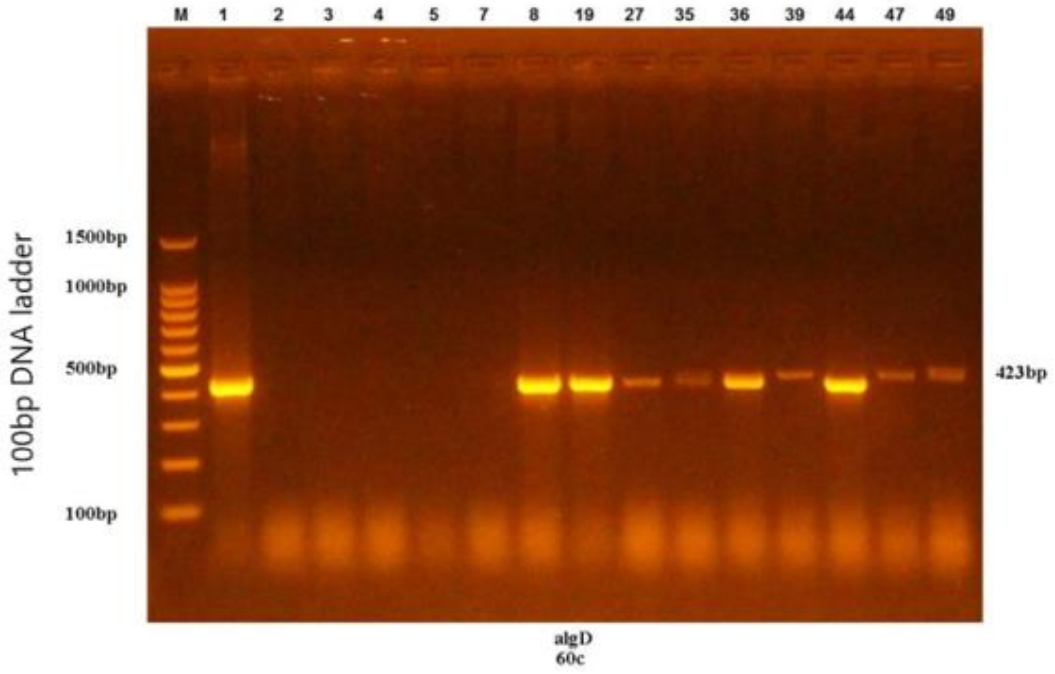
En düşük $P_{0,05}$ değeri ile birlikte en yüksek MİK seviyeleri (128, 256 ve 512) arasından toplam 15 adet izolat seçildi. *AlgD* geninin moleküler tespiti ile ilgili olarak (Şekil 4.2) (Çizelge 4.14), 15 *P. aeruginosa* izolatından 10'unda *algD* tespit edildiğini ortaya koydu.

Dhaife and Al-Attar 2021, izolatların (güçlü ve orta biyofilm üreticileri) % 12'sinde *algD* bulmuşken, Badamchi *et al*. 2017, izolatların %60'ının *algD* geni taşıdığını bildirmiştir. Diğer yandan, Elmaraghy *et al*. 2019, İzolatlarının %89,4'ü *algD* genine sahip olduğunu belirtmiştir. Nitz *et al*. 2021, izolatların %75,7'sinin *algD* geni taşıdığını ortaya koymuştur. Bu genin prevalansındaki bu tür farklılıklar, izolatların kaynağı ve popülasyonundaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir.

Çizelge 4.14 RNA konsantrasyonu (ng/µL)

	Örnek	**K1**	**K2**	**H2**	**H1**	**H (H_2O)**
İşlenen	1	48	10	20	4	16
	8	189	10	20	1	19
	19	198	10	20	1	19
	27	101	10	20	2	18
	35	224	10	20	1	19
	36	274	10	20	1	19
	39	56	10	20	4	16
	44	80	10	20	3	17
	47	42	10	20	5	15
	49	153	10	20	1	19
Kontrol	1	0	10	20	1111	-1091
	8	0	10	20	2000	-1980
	19	0	10	20	9524	-9504
	27	0	10	20	15385	-15365
	35	202	10	20	1	19
	36	104	10	20	2	18
	39	180	10	20	1	19
	44	109	10	20	2	18
	47	126	10	20	2	18
	49	164	10	20	1	19

K= konsantrasyon, H= Hacim



Şekil 4.2 *P. aeruginosa* örneklerinin *algD* genlerinin amplifikasyon sonuçları.

4.7 *AlgD* İfadesi

4.7.1 Rölatif ölçme

İşlenmiş ve işlenmemiş izolatlar, *algD*'nin gen ekspresyonu üzerinde alt-MİK'idne Amikasinin etkisini test etmek için qRT-PCR kullanılarak genetik olarak test edildi. Etkileşimden elde edilen değerlerin titrasyonu, referans gen olarak PA5110 gen değerinin kullanılmasına dayanmaktadır. Gen ekspresyonu, Livak and Schmittgen 2001, bağlı olarak analiz edildi ve kat değişiminin hesaplanmasıyla izolatlar, izolatlar arasında gen ekspresyonunda bir varyasyon gösterdi. Sonuçlar, *algD*'de bir upregülasyon sergileyen 6 izolatın (PA8, PA35, PA47, PA49, PA39, PA44) olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, diğer dört izolat (PA1, PA19, PA27, PA36) *algD* ifadesinde bir aşağı regülasyon gösterdi. Ayrıca, Oranları değişimi yüzdesi 1'den büyükse *algD* ifadesinde upregülasyon gösterdi, 1'den küçükse *algD* ifadesinde bir aşağı regülasyon gösterdi (Şekil 4.3) (Çizelge 4.15).

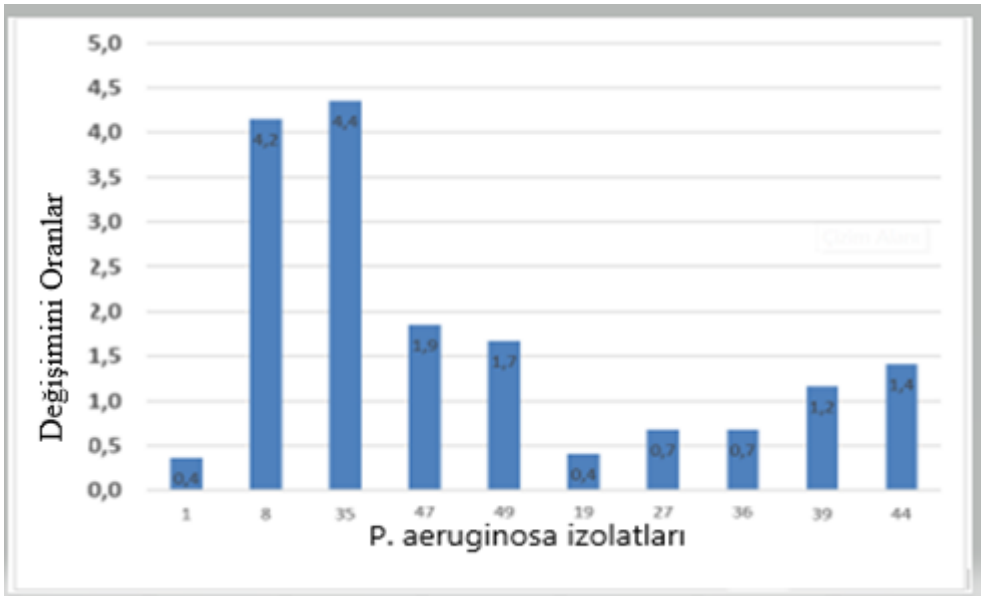
Amikasinin biyofilm üzerindeki etkisinin (Çizelge 4.13) bulgularını hatırladığımızda, bazı izolatlarda upregülasyon; Amikasin mevcudiyetine bağlı olarak biyofilmin önemli ölçüde inhibisyonu ile eşzamanlı olarak eşlik eden, *algD*'nin bu izolatlarda biyofilm oluşumunda ve *psl* ve *pel* gibi diğer biyofilm oluşturan genlerin katılımında önemli bir rol oynamadığını düşünülebilir. Aksine, amikasin ile tedavi edilen biyofilmlerde önemli azalma ile örtüşen bu gen ekspresyonundaki aşağı regülasyon, bu genin bu izolatlarla ilgili olarak biyofilm oluşumundaki önemli rolünü gösterebilir. Hattie Al-Draghi and Al-Kareem Saeed 2020, amikasin sinerjistik etki olarak siprofloksasin ile kullanıldığında, çalışmanın tüm izolatlarında *algD* geninin ekspresyonunun fark edilmediğini bildirmiştir. Siprofloksasinin belki de diğer yardımcı direnç mekanizmaları üzerinde bir etkisi olabilir.

AlgD'nin ifadesini etkileyen birçok faktör vardır, enfeksiyon sırasında *algD* geninin ekspresyonunda ilerleyici bir artış olduğunu göstermiştir. *AlgD* geninin ekspresyonu, enfeksiyonun ilk gününde düşüktür, ancak dördüncü günde önemli ölçüde artar ve enfeksiyonun dördüncü ve yedinci günü arasında *algD* geninin ekspresyonu stabilize

olur. *AlgD* geninin ekspresyonundaki kademeli artış, mukoid suşlarının ortaya çıktığının göstergesidir (Pierre *et al*. 2008).

Çizelge 4.15 *P. aeruginosa*'da *algD* geninin gen ifadesi ve oran değişimi

Kons. AK µg/mL	**İzolat Kodu**	**PA5110 (H.K)**	***algD***	**DC_t**	**DDC_t**	**Oran**
256	PA1	21,6	23,1	1,46	1,48	0,4
	PA8	20,1	20,8	0,66	-2,05	4,2
128	PA35	29,3	29,3	-0,05	-2,12	4,4
	PA47	27,4	27,4	-0,06	-0,89	1,9
	PA49	21,7	22,7	1,02	-0,74	1,7
64	PA19	25,2	25,9	0,72	1,27	0,4
	PA27	29,4	29,3	-0,11	0,57	0,7
	PA36	23,9	24,3	0,38	0,57	0,7
	PA39	28,2	28,4	0,13	-0,23	1,2
	PA44	26,3	26,3	0,09	-0,49	1,4
İşlenmeyen	PA1 Kont.	19,7	19,7	-0,01	0,00	1
	PA8 Kont.	22,2	24,9	2,71	0,00	1
	PA35 Kont.	23,5	25,5	2,07	0,00	1
	PA47 Kont.	24,2	25,1	0,83	0,00	1
	PA49 Kont.	24,5	26,2	1,76	0,00	1
	PA19 Kont.	20,5	19,9	-0,55	0,00	1
	PA27 Kont.	21,4	20,8	-0,67	0,00	1
	PA36 Kont.	28,6	28,4	-0,19	0,00	1
	PA39 Kont.	25,9	26,2	0,35	0,00	1
	PA44 Kont.	20,2	20,8	0,58	0,00	1



Şekil 4.3 Alt-MİK'de amikasin stresi altında *P. aeruginosa* izolatlarında *algD* geni için değişimini oranları.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Sunulan çalışma sonucunda aşağıdaki hususlar gözlemlenmiştir

1. Yanık örneklerinde yüksek *P. aeruginosa* prevalansı yerleştirildi ve yara örneklerinde düşük *P. aeruginosa* prevalansı yerleştirildi.
2. En yüksek frekans direnci amikasine karşı, daha az direnç ise imipenem'e karşıydı. Tüm izolatlar Siprofloksasin ve Meropenem'e duyarlıydı.
3. Bu çalışmadaki tüm *P. aeruginosa* izolatları biyofilm oluşturmuştur. Bununla birlikte, Amikasin ile işlem, izolatların %92'sinde biyofilmi azaltmıştır ($P<0,05$); altı izolat dışında tüm izolatlarda biyofilm yoğunluğu önemli ölçüde azalmıştır ($P<0,05$), biyofilm yoğunluğunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (PA6, PA23, PA29, PA45, PA49, PA50).
4. Konvansiyonel PCR çalışması, 15 adet *P. aeruginosa* izolatından 10'unun *algD* taşıdığını ortaya koymuştur.
5. Gerçek zamanlı PCR çalışması, 6 izolatın *algD*'de bir upregülasyon sergilediğini göstermiştir; bununla birlikte, diğer dört izolat bir aşağı doğru bir regülasyon göstermiştir.

5.2 Öneriler

Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda yapılan öneriler aşağıdaki gibidir:

1. Genel olarak antibiyotiklerin ve özel olarak amikasinin biyofilm oluşumuyla ilgili olarak çekirdek algılayıcı genler üzerindeki etkisini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.
2. Diğer virülans belirleyicilerinin gen ekspresyonunda Amikasinin rolünün test edilmesi.

3. Amikasinin, *pel* ve *psl* gibi polisakkaritleri kodlayan diğer genler üzerindeki etkisinin incelenmesi.
4. Amikasinin diğer aljinat biyosentez genleri, özellikle düzenleyici genler üzerindeki etkisinin araştırılması.
5. Çevresel faktörlerin *algD*'nin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi.

KAYNAKLAR

Abdulhaq, N., Nawaz, Z., Zahoor, M. A., and Siddique, A. B. 2020. Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. EXCLI journal., 19: 201-208 – ISSN 1611-2156.

Abebe, G. M. 2020. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. International journal of microbiology., 2: 17-20.

Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., and Kazmi, S. U. 2013. Drug resistance profile and biofilm forming potential of Pseudomonas aeruginosa isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. BMC ophthalmology., 13(1): 1-6.

Aboushleib, H. M., Omar, H. M., Abozahra, R., Elsheredy, A., and Baraka, K. 2015. Correlation of quorum sensing and virulence factors in Pseudomonas aeruginosa isolates in Egypt. The Journal of Infection in Developing Countries, 9(10): 1091-1099.

Al-Draghi, W. A. H., and Saeed, R. A. A. 2020. Synergistic Effect of Amikacin and Ciprofloxacin on pelA and algD Genes in Pseudomonas aeruginosa. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology., 1: 44.

Aldred, K. J., Kerns, R. J., and Osheroff, N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry., 53(10): 1565-1574.

Al-Fridawy, R. A. K., Al-Daraghi, W. A. H., and Alkhafaji, M. H. 2020. Isolation and Identification of Multidrug Resistance Among Clinical and Environmental Pseudomonas aeruginosa Isolates. Iraqi journal of biotechnology., 1: 92.

Alhazmi, A. 2015. Pseudomonas aeruginosa-pathogenesis and pathogenic mechanisms. International Journal of Biology., 7(2): 44.

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. Molecular microbiology., 59(4): 1114-1128.

Alshalchi, S. A., and Anderson, G. G. 2014. Involvement of stress-related genes polB and PA14_46880 in biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity., 82(11): 4746-4757.

Andrews, J. M. 2002. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy., 49(6): 1049-1049.

Arber, W. 2014. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. Life., 4(2): 217-224.

Atlas, R. M., and Snyder, J. W. 2006. Handbook of media for clinical microbiology. CRC Press., 3: 10-13.

Atshan, S. S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L. T. T., Hamat, R. A., Karunanidhi, A., Ali, A. M., Ghaznavi-Rad, E., Moghaddam, H. G., Seng, J. S. C., Nathan, J. J., and Pei Pei, C. 2012. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. Journal of BioMedicine and biotechnology., 12: 6-13.

Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Bonaventura, G. D., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., and Sternberg, C. 2017. Critical review on biofilm methods. Critical reviews in microbiology., 43(3): 313-351.

Badamchi, A., Masoumi, H., Javadinia, S., Asgarian, R., and Tabatabaee, A. 2017. Molecular detection of six virulence genes in Pseudomonas aeruginosa isolates detected in children with urinary tract infection. Microbial pathogenesis, 107: 44-47.

Baker, F. J., and Silverton, R. E. 2014. Introduction to medical laboratory technology. Butterworth-Heinemann., 5: 12-17.

Barthe, C., Nandakumar, S., Derlich, L., Macey, J., Bui, S., Fayon, M., Crouzet, M., Garbay, B., Vilain, S., and Costaglioli, P. 2015. Exploring the expression of Pseudomonas aeruginosa genes directly from sputa of cystic fibrosis patients. Letters in Applied Microbiology., 61(5): 423-428.

Béatrice, J., Maud, P., Stéphane, A., François, C., Frédéric, G., Benoit, G., and Husson, M. O., 2005. Relative expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. FEMS microbiology letters., 243(1): 271-278.

Benson, H. J. 2001. Microbiological application (A laboratory manual in general microbiology) 8th edition., 1: 4-8.

Berry, A., DeVault, J. D., and Chakrabarty, A. M. 1989. High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid Pseudomonas aeruginosa strains. Journal of bacteriology., 171(5): 2312-2317.

Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jensen, P. O., Madsen, K. G., Phipps, R., Krogfelt, K., Hoiby, N., and Givskov, M. 2008. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. Wound repair and regeneration., 16(1): 2-10.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature reviews microbiology., 13(1): 42-51.

Boles, B. R., Thoendel, M., and Singh, P. K. 2005. Rhamnolipids mediate detachment of Pseudomonas aeruginosa from biofilms. Molecular microbiology., 57(5): 1210-1223.

Boucher, J. C., Schurr, M. J., and Deretic, V. 2000. Dual regulation of mucoidy in Pseudomonas aeruginosa and sigma factor antagonism. Molecular microbiology., 36(2), 341-351.

Boyd, A., and Chakrabarty, A. M. 1995. Pseudomonas aeruginosa biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. Journal of industrial microbiology and biotechnology., 15(3): 162-168.

Breidenstein, E. B. M., Fuente-Núñez, C. D. L., and Hancock, R. E. W. 2011. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends in microbiology., 19(8): 419-426.

Chitnis, C. E., and Ohman, D. E. 1990. Cloning of Pseudomonas aeruginosa algG, which controls alginate structure. Journal of bacteriology., 172(6): 2894-2900.

Chitnis, C. E., and Ohman, D. E. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of Pseudomonas aeruginosa shows evidence of an operonic structure. Molecular microbiology., 8(3): 583-590.

Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Howell, P. L., Wozniak, D. J., and Parsek, M. R. 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. Environmental microbiology., 14(8): 1913-1928.

Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'connor, J., Lalor, P., Dockery, P., and Cormican, M. 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate Salmonella

enterica biofilms from food contact surface materials. Applied and environmental microbiology., 80(4): 1507-1514.

Damron, F. H., and Goldberg, J. B. 2012. Proteolytic regulation of alginate overproduction in Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology., 84(4): 595-607.

De Kievit, T. R. 2009. Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Environmental microbiology., 11(2): 279-288.

Deep, A., Chaudhary, U., and Gupta, V. 2011. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. Journal of laboratory physicians., 3(01): 004-011.

Del Pozo, J. L., and Patel, R. 2009. Infection associated with prosthetic joints. New England Journal of Medicine., 361(8): 787-794.

Delic-Attree, I., Toussaint, B., Froger, A., Willison, J. C., and Vignais, P. M. 1996. Isolation of an IHF-deficient mutant of a Pseudomonas aeruginosa mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. Microbiology., 142(10): 2785-2793.

Deretic, V., Gill, J. F., and Chakrabarty, A. M. 1987. Gene algD coding for GDPmannose dehydrogenase is transcriptionally activated in mucoid Pseudomonas aeruginosa. Journal of bacteriology., 169(1): 351-358.

Deretic, V., Gill, J. F., and Chakrabarty, A. M. 1987. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the algD gene. Nucleic acids research., 15(11): 4567-4581.

Deretic, V., Schurr, M. J., Boucher, J. C., and Martin, D. W. 1994. Conversion of Pseudomonas aeruginosa to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. Journal of bacteriology., 176(10): 2773-2780.

DeVault, J. D., Kimbara, K., and Chakrabarty, A. M. 1990. Pulmonary dehydration and infection in cystic fibrosis: evidence that ethanol activates alginate gene expression and induction of mucoidy in Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology., 4(5): 737-745.

Dhaife, S. S., and Al-Attar, N. S. 2021. Evaluation The Effect of Prodigiosın on Biofilm Formation in Clinical isolates of Pseudomonas Aerugınosa. Plant Archives., 21(1): 826-834.

Donlan, R. M., and Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews., 15(2): 167-193.

Dunne Jr, W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. Clinical microbiology reviews., 15(2): 155-166.

El-Demerdash, A. S., and Bakry, N. R. 2020. Evaluation of the Synergistic Effect of Amikacin with Cefotaxime against Pseudomonas aeruginosa and Its Biofilm Genes Expression. In Gene Expression and Phenotypic Traits. IntechOpen., 7: 23-27.

Elmaraghy, N., Abbadi, S., Elhadidi, G., Hashem, A., and Yousef, A. 2019. Virulence genes in Pseudomonas aeruginosa strains isolated at Suez Canal University Hospitals with respect to the site of infection and antimicrobial resistance. Int. J. Clin. Microbiol. Biochem. Technol., 2: 8-19.

El-Shahed, M. M. S., Mahmoud, D. E., Soliman, N. S., ElMahdy, Y. A., and Mohamed, S. H. 2020. Characterization of biofilm formation, pyocyanin production, and antibiotic resistance mechanisms in drug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from children in Egypt. Journal of Applied Pharmaceutical Science., 10(11): 074-080.

Fadhil, L., Almarzoqi, A. H., Al Taee, Z. M., and Shalan, A. 2016. Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain of Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins., 4: 5-8.

Fang, Z. L., Zhang, L. Y., Huang, Y. M., Qing, Y., Cao, K. Y., Tian, G. B., and Huang, X. 2014. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from China. Infection, Genetics and Evolution., 21: 124-128.

Fernández, L., and Hancock, R. E. W. 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clinical microbiology reviews., 25(4): 661-681.

Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., and Howell, P. L. 2011. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. Frontiers in microbiology., 2: 167.

Fuqua, C. 2006. The QscR quorum-sensing regulon of Pseudomonas aeruginosa: an orphan claims its identity. Journal of bacteriology., 188(9): 3169-3171.

Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. Trends in microbiology., 13(1): 34-40.

Gacesa, P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis–recent progress and future prospects. Microbiology., 144(5): 1133-1143.

Gellatly, S. L., and Hancock, R. E. W. 2013. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease., 67(3): 159-173.

Ghafoor, A., Hay, I. D., and Rehm, B. H. A. 2011. Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture. Applied and environmental microbiology., 77(15): 5238-5246.

Govan, J. R. W., and Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiological reviews., 60(3): 539-574.

Greenwood, D., Slack, R., Barer, M., and Irving, W. 2012. Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. With STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences., 1: 3-9.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews microbiology., 2(2): 95-108.

Harley, J. 2016. Laboratory Exercises in Microbiology 10th Edition Copyright: 2017 Contents., 9: 44-47.

Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., and Tolker-Nielsen, T. 2010. An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal. FEMS Immunology & Medical Microbiology., 59(3): 253-268.

Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., and Rehm, B. H. 2014. Genetics and regulation of bacterial alginate production. Environmental microbiology., 16(10): 2997-3011.

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

Hirsch, E. B., and Tam, V. H. 2010. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research., 10(4): 441-451.

Hogardt, M., and Heesemann, J. 2010. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa during persistence in the cystic fibrosis lung. International Journal of Medical Microbiology., 300(8): 557-562.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International journal of antimicrobial agents., 35(4): 322-332.

Høiby, N., Johansen, H. K., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., and Kharazmi, A. 2001. Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. Microbes and infection., 3(1): 23-35.

Jain, S., and Ohman, D. E. 2005. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity., 73(10): 6429-6436.

Jayaprakash, C., and Ummer, N. 2016. Isolates of Pseudomonas aeruginosa from clinical specimens and their susceptibility pattern to Amikacin, Ceftazidime, and Ciprofloxacin. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research., 5(3): 179-186.

Juayang, A. C., Lim, J. P. T., Bonifacio, A. F. V., Lambot, A. V. L., Millan, S. M., Sevilla, V. Z. J. N., Sy, J. K. T., Villanueva, P. J., Grajales, C. P., and Gallega, C. T. 2017. Five-year antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from a local tertiary hospital in Bacolod City, Philippines. Tropical medicine and infectious disease., 2(3): 28.

Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., and Ramphal, R. 2007. Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by Pseudomonas aeruginosa in human mucus. Molecular microbiology., 63(4): 1026-1038.

Kato, J., Misra, T. K., and Chakrabarty, A. M. 1990. AlgR3, a protein resembling eukaryotic histone H1, regulates alginate synthesis in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences., 87(8): 2887-2891.

Khosravi, A. D., Motahar, M., and Montazeri, E. A. 2017. The frequency of class1 and 2 integrons in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. PloS one., 12(8): e0183061.

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

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. 2003. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular microbiology., 48(6): 1511-1524.

Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., and Tümmler, B. 2011. Pseudomonas aeruginosa genomic structure and diversity. Frontiers in microbiology., 2: 150.

Konyecsni, W. M., and Deretic, V. 1990. DNA sequence and expression analysis of algP and algQ, components of the multigene system transcriptionally regulating mucoidy in Pseudomonas aeruginosa: algP contains multiple direct repeats. Journal of bacteriology., 172(5): 2511-2520.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S. J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor perspectives in medicine., 3(4): a010306.

Lahij, H. F., Alkhater, A. H., Hassan, M. H., and Yassir, L. A. 2021. The Effect of Qourum Sensing genes (lasI, rhlI) in Some Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Different Clinical Sources. Medico-legal Update., 21(1): 303.

Lang, A. B., Horn, M. P., Imboden, M. A., and Zuercher, A. W. 2004. Prophylaxis and therapy of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. Vaccine., 22: S44-S48.

Leech, A. J., Sprinkle, A., Wood, L., Wozniak, D. J., and Ohman, D. E. 2008. The NtrC family regulator AlgB, which controls alginate biosynthesis in mucoid Pseudomonas aeruginosa, binds directly to the algD promoter. Journal of bacteriology., 190(2): 581-589.

Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., and Zhang, L. 2015. Mechanisms of antibiotic resistance. Frontiers in microbiology., 6: 34.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods., 25(4): 402-408.

López, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor perspectives in biology., 2(7): a000398.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clinical microbiology reviews., 15(2): 194-222.

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., and Wozniak, D. J. 2009. Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. PLoS pathogens., 5(3): e1000354.

Ma, S. 2014. Controlling Pseudomonas aeruginosa biofilms and persister cells by manipulating cell-cell signaling (Doctoral dissertation, Syracuse University).

Madigan, M. T., and Martinko, J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall., 11: 136.

Maita, P. and Boonbumrung, K. 2014. Association between biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates versus antibiotic resistance and genes involved with biofilm. J. Chem. Pharm. Res., 6: 1022–1028.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Merrick, M., Hill, S., Hennecke, H., and Sundaresan, V. 1982. Magasanik, B. and Rothstein, DM (1980) in Mora, J. and Palacios, R.(eds.), Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation. Academic Press, NY, pp. 61-68. Magasanik, B. (1982) Annu. Rev. Genet., 16, 135-168. Mol. Gen. Genet., 185: 75-81.

Mann, E. E., and Wozniak, D. J. 2012. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. FEMS microbiology reviews., 36(4): 893-916.

May, T. B., and Chakrabarty, A. M. 1994. Pseudomonas aeruginosa: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends in microbiology., 2(5): 151-157.

Meletis, G., and Bagkeri, M. 2013. Pseudomonas aeruginosa: Multi-drug-resistance development and treatment options. Infection Control., 2: 34-45.

Muhammadi and Ahmed, N. 2007. Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. Current genomics., 8(3): 191-202.

Mohammad, H. H. 2013. Phenotypic Investigation for Virulence factors of Pyocine producing Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burn Wounds, Iraq. International Journal of Scientific & Engineering Research., 4(7) 2114-21.

Monday, S. R., and Schiller, N. L. 1996. Alginate synthesis in Pseudomonas aeruginosa: the role of AlgL (alginate lyase) and AlgX. Journal of bacteriology., 178(3): 625-632.

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.

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., and Lewenza, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. PLoS pathogens., 4(11): e1000213.

Nader, M. I., Kareem, A. A., Rasheed, M. N., and Issa, M. A. S. 2017. Biofilm Formation and Detection of pslÁ Gene in Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolated from Thi-Qar, Iraq. Iraqi journal of biotechnology., 1: 64.

Nitz, F., de Melo, B. O., da Silva, L. C. N., Monteiro, A. D. S., Marques, S. G., Monteiro-Neto, V., Turri, R. D. J. G., Junior, A. D. S., Conceicao, P. C. R., Magalhaes, H. J. C., Zagmignan, A., Ferro, T. A. F., and Bomfim, M. R. Q. 2021. Molecular detection of drug-resistance genes of blaOXA-23-blaOXA-51 and mcr-1 in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Microorganisms., 9(4): 786.

Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J., and Franklin, M. J. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms. Journal of bacteriology., 183(3): 1047-1057.

Nouraldin, A. A. M., Baddour, M. M., Harfoush, R. A. H., and Essa, S. A. M. 2016. Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Alexandria Journal of Medicine., 52(2): 99-105.

Ohman, D. E. 2009. Alginate gene regulation. In Alginates: Biology and Applications, pp. 117-133, Springer, Berlin, Heidelberg.

Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., and Jehl, F. 2017. Tobramycin and amikacin delay adhesion and microcolony formation in Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates. Frontiers in Microbiology., 8: 1289.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology., 54(1): 49-79.

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(1): 177-192.

Patel, F. M., Goswami, P. N., and Khara, R. 2016. Detection of Biofilm formation in device associated clinical bacterial isolates in cancer patients. Sri Lankan Journal of Infectious Diseases., 5: 61.

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(3): 1895-1901.

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

Pronoza, M., Sciuca, S., Ceban, A., and Balanetchi, L. 2015. 103 Minimum inhibition concentration characteristic of antibiotics on Pseudomonas aeruginosa strains from patients with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis., 14: S83.

Rada, B., and Leto, T. L. 2013. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. Trends in microbiology., 21(2): 73-81.

Ramsey, D. M., and Wozniak, D. J. 2005. Understanding the control of Pseudomonas aeruginosa alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Molecular microbiology., 56(2): 309-322.

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. 2015. The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed research international., 2(5): 23-29.

Ratajczak, M., Kamińska, D., Nowak-Malczewska, D. M., Schneider, A., and Dlugaszewska, J. 2021. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, genes coding virulence factors and source of origin of Pseudomonas aeruginosa clinical strains. Annals of Agricultural and Environmental Medicine., 28(2): 306-313.

Rechenchoski, D. Z., Dambrozio, A. M. L., Vivan, A. C. P., Schuroff, P. A., Burgos, T. D. N., Pelisson, M., Perugini, M. R. E., and Vespero, E. C. 2017. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Enterobacter spp. Isolates. Brazilian journal of microbiology., 48: 509-514.

Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Leblebicioglu, H., Mehta, Y., Rai, V., Hung, N. V., Kanj, S. S., Salama, M. F., Salgado-Yepez, E., Elahi, N., Otero, R. M., Apisarnthanarak, A., Carvalho, B. M., Ider, B. E., Fisher, D., Buenaflor, M. C. S. G., Petrov, M. M., Quesada-Mora, A. M., Zand, F., Gurskis, V., Anguseva, T., Ikram, A., Moros, D. A., Duszynska, W., Mejia, N., Horhat, F. G., Belskiy, V., Mioljevic, V., Silvestre, G. D., Furova, K., Ramos-Ortiz, G. Y., Elanbya, M, O. G., Satari, H. I., Gupta, U., Dendane, T., Raka, L., Guanche-Garcell, H., Hu, B., Padgett, D., Jayatilleke, K., Jaballah, N. B., Apostolopoulou, E., Leon, W. E. P., Sepulveda-Chavez, A., Telechea, H. M., Trotter, A., Alvarez-Moreno, C., and Kushner-Davalos, L. 2016. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. American journal of infection control., 44(12): 1495-1504.

Rosner, B. 2015. Fundamentals of biostatistics. Cengage learning., 6: 12-17.

Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Ninfa, A. J., Allen, N. E., Jungheim, L. N., Nicas, T. I., and Chakrabarty, A. M. 1993. Inhibitors of two-component signal transduction systems: inhibition of alginate gene activation in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences., 90(3): 965-969.

Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D. J. 2007. Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Current opinion in microbiology., 10(6): 644-648.

Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., and Flamm, R. K. 2017. Pseudomonas aeruginosa antimicrobial susceptibility results from four years (2012 to 2015) of the international network for optimal resistance monitoring program in the United States. Antimicrobial agents and chemotherapy., 61(3): e02252-16.

Saha, S., Devi, K. M., Damrolien, S., Devi, K. S., Krossnunpuii, and Sharma, K. T. 2018. Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital in north-East India., 8: 24-27.

Samad, A., Ahmed, T., Rahim, A., Khalil, A., and Ali, I. 2017. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients of respiratory tract infections in a Tertiary Care Hospital, Peshawar. Pakistan journal of medical sciences., 33(3): 670.

Sambrook, J. 1989. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. Molecular cloning. A laboratory manual., 3: 33-37.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2006. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using formamide. Cold Spring Harbor Protocols, 2006(1): pdb-prot3225.

Sameet, M. C., Awadh, H. A., and Suleiman, A. A. 2020. Effect of Isolation Source on Virulence Gene Expression, Phenotypic and Antibiotic Resistance Patterns of Clinical Isolate of Pseudomonas aeruginosa. Annals of Tropical Medicine and Public Health., 23: 184-189.

Sanderson, A. R., Leid, J. G., and Hunsaker, D. 2006. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. The Laryngoscope., 116(7): 1121-1126.

Sandoval-Motta, S., and Aldana, M. 2016. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine., 8(3): 253-267.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. 2002. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Sciences., 2: 34-37.

Schinner, S., Engelhardt, F., Preusse, M., Thöming, J. G., Tomasch, J., and Häussler, S. 2020. Genetic determinants of Pseudomonas aeruginosa fitness during biofilm growth. Biofilm., 2: 100023.

Schooling, S. R., and Beveridge, T. J. 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. Journal of bacteriology., 188(16): 5945-5957.

Shehab, S. K., and Jassim, E. H. 2019. Impact of Mint oil and Colistin antibiotic on pilB gene of clinical Pseudomonas aeruginosa Isolates from Baghdad, Iraq. Iraqi journal of biotechnology., 1: 83.

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., and Jackson, R. W. 2011. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. FEMS microbiology reviews., 35(4): 652-680.

Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R., and Olson, M. V. 2006. Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. Proceedings of the National Academy of Sciences., 103(22): 8487-8492.

Smith, M. 2017. Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years. Sciences., 1: 23-26.

Snook, C. F., Tipton, P. A., and Beamer, L. J. 2003. Crystal structure of GDP-mannose dehydrogenase: a key enzyme of alginate biosynthesis in P. aeruginosa. Biochemistry., 42(16): 4658-4668.

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

Stewart, P. S., and Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet., 358(9276): 135-138.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., and Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Reviews in Microbiology., 56(1): 187-209.

Sutherland, C. A., Verastegui, J. E., and Nicolau, D. P. 2016. In vitro potency of amikacin and comparators against E. coli, K. pneumoniae and P. aeruginosa

respiratory and blood isolates. Annals of clinical microbiology and antimicrobials., 15(1): 1-7.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., and the WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases., 18(3): 318-327.

Tacconelli, E., Smith, G., Hieke, K., Lafuma, A., and Bastide, P. 2009. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature-and registry-based estimates. Journal of Hospital Infection., 72(2): 97-103.

Tang, Y. W., Stratton, C. W., and Tang, Y. W. 2013. Advanced techniques in diagnostic microbiology. New York: Springer., 5: 43-47.

Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y., and Hancock, R. E. W. 2014. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. Journal of biotechnology., 191: 121-130.

Theagarajan, R., Dutta, S., Moses, J. A., and Anandharamakrishnan, C. 2019. Alginates for food packaging applications. Alginates: Applications in the biomedical and food industries., 2: 7.

Thi, M. T. T., Wibowo, D., and Rehm, B. H. A. 2020. Pseudomonas aeruginosa biofilms. International Journal of Molecular Sciences., 21(22): 8671.

Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S., Pelletier, D. A., and Spormann, A. M. 2004. Initial phases of biofilm formation in Shewanella oneidensis MR-1. Journal of bacteriology., 186(23): 8096-8104.

Tiwari, N., Rajdev, S., and Mullan, S. 2017. Resistance Trends among Pseudomonas aeruginosa Isolates in a Tertiary Care Centre in South Gujarat. Advances in Microbiology, 7(03): 188.

Walters III, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., and Stewart, P. S. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic

activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrobial agents and chemotherapy., 47(1): 317-323.

Wei, Q., and Ma, L. Z. 2013. Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. International journal of molecular sciences., 14(10): 20983-21005.

Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., and Greenberg, E. P. 2001. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Nature., 413(6858): 860-864.

Wojnicz, D., and Tichaczek-Goska, D. 2013. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of Escherichia coli planktonic and biofilm forms isolated from human urine. Brazilian Journal of Microbiology., 44(1): 259-265.

Wood, L. F., and Ohman, D. E. 2009. Use of cell wall stress to characterize σ22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in Pseudomonas aeruginosa. Molecular microbiology., 72(1): 183-201.

Wood, Watz 1995. Exopolysaccharide Alginate P. aeruginosa: enzymology.,12: 5-7.

Wozniak, D. J. 1994. Integration host factor and sequences downstream of the Pseudomonas aeruginosa algD transcription start site are required for expression. Journal of bacteriology., 176(16): 5068-5076.

Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., and Nation, R. L. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. Journal of antimicrobial chemotherapy., 60(6): 1206-1215.

EKLER

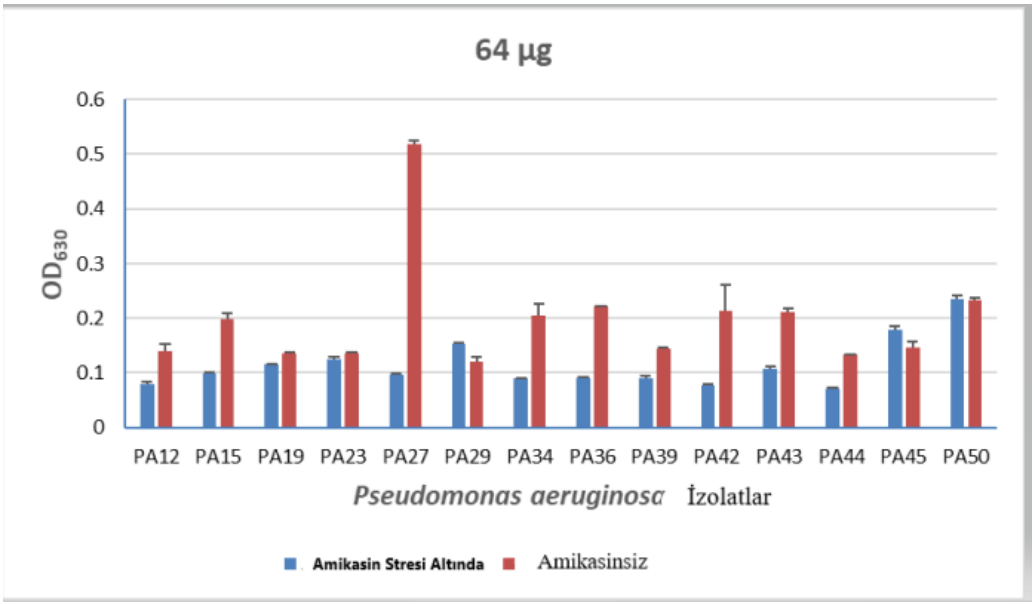
EK 1. Amikasin stresi altında (alt-MİK) (sub-128µg) biyofilm oluşturma testi (yoğunluk).
EK 2 Amikasin stresi altında (alt-MİK) (alt-256µg) biyofilm oluşturma testi (yoğunluk).
EK 3. Amikasin stresi altında (alt-MİK) (alt-512µg) Biyofilm oluşum testi (yoğunluk).
EK 4. Boyamadan önce ve boyamadan sonra kullanılan 96 oyuklu polistiren mikrotitre plakaları ile biyofilm oluşturma testi.

EK 1. Amikasin stresi altında (Alt-MİK) (alt-128µg) biyofilm oluşturma testi (yoğunluk)

İzolat Kodu	Amikasin Stresi Altında					Amikasinsiz					T test
	K1	K2	K3	Ortalama	SS	K1	K2	K3	Ortalama	SS	
PA12	0,079	0,078	0,084	0,0803	0,003	0,154	0,128	0,135	0,139	0,013	0,0133
PA15	0,094	0,101	0,098	0,0976	0,004	0,197	0,209	0,188	0,198	0,011	0,0016
PA19	0,115	0,116	0,115	0,1153	6E-04	0,137	0,137	0,135	0,1363	0,001	0,0001
PA23	0,128	0,12	0,124	0,124	0,004	0,139	0,134	0,135	0,136	0,003	0,0167
PA27	0,099	0,098	0,095	0,0973	0,002	0,524	0,513	0,518	0,5183	0,006	6,6226
PA29	0,153	0,155	0,153	0,1536	0,001	0,114	0,12	0,129	0,121	0,008	0,0156
PA34	0,09	0,089	0,089	0,0893	6E-04	0,228	0,198	0,186	0,204	0,022	0,0116
PA36	0,09	0,086	0,093	0,0896	0,004	0,22	0,223	0,221	0,2213	0,002	2,4752
PA39	0,094	0,09	0,087	0,0903	0,004	0,145	0,147	0,141	0,1443	0,003	4,1869
PA42	0,078	0,073	0,078	0,0763	0,003	0,257	0,22	0,165	0,214	0,046	0,0352
PA43	0,108	0,112	0,105	0,1083	0,004	0,218	0,213	0,205	0,212	0,007	0,0001
PA44	0,072	0,07	0,069	0,0703	0,002	0,132	0,134	0,133	0,133	0,001	2,5738
PA45	0,174	0,187	0,175	0,1786	0,007	0,133	0,147	0,157	0,1456	0,012	0,0226
PA50	0,242	0,236	0,23	0,236	0,006	0,23	0,237	0,231	0,2326	0,004	0,4692
Kontrol	0,057	0,057	0,058	0,0573	6E-04						

K= kuyucuk, SD= Standart sapma

CV	**0,059**
2CV	**0,118**
4CV	**0,236**

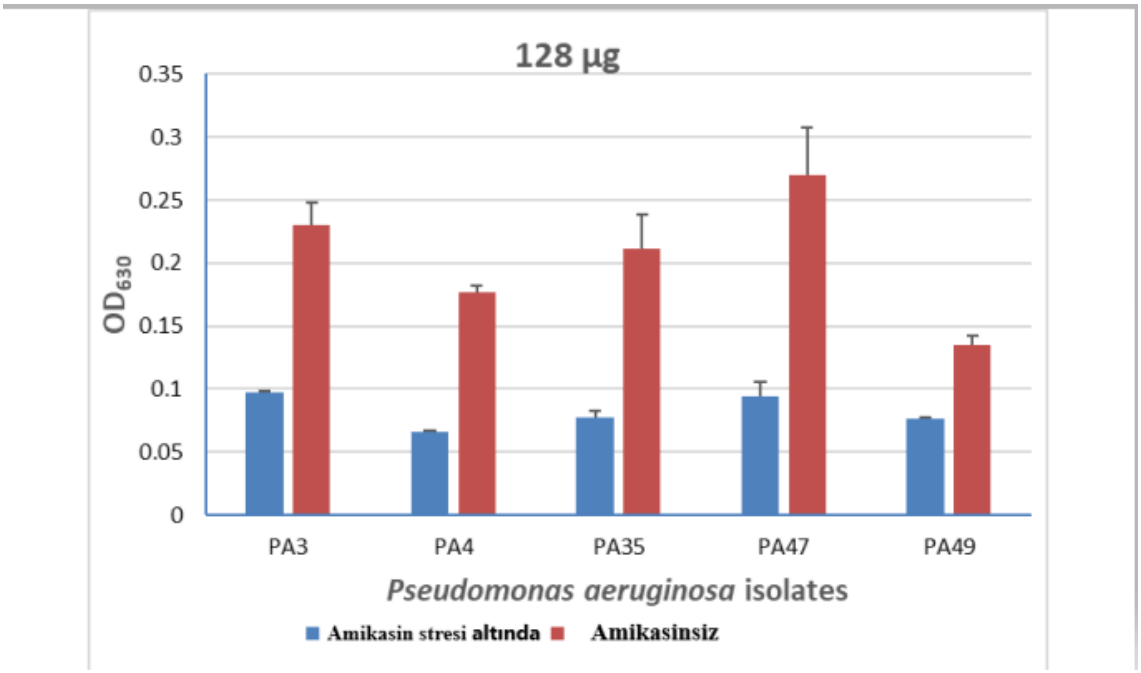


EK 2. Amikasin stresi altında (Alt- MİK) (alt-256µg) biyofilm oluşturma testi (yoğunluk)

İzolat Kodu	Amikasin stresi altında					**Amikasinsiz**					T test
	K1	K2	K3	Ortalama	SS	K1	K2	K3	Ortalama	SD	
PA3	0,098	0,096	0,097	0,097	0,001	0,225	0,216	0,25	0,230333	0,018	0,0056
PA4	0,066	0,067	0,064	0,065667	0,002	0,182	0,177	0,172	0,177	0,005	0,0002
PA35	0,082	0,071	0,078	0,077	0,006	0,21	0,239	0,185	0,211333	0,027	0,0107
PA47	0,082	0,105	0,096	0,094333	0,012	0,236	0,311	0,263	0,27	0,038	0,0100
PA49	0,076	0,076	0,078	0,076667	0,001	0,131	0,131	0,143	0,135	0,007	0,0038
Kontrol	0,059	0,063	0,057	0,059667	0,003						

K= kuyucuk, SD= Standart sapma

CV	0,069
2CV	0,138
4CV	0,275

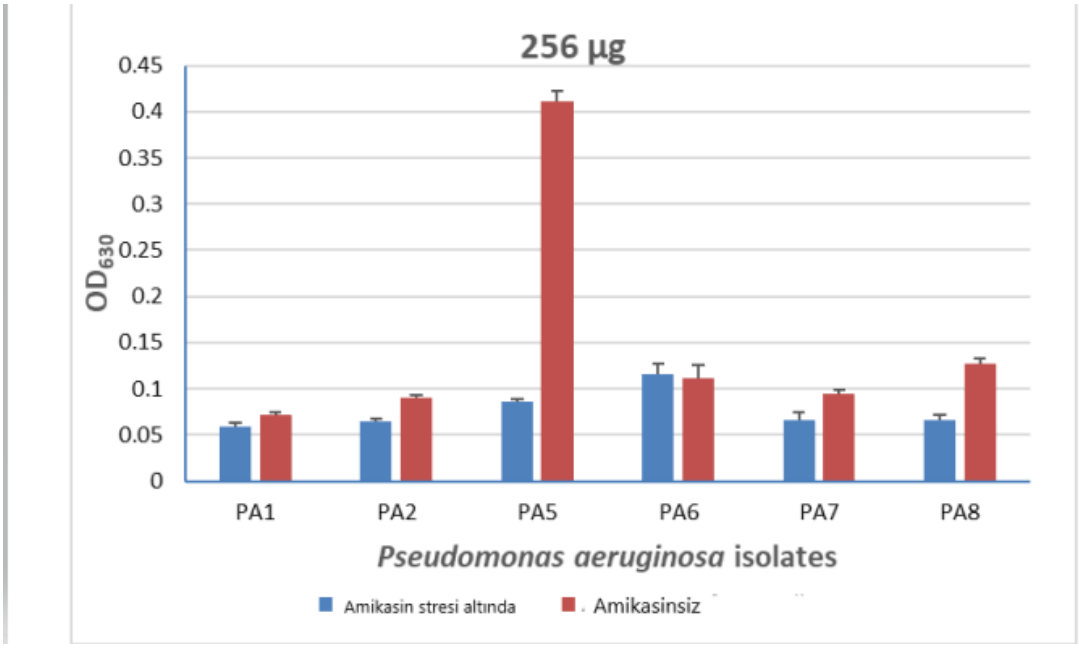


EK 3. Amikasin stresi altında (Alt- MİK) (alt-512µg) Biyofilm oluşum testi (yoğunluk)

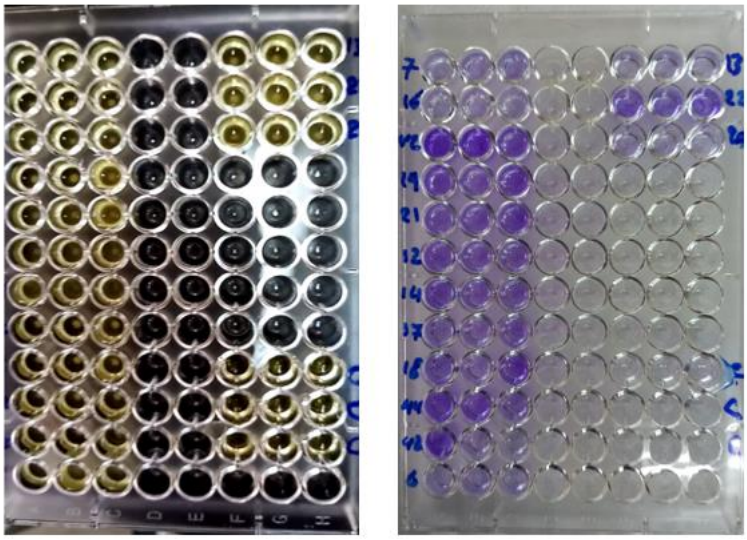
İzolat Kodu	Amikasin stresi altında					Amikasinsiz					T test
	K1	K2	K3	Ortalama	SS	K1	K2	K3	Ortalama	SD	
PA1	0,064	0,055	0,057	0,0586	0,0047	0,074	0,072	0,069	0,0716	0,0025	0,0237
PA2	0,068	0,062	0,065	0,065	0,003	0,089	0,093	0,09	0,0906	0,0020	0,0005
PA5	0,089	0,084	0,086	0,0863	0,0025	0,4	0,423	0,411	0,4113	0,0115	0,0002
PA6	0,127	0,105	0,116	0,116	0,011	0,109	0,1	0,127	0,112	0,0137	0,7149
PA7	0,076	0,059	0,063	0,066	0,0088	0,09	0,095	0,099	0,0946	0,0045	0,0159
PA8	0,073	0,063	0,064	0,0666	0,0055	0,132	0,123	0,128	0,1276	0,0045	0,0001
Kontrol	0,063	0,057	0,059	0,0596	0,0030						

K= kuyucuk, SD= Standart sapma

CV	0,0688
2CV	0,1377
4CV	0,2753



EK 4. Boyamadan önce ve boyamadan sonra kullanılan 96 oyuklu polistiren mikrotitre plakaları ile biyofilm oluşturma testi.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Thaer Mahmood Hamad AL-JANABI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006-2010