ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASTANE ENFEKSİYONLARINDAN *PSEUDOMONAS AERUGİNOSA*'IN İZOLASYONU VE YÜZEY VİRÜLANS FAKTÖRÜNÜN (BLAIMP) MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON tarafından hazırlanan **"Hastane Enfeksiyonlarından *Pseudomonas aeruginosa* In İzolasyonu Ve Yüzey Virülans Faktörünün (Blaimp) Moleküler Yöntemle Araştırılması"** adlı tez çalışması 25/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Prof. Dr. Hiyam Adil AL-TAII

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel SARI
Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Hastane Enfeksiyonlarından *Pseudomonas aeruginosa* In İzolasyonu Ve Yüzey Virülans Faktörünün (Blaimp) Moleküler Yöntemle Araştırılması**" 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 (25/01/2023).

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HASTANE ENFEKSİYONLARINDAN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN İZOLASYONU VE YÜZEY VİRÜLANS FAKTÖRÜNÜN (BLAIMP) MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Hiyam Adil AL-TAII

Pseudomonas aeruginosa, mevcut antibiyotiklere karşı artan direnci nedeniyle küresel bir tehdit haline gelmiştir. Bu çalışmada Musul şehir hastanelerinden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının teşhisi ve antimikrobiyal direnci araştırılmıştır. Başvuran hastalardan topladığımız 150 izolat, morfolojik, ve kültürel özelliklerine göre teşhis edilmiştir. Bunun için MacConkey agar gibi besi ortamları kullanılmış ve mikroskobik incelemeler yapılmıştır. Ayrıca katalaz (+), gram (-), sitrat (+) gibi biyokimyasal testlere göre de teşhis edilmiştir. İzole edilen 21 *P. aeruginosa* örneğinin 8'i klinik ve 13'ü çevresel kaynaklardan toplanmıştır. Bu 21 izolattan RNA izolasyonu yapılarak, moleküler yöntemlerle dirençden sorumlu olan *(Blaimp*) aktivitesi belirlenmiştir. . Son olarak, tüm direnç suşları arasından iki örnek, gen ekspresyonu sırasıyla 6,995424 ve 2,876129 değerleri ile yukarı regülasyon için anlamlı bir sonuç gösterirken, geri kalan diğer suşlar anlamlı olmayan gen aktivitesi göstermiştir. Bu 21 örnekten sadece 2 tane *P. aeruginosa* izolatında Imipenem'e karşı direnç saptanmıştır.

2023, 71 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa*, Enfeksiyon, Virülans faktör, İzolasyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ISOLATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* FROM HOSPITAL INFECTIONS AND INVESTIGATION OF SURFACE VIRULANCE FACTOR (BLAIMP) BY MOLECULAR METHOD

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON

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

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Hiyam Adil AL-TAII

Pseudomonas aeruginosa has become a global threat due to its increasing resistance to existing antibiotics. In this study, the diagnosis of *P. aeruginosa* bacteria isolates isolated from Mosul city hospitals and their resistance to antimicrobials were examined. 150 isolates collected from admitted patients were identified according to their morphological and cultural characteristics. For this purpose, media such as MacConkey's agar were used and microscopic examinations were performed. It was also diagnosed according to biochemical tests such as catalase (+), gram (-), citrate (+). Of the 21 P. aeruginosa isolates, 8 were collected from clinical samples and 13 from environmental sources. RNA was isolated from these 21 isolates and the (Blaimp) activity responsible for resistance was determined by molecular methods. Finally, among all the resistance strains, two samples showed a significant result in upward regulation of gene expression with values of 6.995424 and 2.876129, respectively, while the other strains showed non-significant gene activity. Of these 21 samples, only 2 P. aeruginosa isolates were resistant to Imipenem.

2023, 71 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Infection, Virulance factor, Isolation

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımda tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde beni destekleyen annem ve babama, her zaman benim yanımda duran ve destekleyen değerli kardeşlerim'e, çalışmanın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen, büyük bir anlayış gösteren değerli danışmanlarım Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Hiyam Adil AL-TAII'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON
Çankırı, Ocak 2023

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

2 LİTERATÜR ÖZETİ 3

2.1 Hastane Enfeksiyonları 3

2.2 Predispozan Faktörler 3

2.3 Etiyoloji 4

2.4 Hastane Enfeksiyonları için Mikroorganizmaların Edinimi ve Risk Faktörleri 4

2.5 Hastane Enfeksiyonunun Sınıflandırılması 5

2.5.1 Klinik enfeksiyonlar 5

2.5.2 Enfeksiyon kaynakları 8

2.6 *Pseudomonas* Türleri 9

2.7 Taksonomi 10

2.8 *P. aeruginosa* 10

2.8.1 *P. Aeruginosa* ve hastane enfeksiyonları 11

2.9 *Pseudomonas Fluorescens* 12

2.10 *Pseudomonas Stutzeri* 13

2.11 *Pseudomonas Putida* 13

2.12 *P. Aeruginosa'nın* Kistik Fibrozu ve Kistik Olmayan Fibrozu 14

2.12.1 Kistik fibroz ve *P. aeruginosa* 14

2.12.2 Kistik fibroz olmayan bronşektazi ve *P. aeruginosa* 14

2.13 Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Konakçılar 15

2.14 Hastane Ortamına Uyum Sağlama Yeteneği 15

2.15 Enfeksiyon Mekanizmaları ve Hastalık Oluşumu 16
2.15.1 Hareketlilik ve bağlanma 16
2.15.2 Biyofilm oluşumu ve aljinat salgısı 16
2.16*P. Aeruginosa'nın* Çoklu İlaç Direnci 17
2.16.1 *P. aeruginosa* enfeksiyonunun teşhisi 18
2.17Karbapenem Aktivitesinin Rolü 19
2.18İlaç Direncinin Ortaya Çıkması 19
2.19 *P. Aeruginosa*'da β-Laktamaz Üretimine Yönelik Gelişmekte Olan Stratejiler 20
2.20 β-Laktam Antibiyotiklerin (BLA) Sınıflandırılması 21
2.21 Yüzey Moleküler Faktörü (Blaimp) Metallo-β-Laktamazların (MBL'ler) Araştırılması ve Rolü 22
2.22 Blaimp Gen Edinimi 24
2.23 Kantitatif PCR (qPCR) 25
2.23.1 DNA Bağlayıcı Boyalar (SYBR Green I) 27
2.23.2 Erime eğrisi 27
2.23.3 Primer ve Amplikon Tasarımı 28
2.23.4 Tahlil Validasyonu ve Optimizasyonu 28
2.24 Gen ifadesi deneyinin adımları 28
2.24.1 Adımlar şunları içerir: 28
2.24.2 cDNA'nın mRNA'dan dönüştürülmesi 29
2.24.3 Göreceli Ölçüm deneyi 29
2.24.4 Gen ifadesi sonuç analizi 29
3 MATERYAL VE METOT 30
3.1 Materyaller 30
3.1.1 Ekipman ve aletler 30
3.1.2 Referans suşları 30
3.1.3 Kültür ortamları 31
3.1.4 Antibiyotik diskleri 31
3.1.5 Moleküler çalışmalar 32
3.2 Metotlar 33
3.2.1 Tamponların, çözeltilerin, reaktiflerin ve boyaların hazırlanması 33
3.2.2 Kültür ve tanı ortamlarının hazırlanması 34

3.2.3 Sterilizasyon metodu 34
3.2.4 Vakalar 34
3.2.5 Örnek toplama 35
3.2.6 Çalışma tasarımı 35
3.2.7 *Pseudomonas* türleri'nin tanımlanması 36
3.2.8 Antimikrobiyal duyarlılık testi 37
3.2.9 Bakteriyel inokulumun hazırlanması 37
3.2.10 Test plakalarının çizgilenmesi 38
3.2.11 Disklerin uygulanması 38
3.3 Hedef Genler için Ekspresyon Çalışması 38
3.3.1 Messenger-RNA ekstraksiyonu 38
3.3.2 Hedef mRNA-cDNA sentezi 39
3.3.3 Hedef gen ekspresyonunun amplifikasyon karışımı 40
3.3.4 Hedef mRNA ekpresyonu koşulları 40
3.4 Gen ekspresyonunun sonuç analizi 41
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 42
4.1 *P. aeruginosa* nın klinik örneklerden izolasyonu ve çevresel örneklerden 42
4.2 *P. aeruginosa* izolatları dışında saptanan diğer bakteriler 43
4.3 *P. aeruginosa*'nın Fenotipik Yapısı 43
4.4 *P. aeruginosa*'nın Antibiyotik Duyarlılık testi 44
4.5 Kantitatif Gerçek Zamanlı-PCR 46
4.5.1 *Blaimp* gen izolatları için moleküler tanımlama 46
4.5.2 Çoklu eğri sonuçları 46
4.6 Gen Ekspresyon Analizi (Blaimp Geni) 48
5 SONUÇ VE ÖNERİLER 50
5.1 Sonuç 50
5.2 Öneriler 50
KAYNAKLAR 52
ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

CAE	Cerrahi alan enfeksiyonları
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
HKP	Hastane kökenli pnömoni
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
Kİ-İYE	Kateter ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonları
MRSA	Metisiline dirençli *staphylococcus aureus*
PBP	Penisilin bağlayan proteinler
SHİE	Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon
SKİ-KDE	Santral kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları
VİP	Ventilatörle ilişkili pnömoni
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında virülans ve biyofilm oluşum mekanizmaları (Reynolds 2021).....17

Şekil 2.2 ESKAPE patojenlerinde antibiyotik direnç mekanizmaları (Mancuso 2021).....20

Şekil 2.3 BLA'ların ana sınıflarının kimyasal yapısı (β-laktam halkası yeşile boyanmıştır) (Vrancianu 2020) 22

Şekil 2.4 Antibiyotik direnç türleri (Schroeder 2017) 23

Şekil 2.5 Konjugasyon ve spontan transformasyon (Schroeder 2017).....25

Şekil 2.6 Amplifikasyon grafigi (Al-Abodi 2018).....26

Şekil 2.7 Gerçek zamanlı PCR'de DNA bağlayıcı boyalar: Boya molekülleri dsDNA'ya bağlandığında floresan önemli ölçüde artar (Al-Abodi 2018).27

Şekil 3.1 *P. aeruginosa*'nın izolasyon ve tanımlanması proprosedürlerini gösteren şematik diyagram.....36

Şekil 3.2 Gen ifadesi sonuç analizi (Chang *et al.* 2010).....41

Şekil 4.1 *P. aeruginosa*'da *Blaimp* geninin amplifikasyon eğrisi. (21 izolatta farklı gen ekspresyon değerleri ortaya çıkmıştır).....47

Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'da *Blaimp* geninin erime eğrisi.....48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Antibiyotiklerin etki şekli ve direnç mekanizmaları (Kapoor *et al.* 2017) 20
Çizelge 3.1 Kullanılan ekipman ve aletler 30
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan referans suşları 30
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ortamlar 31
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan antibiyotik disklerin bilgileri 31
Çizelge 3.5 mRNA'nın hazırlanması ve ekspresyonu için kullanılan kitler hakkında bilgi 32
Çizelge 3.6 *Blaimp* gen ekspresyonunun tespitinde kullanılan oligonükleotid primerleri dizisi (Goldsworthy 2008). 32
Çizelge 3.7 Hastanede toplanan örneklerin dağılımı 35
Çizelge 3.8 cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri 39
Çizelge 3.9 mRNA-cDNA sentezi reaksiyon koşulları 40
Çizelge 3.10 Hedef gen ekspresyonunun amplifikasyon karışımı 40
Çizelge 3.11 Real time qPCR hedef mRNA ekpresyonu 40
Çizelge 4.1 Klinik ve çevresel örneklerden *P. aeruginosa* nın varlığına dair veriler ... 42
Çizelge 4.2 İzole edilen *P. aeruginosa* izolatları ile diğer bakteri örneklerinin dağılımı 43
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa*'nın antibiyotik duyarlılık testi profili 44
Çizelge 4.4 İmepenem Direnci ve Blaimp Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki 49

1 GİRİŞ

Hastane kaynaklı veya "sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyon" olarak da adlandırılan hastane enfeksiyonu (HE), her yıl yüz milyonlarca insana bulaşmaktadır. Hastane enfeksiyonu, 48 saat boyunca bir sağlık kuruluşuna kabul edilen, ancak kabul sırasında herhangi bir enfeksiyon veya inkübasyon belirtisi olmayan bir hastanın yeni bir enfeksiyona sahip olması olarak tanımlanır. NI, hastanelerde ve diğer sağlık kurumlarında artan morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir (World Health Organization 2021). Santral kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (SKİ-KDE), kateter ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonları (Kİ-İYE), cerrahi alan enfeksiyonları (CAE), hastane kökenli pnömoni (HKP), ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) ve yara enfeksiyonlarının tümü sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonların (SHİE) örnekleridir (Boev and Kiss 2017). NI istatistiklerini sunan yüksek gelirli ülkelerin oranlarında büyük farklılıklar vardır (Magill *et al.* 2012). Buna ek olarak düşük ve orta gelirli ülkelerde bu oran %5,7 ile %19,1 arasındadır. Sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlar, 2014 yılında Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (ECDC) tarafından ABD'deki 183 hastaneden 11,282 hastayı kapsayan çok eyaletli bir araştırmanın konusuydu. 2011 yılında hastaneye yatırılan tahmini 648,000 hasta arasında pnömoni %21,8, cerrahi alan enfeksiyonları %21,8, gastroenterit %17,1, idrar yolu enfeksiyonları (İYE) %12,9 ve birincil kan dolaşımı enfeksiyonları en yaygın enfeksiyonlar. (Magill *et al.* 2014). *Staphylococcus aureus* ve Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), cilt ve cerrahi alan enfeksiyonlarının en yaygın nedenleridir. Birçok çalışma, sağlık çalışanları arasında gelişmiş el hijyeninin sağlık tesislerinde başta çoklu ilaca dirençli enfeksiyonlar olmak üzere SHİE gelişimini engelleyebileceğini göstermiştir (Kingston *et al.* 2016). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre hastane güvenliği ve bakım kalitesinin en önemli göstergelerinden biri el temizliğidir (World Health Organization 2006). Hamile kadınlar, bebekler ve çocuklar dengesiz ve olgunlaşmamış bağışıklık sistemleri ve ayrıca sınırlı sayıda mevcut tedaviler nedeniyle, özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı hassastır (Jajoo *et al.* 2018). Yenidoğanın enfeksiyonlara karşı korunmayı sağlamak için etkili bir enflamatuar yanıt başlatabilmesi ve aynı zamanda kolonizasyonlarının buna yanıt olarak iltihaplanma olmadan gerçekleşmesine izin verebilmesi gerekir, yaşamın başlangıcında

yenidoğanlar doğuştan gelen yanıtın bileşenlerine ve anneden antikorların pasif edinilmesine bağlıdır (Dowling and Levy 2014). Yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastalarda hastane enfeksiyonu riski oldukça yüksektir. Kanser hastalarında hastane enfeksiyonları, hastaların tedaviye bağlı ve hastalıkla ilgili sorunlar nedeniyle tedavi gördüğü yoğun bakım ünitelerinde artmaktadır (Azoulay *et al.* 2017). Böbrek nakli alıcılarının %79'a kadarı idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve bu da onun en yaygın enfeksiyon komplikasyonlarından biri haline getirir (Leylabadlo *et al.* 2016). Bu durumun en ciddi sonuçlarından biri, hastane enfeksiyonlarının bakteriyemiye, akut rejeksiyona veya sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonuna yol açabilmesidir (Silva *et al.* 2010). MDR (Çoklu ilaç direnci)/XDR (Yoğun ilaç direnci) Gram-negatif İYE'ler hastane maliyetlerini artırabilir ve böbrek hastalarının kalış süresini uzatabilir (Origüen *et al.* 2016). Mümkün olduğunda, Amerikan Diyabet Derneği yatan hasta diyabet yönetimi hizmetlerini önerir (American Diabetes Association 2020). Değişen klinisyen deneyimine sahip geniş bir hastane popülasyonu, diyabet tedavisi sağlamayı zorlaştırır, ancak gelişmiş glisemik kontrol, özellikle diyabet yönetimi bağlamında uygulandığında hastane kaynaklı enfeksiyonları en aza indirebilir ve hastanede kalış süresini kısaltabilir (Kyi *et al.* 2019). Enfeksiyon, azgelişmiş ülkelerde şeker hastalarının ilk üç sorunundan biridir ve zaten yüksek olan riski dört kat artırır (Alegre-Díaz *et al.* 2016). Kronik HBV ve HCV enfeksiyonunun 2030-2035 zaman diliminde karaciğer sirozu ve hepatoselüler kanserde artışa yol açması beklenmektedir. Bu nedenle, 2030 yılına kadar hedef, HBV ve HCV hastalarının yüzde 90'ını belirlemek ve yüzde 80'ini tedavi etmektir (World Health Organization 2016). Enfeksiyon oranları, enfeksiyon kontrol önlemleri, hastane prevalansı ve HCV bulaşından büyük ölçüde etkilenir (Wigneswaran *et al.* 2018).

Çalışmamızın hedefleri;Musul'da ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının belirlenmesi, Musul'da hastane enfeksiyonu olarak ortaya çıkan çeşitli mikrobiyal kolonilerin prevalansının, Ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının nedenlerinin belirlenmesi, Karpiminin direncinden sorumlu genin aktivitesinin belirlenmesi şeklinde sıralanabilir.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonları "sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlar" (SHİE) terimi, tıbbi bakım alırken bulaşan ancak başvuru sırasında mevcut olmayan enfeksiyonları ifade eder. Bu enfeksiyonlar, hastaneler ve uzun süreli bakım tesisleri dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda ortaya çıkabilir ve bir hasta taburcu edildikten sonra da kendini gösterebilir (Sikora and Zahra 2021). Sağlık hizmetlerinde hastaların güvenliğini etkileyen en yaygın yan etki SHİE'dir. Hastalar, aileler ve sağlık sistemleri üzerindeki morbidite, ölüm ve mali yükün önemli ölçüde sebebi SHİE olarak belirlenmiştir (Magill *et al*. 2018).

2.2 Predispozan Faktörler

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (ECDC) göre, Avrupa hastanelerinde ve uzun süreli bakım tesislerinde yılda yaklaşık 8,9 milyon sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonun (SHİE) meydana geldiği tahmin edilmektedir. Avrupa'nın sağlık sistemindeki 15 katılımcı ülke üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, NI hastaları en sık *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerle enfekte olmaktadır. 2017 yılında yoğun bakım ünitesinde iki günden fazla kalan hastaların en az 11,788'inde (%8,3) bir SHİE tespit edilmiştir (European Centre for Disease Prevention and Control 2019). Bağışıklığı zayıf olan hastaların NI'lere veya SHİE'lere yakalanma olasılığı daha yüksektir, bu da birincil hastalığın üstüne ek zorluklara yol açabilir. Yaş, ameliyat öncesi ve sonrası durum, metabolik değişiklikler (örneğin diyabet) ve elbette bağışıklıktaki bozulmaların tümü enfeksiyonla (doğuştan gelen, immünosupresif ajanların neden olduğu veya AIDS'in belirgin bir örnek olduğu hastalıklar) savaşma yeteneğinin azalmasına sebep olabilir. Hasta rezervuarları NI'lerin en önemli kaynağıdır. Diğer kaynaklar arasında sağlık çalışanları ve ziyaretçilerin yanı sıra hastane dışı personel de bulunmaktadır (Zaglool *et al*. 2011).

Bir hastanın bağışıklık durumu, toplumdaki çeşitli patojenlerin prevalansı ve hastanedeki enfeksiyon kontrolünün kalitesi, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon riskini (SHİE) etkiler. SHİE için risk faktörleri arasında immünosupresyon, ileri yaş, hastanede kalış süresi, altta yatan çeşitli komorbiditeler, sağlık kurumlarına sık ziyaretler, mekanik ventilasyon desteği yakın zamanda yapılan invaziv cerrahiler, kalıcı cihazlar ve yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) hastanede yatış yer alır (Sydnor and Perl 2011). Çeşitli ilaçlara karşı antimikrobiyal direnç gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biri, son zamanlarda intravenöz antibiyotik kullanımıdır (Metersky and Kalil 2017). Akut hastalıkların bakımının önemli bir parçası olarak, hastaneye yatışlar aynı zamanda çok sayıda nozokomiyal ve sıklıkla antimikrobiyal dirençli bakteri için duyarlı hastaların riskini de artırır. Yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastaların diğer hastalardan, sağlık personelinden veya tesisten bu hastalıklara yakalanma riski yüksektir. 947 hastanede 231,459 hastayla yapılan bir anket, yoğun bakım ünitesindeki (YBÜ) hastaların %19,5'inin en az bir sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyona (SHİE) sahip olduğunu ortaya koymuştur (Stiller *et al*. 2017).

2.3 Etiyoloji

Kateterle İlişkili İdrar Yolu Enfeksiyonuna (Kİ-İYE) neden olan bakteriler *Enterococcus, Staphylococcus aureus* (en yaygın olan) ayrıca *Pseudomonas*, *Klebsiella* ve *Candida'*dır (Flores-Mireles *et al.* 2019). Örneğin, Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı'na göre, SSI'lere genellikle *S. aureus*, pıhtılaşamayan stafilokoklar, enterokoklar ve *E. Coli* ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* gibi bakteriler neden olur (Young and Khadaroo 2014). *S. aureus* ve *P. aeruginosa* HKP ve VİP için en yaygın patojenlerdir, ancak *E. Coli* ve *Klebsiella pneumonia* çocuklarda daha sık görülür (Babcock *et al.* 2003).

2.4 Hastane Enfeksiyonları için Mikroorganizmaların Edinimi ve Risk Faktörleri

Hastane enfeksiyonlarına neden olan farklı bakteriler, endojen (hasta florası) veya eksojen enfeksiyon (kişi veya çevresel kaynaklar) tarafından edinilebilir:

Çevresel enfeksiyon: Dünya genelinde, sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlar (SHİE) milyonlarca gereksiz ölüme ve hastaneye yatışa neden olur (Jia *et al.* 2019). Çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların yayılması sonucu hastalar ve aileleri daha yüksek sağlık maliyetleri ile karşı karşıya kalmaktadır (Serra-Burriel *et al.* 2020). Sonuç olarak, SHİE'larin ortadan kaldırılması, hasta güvenliği, sağlık hizmeti kalitesi ve maliyetin düşürülmesi için önemli bir stratejik müdahaledir. Bu sebeple, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki (LMIC'ler) çok sayıda sağlık tesisi el hijyeni programlarını uygulamaya başlamıştır (Alp and Damani 2015). Çalışmalara göre, sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonlar (SHİE), hastalarda çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasıyla komplike hale gelmektedir (Lakoh *et al*. 2022). Çok sayıda araştırmaya göre, sağlık çalışanlarının elleri, SHİE'nun, özellikle çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların bulaşmasında kilit bir role sahiptir (Kingston *et al.* 2016).

2.5 Hastane Enfeksiyonunun Sınıflandırılması

Yeni araştırmalara göre İYE, pnömoni, kan enfeksiyonu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu (hava, doğrudan temas, dolaylı temas, damlacıklar, endojen, ortak kaynak, vektörler) hastane içi veya sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların (SHİE) yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ), cerrahi ve tıbbi servislerde yaygın olduğu gösterilmiştir.

2.5.1 Klinik enfeksiyonlar

2.5.1.1 Yara enfeksiyonları

Dünya çapında 20 milyondan fazla insanı etkileyen kronik yaraların tedavisi ve bakımı için her yıl 31 milyar doların üzerinde harcama yapılmaktadır (Nussbaum *et al.* 2018). Yara enfeksiyonlarının hem hastalar hem de onları tedavi eden sağlık sistemleri üzerinde önemli bir etkisi vardır (Järbrink *et al.* 2017). Pürülan drenaj, anormal granülasyon dokusu, anormal kötü koku, artan sıcaklık, daha fazla parçalanma, ödem, sertleşme ve eritem, insanlarda yüzeysel bir enfeksiyonun belirtileridir (Baranoski and Ayello 2008).

Kontaminasyon, kolonizasyon ve enfeksiyon, yara enfeksiyonunun üç aşamasını oluşturur (Haesler and Ousey 2022).

2.5.1.2 Kan dolaşımı enfeksiyonları

Kan dolşımı enfeksiyonarı (KDE) gelişen bir halk sağlığı sorunu, yaşamı tehdit eden bir hastane patolojisi ve dünya çapında önde gelen morbidite ve mortalite kaynağıdır, tedavi maliyetlerini ve tanı belirsizliğini arttırır (Timsit *et al.* 2020). Bu çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalar, uzun süreli YBÜ kalışları, yüksek maliyetler ve uygun ve hızlı bir şekilde tedavi edilmedikleri takdirde kötü sonuçlarla bağlantılı oldukları için KDE'ler endişe vericidir (Adrie *et al.* 2017).

2.5.1.3 Solunum yolu enfeksiyonları

Küresel Hastalık Yükü (GBD)'nün, 2015 de yaptığı "Yaralanmalar ve Risk Faktörleri" çalışmasına göre, alt solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni dahil olmak üzere akut solunum yolu enfeksiyonu (ARI) nedeniyle 1,2 milyon ölümden sorumlu olmuştur (Troeger *et al.* 2017). Aynı zamanda yoksul ülkelerde beş yaşın altındaki çocuklarda ölüm ve morbiditenin en önemli nedenidir ve sağlık sistemi için büyük bir yüktür. Beş yaşın altındakiler için, sağlık kurumlarına yapılan ziyaretlerin %30-50'sini ve hastanelere yapılan yatışların %20-%40'ını oluşturmaktadır (Gahlot *et al.* 2015). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, dünyadaki toplam hastalığın yaklaşık %6'sı solunum yolu enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Dünyada her yıl beş yaşın altındaki tahmini 6,6 milyon çocuk ölmekte, bu ölümlerin %95'i düşük gelirli ülkelerde gerçekleşmekte ve ARI bu ölümlerin üçte birini oluşturmaktadır (Tazinya *et al.* 2018).

2.5.1.4 CNS enfeksiyonları

En sık görülen nörolojik bozukluklar merkezi sinir sisteminin (CNS) enfeksiyonlarıdır (Robertson *et al.* 2018). Merkezi sinir sistemi (CNS) enfeksiyonlarına menenjit, ensefalit, meningoensefalit ve apse dahil olmak üzere çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar neden

olur (Dando *et al.* 2014). En yaygın ölüm nedenlerinden biri merkezi sinir sisteminin (CNS) bakteriyel enfeksiyonudur (Feigin *et al.* 2019). Bakteriyel menenjit, viral menenjit ve mantar menenjitinde olduğu gibi, mikrobiyal menenjit ve patojenlerin neden olduğu diğer CNS enfeksiyonlarının tedavisinde hızlı tanımlama ve tedavi çok önemlidir (Davis 2018).

2.5.1.5 İdrar yolu enfeksiyonları (İYE)

Kadınlarda idrar yolunun bakteriyel enfeksiyonları oldukça yaygındır. Kadınların %40 ila %60'ından fazlası, yaşamlarının bir noktasında hastalığa yakalanır ve enfeksiyonların çoğu, kadınlar 16 ila 35 yaşları arasındayken meydana gelir. Hastalığı geçirenlerin yaklaşık yarısı bir yıl içinde hastalığa tekrar yakalanır. Kadınlarda idrar yolu enfeksiyonlarına yakalanma olasılığı erkeklerden en az dört kat daha fazladır (Sakamoto *et al.* 2019). Çoğu komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonu (İYE) kendi kendine iyileşirken birçok kişi de semptomları için tedavi arayışında bulunur (Tang *et al.* 2019).

2.5.1.6 Zatürre

Yaşlı insanlarda pnömoni (Zatürre), enfeksiyondan kaynaklanan hem morbidite hem de mortalitenin önemli bir nedenidir (Troeger *et al*. 2017). Toplumda edinilen pnömoni (CAP), 65-69 yaş grubundaki 1000 kişiden yaklaşık 3'ünü ve 85-89 yaş grubundaki 1000 kişiden 22'sini etkiler (Millett *et al*. 2013). 2015 yılında dünya çapında 6,8 milyon hastaneye yatış yaşandı ve hastanelerde klinik pnömoniden yaklaşık 1,1 milyon kişi öldü. Erkeklerin, ileri yaşları nedeniyle hastaneye yatış oranları kadınlardan daha yüksekti (Fernández-Sabé *et al*. 2003). Öksürük, nefes darlığı ve ateş, göğüs röntgeninde yeni bir sızıntının ortaya çıkması gibi zatürre belirtileridir. Örneğin daha düşük bir sıcaklık eşiği gibi yaşa bağlı atipik semptomlar nedeniyle, yaşlılarda tanı daha zordur. Hastalar sıklıkla aynı anda birden fazla komorbiditenin düşmesi veya dekompansasyonu geçirdikten sonra sıklıkla acil servise başvururlar (Black 2016).

2.5.2 Enfeksiyon kaynakları

2.5.2.1 Gıda kaynaklı

FBD, zararlı patojenik bakteriler, virüsler veya parazitler ile lekelenmiş yiyeceklerin yenmesiyle ortaya çıkan herhangi bir hastalıktır ve bu patojenler, virüsler, bakteriler ve parazitler gibi biyolojik ajanlardır (Adley and Ryan 2016). FBD, Milyonlarca sporadik hastalık ve kronik komplikasyon vakasının yanı sıra birçok ülkede ve ülkeler arasında büyük ve zorlu salgınlara neden olmaktadır (Heredia and García 2018).

2.5.2.2 İçme suyu ile kaynaklı

10 kist kadar düşük enfeksiyöz dozların yutulmasının, bağışıklığı baskılanmış popülasyonda suda yaşayan protozoan hastalıkları geliştirme riski en fazla görülürken, bağışıklığı yeterli popülasyonda bile hastalığa neden olduğu gözlemlenmiştir (Dupont *et al*. 1995, Okhuysen *et al*. 1999, Ortega and Adam 1997, Steiner *et al*. 1997). Su kaynaklı protozoan patojenler (WBPP'ler) ve diğer mikroplar söz konusu olduğunda, biyofilmler su ortamlarında insan ve zoonotik enfeksiyonlar için önemli rezervuarlardır (Ryan *et al*. 2016).

2.5.2.3 Damlacıklar

Solunum yolu enfeksiyöz hastalıkları, toplumdaki yaşlılar için bir sağlık kuruluşundan hizmet aldıklarında, bağışıklığı baskılanmış veya altta yatan sorunlardan muzdarip olanlardan daha ciddi etkilere sahiptir. Ayrıca, kapalı bir alanda birlikte yaşadıkları için enfeksiyon riski altındadırlar ve bu da hastalığa karşı savunmasızlıklarını artırır. Damlacıklar ve enfekte bir kişiyle doğrudan ve dolaylı temas, solunum yolu hastalıklarının yayılmasının ana sebeplerindendir. Enfekte bir kişi öksürdüğünde, hapşırdığında, konuştuğunda veya nefes aldığında, tükürük damlacıkları enfekte kişinin solunum yollarından enfeksiyonları yayabilir. Patojenler, su damlacıkları buharlaştıkça oluşur ve bu patojenler, başka bir konakçı tarafından yutulmadan veya tüketilmeden önce

uzun süre havada kalabilir. Enfekte bir kişi savunmasız bir kişiyle temas ettiğinde veya duyarlı bir kişi kontamine nesneler veya yüzeylerle temas ettiğinde, bulaş meydana gelir (Sabel *et al*. 2010).

2.5.2.4 Doğrudan temas

Mikroorganizmaların enfekte olmuş bir konakçıdan veya sağlık çalışanından doğrudan temas ya da fomit iletimi yoluyla başka bir kişiye bulaşmasının; bakımın karmaşıklığı, yerleşik özellikleri, temas süresi, temas sayısı ve temas türü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Doroszkiewicz *et al*. 2018).

2.6 *Pseudomonas* Türleri

Pek çok *pseudomonad* türü arasında, *Pseudomonas* terimi, oksidaz pozitif ve katalaz pozitif, 0,5-1 mikrometre çapında ve 1,5-5 mikrometre uzunluğunda Gram negatif, spor oluşturmayan bakterileri ifade eder; flagella ile hareketlidirler ve karbonhidratları fermente etmezler: çoğu tür asidik koşullarda (pH 4,5 veya daha düşük) büyümez ve organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. *Pseudomonas*, musluk suyu gibi yalnızca az miktarda besin içeren suda dahi büyür ve bu, bakterilerin hastanede kalmasını kolaylaştırır (Levinson 2018). *P. aeruginosa*, hastane ortamında kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan en yaygın üçüncü Gram negatif bakteridir (Recio *et al*. 2020). *P. aeruginosa*'da, hem içsel hem de edinilmiş diğer mikroplardan elde edilen birçok antibiyotiğe karşı farklı direnç yöntemleri bulunmuştur (Hwang and Yoon 2019). Antibiyotik direnci, akış pompalarının aşırı ekspresyonu, dış zarın geçirgenliğinin azalması ve antibiyotiklerin dış zardan pasif difüzyonunu düzenleyen proteinleri kodlayan direnç genlerinin edinilmesi veya mutasyonu ile gelişir (Langendonk *et al*. 2021). *P. aeruginosa*, üçüncü ve dördüncü nesil sefalosporinlere ait geniş spektrumlu antimikrobiyaller olan seftazidim ve sefepim ile kaplıdır (Sader *et al*. 2017). *A.baumannii'*de olduğu gibi, dört primer laktamaz (A, B, C ve D) *P. aeruginosa*'da da bulunmuştur (Dehbashi *et al*. 2020). Benzilpenisilin ve imipenem gibi tam olarak hangi laktamların AmpC laktamaz gibi endojen laktamazların üretimini tetikleyebileceği bilinmemektedir (Pachori *et al*. 2019). *P. aeruginosa*, bir gen mutasyonuna bağlı olarak

AmpC β-laktamazları aşırı eksprese ederek direnç geliştirebilir (Berrazeg *et al*. 2015). Aktarılabilir aminoglikozit değiştirici enzimler (AME'ler), bakteri hücresindeki hedeflerinin bağlanma afinitesini düşürür, bu da *Pseudomonas*'ı aminoglikozitlere dirençli hale getirir. MDR *P. aeruginosa*'yı tedavi etmek için kolistin, imipenem, piperasilin, aztreonam, seftazidim veya siprofloksasin gibi bir anti-psödomonas ajanı ile kombinasyon halinde kullanılır. Fosfomisin, aminoglikozitler, sefalosporinler ve penisilinlerle kombinasyon halinde *P. aeruginosa*'da ilaç direncini tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır (Ontong *et al*. 2020).

2.7 Taksonomi

Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı'na (Bergey 2001) göre *Pseudomonas* taksonomisi aşağıdaki gibidir;

- Alem: Bakteri
- Filum: Proteobakteri
- Sınıf: Gammaproteobakteriler
- Sıralama: Pseudomonadales
- Aile: Pseudomonadaceae
- Cins: Pseudomonas
- Tür: *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. stutzeri, P. putida*

2.8 *P. aeruginosa*

P. aeruginosa gibi MDR patojenleri sıklıkla bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda bulunur, ancak bu patojen, tüm karbapenemlerin üzerinde birçok antibakteriyel ajana karşı içsel olarak azaltılmış bir duyarlılığa sahiptir. Bu patojenin antibakteriyel ajanlara karşı direnç geliştirmesi diğer MDR patojenlerine göre daha olasıdır. *P. aeruginosae* bağışıklığı baskılanmış hastaların normal bağırsak florasında yaygın olarak bulunur, ancak bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda diğer MDR patojenlerine göre daha sık izole edilir (Elsner *et al*. 2000). Son olarak ve bir o kadar önemli şekilde EBSL, KPC,

VIM ve imipenem Metallo-laktamazların (Metallo-laktamaz veya M-laktamaz olarak da bilinir) oluşumundan da izole edilir. Ayrıca, bir plazmit yukarıda sıralanan laktamazların hepsini taşıyabilir, bu da hem karbapenem hem de florokinolon direncinin yüksek oranları ile sonuçlanır. Yine de çoğu zaman kolistin işe yaramaktadır (Boucher *et al*. 2009).

2.8.1 *P. Aeruginosa* ve hastane enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın neden olduğu hastane enfeksiyonları yaygındır ve pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları ve bakteriyemiyi içerir. Sağlık hizmetiyle ilişkili tüm enfeksiyonlar arasında *P. aeruginosa*'nın prevalansının %7,1-%7,3 olduğu düşünülmektedir (Magill *et al*. 2014). Son on yılda, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının prevalansı artmıştır ve hastane pnömonisinde bulunan en yaygın Gram-negatif bakteridir (Williams *et al*. 2010). *P. aeruginosa*, yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastalarda sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların en sık nedenidir. YBÜ hastalarında enfeksiyonlara ilişkin uluslararası bir gözlem noktası prevalans çalışması, *P. aeruginosa*'nın hasta enfeksiyonlarının %16,2'sini oluşturduğunu ve tüm YBÜ kaynaklı enfeksiyonların %23'üne neden olduğunu ve bir solunum kaynağının en yaygın enfeksiyon bölgesi olduğunu göstermiştir (Vincent *et al*. 2020). Ventilatörle İlişkili Pnömoni (VİP) izolatlarının %10 ila %20'sine katkıda bulunan *P. aeruginosa, Staphylococcus aureus*'tan sonra ikinci sıradadır (Weiner *et al*. 2016). *P. aeruginosa* ile ilişkili Ventilatörle İlişkili Pnömoni'den ölüm oranının %32 ile %42,88 arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Micek *et al*. 2015). Sürekli hastaneye yatış ve erken *P. aeruginosa* kolonizasyonu, dünya çapında tüm VİP vakalarının %26'sını ve küresel toplamın %4,1'ini oluşturan bakterinin neden olduğu VİP için en yaygın risk faktörleridir (Kollef *et al*. 2014). Hastanede kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarının (Kİ-İYE) yaygın bir nedenidir. CDC'ye göre, *P. aeruginosa*, tüm Kİ-İYE 'lerin %10 ila %16'sından ve YBÜ hastalarındaki İYE'lerin %16'sına kadar sorumludur. Bölgesel antimikrobiyal direnç paternlerine göre, *P. aeruginosa* Kİ-İYE ayrıca yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç ile ilişkilidir. Uluslararası Nozokomiyal Enfeksiyon Kontrol Konsorsiyumu verileri, YBÜ hastalarında florokinolonlar, piperasilin-tazobaktam ve meropenemin %40'ın üzerinde direnç oranlarına sahip olduğunu ve diğer çalışmalarda gözlemlendiğinden daha yüksek olduğunu göstermektedir (Rosenthal *et al*. 2016). Bakteremi, yüksek oranda morbidite ve

mortalite ile bağlantılı olan *P. aeruginosa*'nın neden olduğu nozokomiyal İYE'nin olası bir sonucudur (Kitagawa *et al*. 2019). Zürih Üniversitesi Hastanesi'nde yapılan kardiyak prosedürlerin retrospektif çalışmalarında, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların, enfeksiyonu olmayanlara göre ölme ihtimalinin daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Massart *et al*. 2020). Yanık hastalarının nemli ortamının *P. aeruginosa* için elverişli ortam oluşturduğuna ve bu popülasyonda iyi bilinen bir komplikasyon ve majör patojen olduğuna inanılmaktadır. Yanık yarası olan hastalar en sık sepsis ve ölümle bağlantılı Gram negatif bir bakteri olan *P. aeruginosa* tarafından enfekte edilir (Norbury *et al*. 2016). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine göre, 1999'dan 2009'a kadar *P. aeruginosa*, pediatrik yanık yoğun bakım ünitelerindeki tüm sepsis ölümlerinin yüzde 86'sından sorumluydu ve *P. aeruginosa* tedavi için harcanan zamanın yüzde 64'ünü oluşturuyordu (Williams *et al*. 2009).

2.9 *Pseudomonas Fluorescens*

Yaygın bakteri *Pseudomonas fluorescens* tipik olarak toprak, yaprak ve su gibi ıslak habitatlarda bulunur (Silby *et al.* 2009). 37°C insan vücut sıcaklığında büyüyebilir ve virülans bileşenleri ile 25-30°C'de optimal büyüme sıcaklığına sahip Gram negatif bir psikrofil olarak ortaya çıkabilir (Scales *et al*. 2014). Kan dolaşımı, *P. aeruginosa*'dan çok daha az öldürücü olan ve invaziv hastane kaynaklı enfeksiyonların nadir bir nedeni olan *P. fluorescens* için en sık görülen enfeksiyon bölgesidir (Arega *et al*. 2017). *Pseudomonas fluorescens,* Ventilatörle ilişkili pnömoni bulunan kistik fibroz (KF) (Heirali *et al*. 2016) ve akciğer nakli pnömonisi olan kişilerden alınan solunum örneklerinde bulunmuştur (Dickson *et al*. 2014). *P. fluorescens* insan bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF), balgam numunelerinde veya boğaz sürüntülerinde bulunmuş olmasına rağmen, bu bakterinin pnömoni patogenezine nasıl katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Çeşitli raporlarda (Bahrani-Mougeot *et al*. 2007), daha önce pnömoni için etiyolojik bir ajan olduğundan şüpheleniliyordu. Bununla birlikte, *P. fluorescens* pnömonisinin klinik özellikleri ve ilaca duyarlılık paterni nadir olarak belgelenmiştir (Thangkhiew 1986).

2.10 *Pseudomonas Stutzeri*

(Burri and Stutzer 1895) *Pseudomonas stutzeri*'nin ilk tanımını yayınladılar. *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* cinsine ait olan ve birçok ekosistemde önemli rol oynayan ve çeşitli faydalara sahip Gram negatif bir basildir (Raza *et al*. 2010). Bununla birlikte, insan vücuduna bulaşabileceğinden, *P. stutzeri* tehlikeli olabilir. Fırsatçı bir organizma olduğu düşünülmektedir ve nadiren de olsa birçok bedensel sisteme zarar verebilir. Bu aerobik, oksidatif pozitif, çubuk şeklinde gram negatif bakteri toprakta ve suda doğal olarak bulunur (Lalucat *et al*. 2006). Bu bakteriye sahip gerçek insan enfeksiyonları tipik olarak protez cihazları içerir ve kronik komorbiditeleri, önceki ameliyat öyküsü, önceki travma veya cilt enfeksiyonları olan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda daha sık görülür. Bakteriyemi, pnömoni, osteomiyelit, artrit ve oküler enfeksiyonlar dahil olmak üzere çok sayıda *P. stutzeri* enfeksiyonu vakası literatürde bugüne kadar belgelenmiştir (Shalabi *et al*. 2017). Ek olarak, enflamatuar dokunun *P. stutzeri* enfeksiyonlarının daha kolay gelişmesini sağlayabileceği öne sürülmüştür.

2.11 *Pseudomonas Putida*

Yaygın bir fermente olmayan Gram negatif bakteri olan *Pseudomonas putida,* özellikle toprakta olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunabilir (Negi *et al.* 2011). Hem tatlı su hem de atık su ve klinik ortamlarda (Igbinosa *et al.* 2019) diğer *Pseudomonas* türlerine benzer şekilde minimal patojeniteye sahip olduğu düşünülse de, (Peter *et al.* 2017) bu bakteri son zamanlarda özellikle bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda bazı hastane enfeksiyonlarının nedeni olarak tanımlanmıştır (Chamon *et al.* 2020). Ek olarak, son zamanlarda endişe nedeni haline gelen MDR *P. putida* suşlarının artması, bu türle ilişkili riski daha da arttırmaktadır (Tan *et al.* 2019). *P. putida,* mobil genetik elementlerde bulunan direnç bileşenlerini diğer bakteri türlerine ve hatta cinslere yatay olarak aktararak antibiyotik direncinin yayılması için bir "rezervuar" rolünü oynar (Lu *et al.* 2020). Diğer mikroplarla aynı şekilde (Stewart and Costerton 2001), biyofilm üretme kapasitesinin *P. putida*'nın çoklu ilaç direncini arttırdığı gösterilmiştir. (Molina *et al.* 2014)

2.12 *P. Aeruginosa'nın* Kistik Fibrozu ve Kistik Olmayan Fibrozu

2.12.1 Kistik fibroz ve *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, kistik fibroz (KF) hastalarında önemli bir patojendir ve morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir (Mogayzel *et al*. 2014). KF ile ilişkili komplikasyonlar söz konusu olduğunda, bronşektazi, hava akımı tıkanması ve ölümün tüm olasılıklar arasında olduğunu akılda tutmak önemlidir. Kılavuzlar, *P. aeruginosa* ile kronik enfeksiyonda akciğer fonksiyonunu korumak için KF hastalarında *P. aeruginosa*'nın önemli ölçüde erken tedavisini savunmaktadır (Smyth *et al*. 2014). KF akciğerde gelişmek için, genellikle akciğerde bulunan anaerobik ortamda yaşamasına izin veren genetik değişiklikler yapabilir. Kronik yoğunluk sendromu (CFS)'li hastalar için, *P. aeruginosa*'nın erken teşhisi ve tedavisi, bakterinin mukoid fenotipinin gelişmesi, akciğer fonksiyonunun azalması ve daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğundan dolayı standart tedavi haline gelmiştir (Langan *et al*. 2015). Polisakkarit aljinat, *P. aeruginosa* ile kronik enfeksiyonun bir yan ürünüdür ve bir mukoid fenotipin gelişimi ile ilgilidir (Malhotra *et al*. 2019).

2.12.2 Kistik fibroz olmayan bronşektazi ve *P. aeruginosa*

Kronik enfeksiyon ve solunum yollarının iltihabı, solunum yollarının genişlemesi ve kalınlaşması ile karakterize bronşektazi semptomlarıdır. Bu durum genel popülasyonda KF'den daha yaygındır ve enfeksiyöz veya primer siliyer diskinezi ya da immün yetmezliğin yanı sıra bilinen herhangi bir etiyolojisi olmayan bronşektaziden kaynaklanabilir (Shoemark *et al*. 2007). KF olmayan bronşektazisi olan hastaların, akciğer sağlığının kötüleşmesi ve ölüm riskinin artmasıyla bağlantılı olan *P. aeruginosa* ile enfekte olma olasılığı daha yüksektir (Loebinger *et al*. 2009).

2.13 Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Konakçılar

Bağışıklığı baskılanmış hastalar, özellikle nötropeni hastaları, *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı daha da savunmasızdır. Hematolojik malignitesi olan hastalarda, *P. aeruginosa*'nın tüm Gram-negatif BSI'nın %17'sine neden olduğu ve *P. aeruginosa* için risk faktörlerinin; önceki ameliyat, nötropeni, steroid kullanımı ve hastalık şiddeti olduğu bildirilmiştir (Tofas *et al*. 2017). Başka bir çalışma, hematolojik maligniteli hastalarda tüm Gram negatif KSE'lerin %12,1'inden *P. aeruginosa*'nın sorumlu olduğunu ve bu hastalarda MDR izolatlarının arttığını göstermiştir (Carvalho *et al*. 2020).

2.14 Hastane Ortamına Uyum Sağlama Yeteneği

Yoğun bakım üniteleri ve uzun süreli bakım tesisleri, önemli bir morbidite veya mortalite (LTACH) kaynağı olan *P. aeruginosa* antimikrobiyal direncine karşı özellikle hassastır. Kİ-İYE, BSI ve VİP izolatlarının tümü MDR *P. aeruginosa* içerir. CDC'ye göre, 2011'de yüzde 15,7 olan *P. aeruginosa* izolatlarının 2018'de yalnızca %9'u MDR idi (CDC verileri) (CDC 2021). 2015 ve 2017 yılları arasında toplanan Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı verilerine göre, *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal direnç hala ciddi bir endişe kaynağıdır. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının toplam yüzde 26,3'ünün karbapenemlere dirençli olduğu, yüzde 26,5'inin geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli olduğu ve yüzde 27,1'inin florokinolonlara dirençli olduğu bulundu. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan elde edilen izolatların toplam yüzde 18,6'sının MDR olduğu, yani üç veya daha fazla antimikrobiyallere dirençli olduğu tespit edildi. Bu oran uzun süreli akut bakım hastaneleri (LTACH) için %29,9 olarak bildirildi (Weiner-Lastinger *et al*. 2020). Nozokomiyal pnömonide *P. aeruginosa*'nın MDR suşlarının yüksek prevalansı nedeniyle, tedavi rejimlerinin uygulanması zor olabilir. Uluslararası çok merkezli bir retrospektif çalışmada, *P. aeruginosa*'nın ikincil hastane pnömonisinin yüzde 30,5'inin MDR suşları olduğu ve bunun hastane içi ölüm riskinin artmasıyla ilişkili olduğu bulundu (Micek *et al*. 2015).

2.15 Enfeksiyon Mekanizmaları ve Hastalık Oluşumu

2.15.1 Hareketlilik ve bağlanma

Solunum sistemini hareket ettirmek ve enfekte etmek için, *P. aeruginosa*'nın solunum epiteline ve glikolipid asialo GM1'e bağlanan flagellum ve pilisine ihtiyacı vardır (Curran *et al*. 2018). Konakçı reseptör-bakteri yapışması, bakteriyel enfeksiyon sürecinde kritik bir adımdır; yapışma ancak bakteri ve konakçı hücreler temas ettiğinde meydana gelebilir.

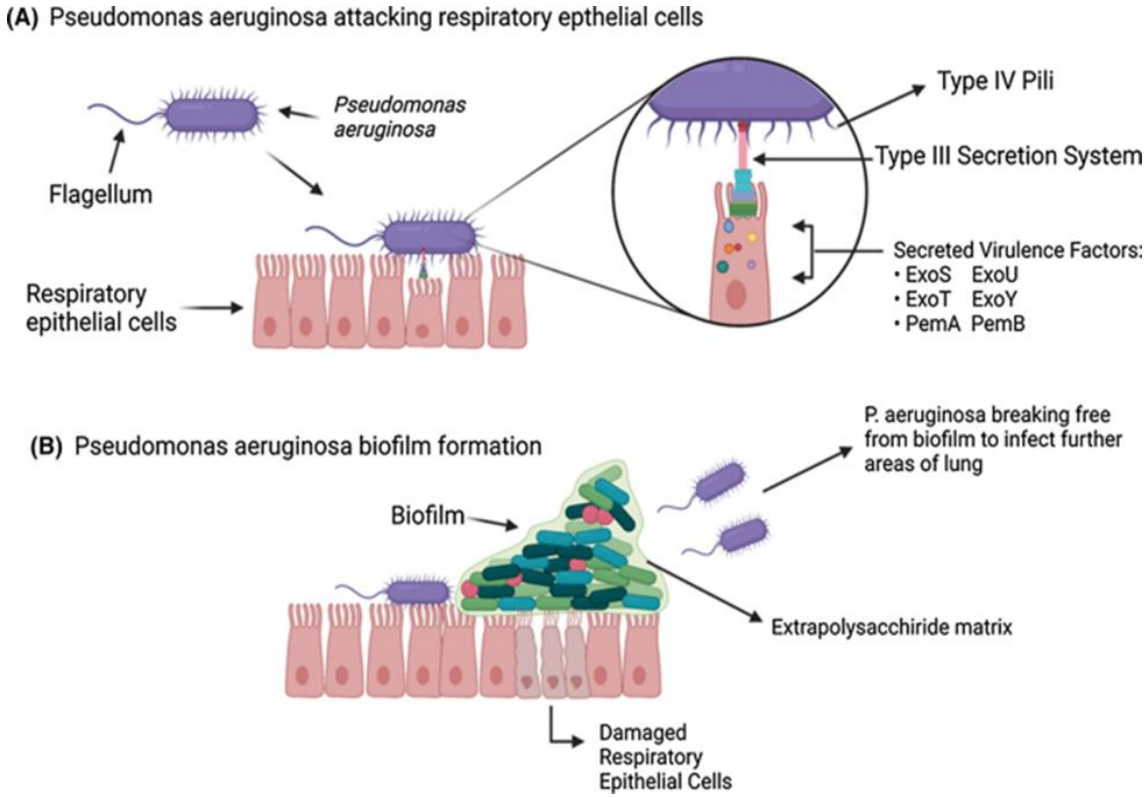
P. aeruginosa enfeksiyonu, motilite, hücrelere yapışma ve bir biyofilm oluşumu için gerekli olan tek kamçıya ve pilin polimerlerinden oluşan uzantılar olan tip IV pili'ye dayanır. Pili, biyofilm oluşumunda ve solunum epitel hücre tutunmasında ilgili rollere hizmet etmenin yanı sıra bakterilerin yüzeyler üzerinde hareket etmesine izin verir (Bucior *et al*. 2012). Şekil 2.1, *P. aeruginosa* tarafından solunum epitel hücrelerine saldırmak için kullanılan ilgili öldürücü mekanizmaları özetlemiştir.

2.15.2 Biyofilm oluşumu ve aljinat salgısı

Kronik akciğer hastalığı veya akut solunum yetmezliği olanlar gibi anormal solunum epiteli olan hastalar, akut fazda *P. aeruginosa* ile enfekte olabilirler. Altta yatan kistik fibroz gibi akciğer rahatsızlıkları olan hastalarda daha kalıcı bir enfeksiyon şekli gelişebilir. Bakteri hücreleri, konakçı hücrenin solunum epiteline yapışan hücre dışı bir matrisle kaplandığında bir biyofilm oluşur. *P. aeruginosa* akut dönemde tip IV pili ve flagellumunu kullanarak solunum epiteline tutunabilir. Bakteri tarafından salgılanan toksinler, konak hücrenin akciğerine zarar verir (Şekil 2.1).

P. aeruginosa bakterileri tarafından aljinatın oluşturulması, uzantılarının kaybolmasına ve uzun süreli enfeksiyona izin veren bir mukoid fenotipin gelişmesine neden olur (Lau *et al*. 2005).

D-mannuronik asit ve L-guluronik asitten oluşan bu ekzopolisakkarit, kistik fibrozda (KF) görülen mukoid fenotipin gelişimi için kritik öneme sahiptir. Bir anti-sigma faktörü olan MucA, AlgT'yi bağlayarak, aljinat üretimini sınırlayan yaş promotör bölgesinde aljinat ekspresyonunu tetiklemesini engeller. MucA genindeki mutasyonlar, KF hava yolundaki *P. aeruginosa*'da meydana gelir ve yaşa bağlı baskılama ve bir *P. aeruginosa* mukoid kolonisi tarafından kısıtlanmayan aljinat sentezi ile sonuçlanır. Biyofilm üretimi, konakçı immün hücre klirensini önleme ve antimikrobiyal tedavinin yanı sıra konakçının enfeksiyona immünolojik tepkisini etkileyebilecek immünomodülatör etkilerin tümü *P. aeruginosa*'nın aljinatı aşırı üretmesinin nedenleridir (Hauser *et al*. 2011).



Şekil 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarında virülans ve biyofilm oluşum mekanizmaları (Reynolds 2021).

2.16 *P. Aeruginosa'nın* Çoklu İlaç Direnci

Bu bakteri türü çeşitli ilaçlara karşı sınırlı toleransı nedeniyle insan sağlığı için giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır (Alvarez-Ortega *et al*. 2011). Ayrıca kromozomal

mutasyonlar kazanarak direnç elde etme yeteneği sayesinde (López-Causapé *et al*. 2018) karbapenemazlar olarak bilinen bir β-laktamaz sınıfının karbapenemleri, sefalosporinleri ve penisilinleri hidrolize edebildiği bulunmuştur. Siprofloksasin ve diğer laktama dirençli bakteriler, bu ilaçlara dirençli oldukları için sıklıkla önemli hastane enfeksiyonlarına neden olurlar. Karbapenemazlar da dahil olmak üzere tüm farklı β-laktamaz türleri bu üç kategoriden birine girer (Tondi *et al*. 2016). A ve D sınıfı metallo-laktamazların aktif bölgelerinde çinko bulunurken, B sınıfı metallo-laktamazların hidroliz mekanizmalarında serin vardır (Fouzia *et al*. 2013). A Sınıfı karbapenemazlar, KPC, NMC, IMI, SME ve GES ailelerinin üyelerini içerir. KPC karbapenemazları en yaygın olanlardır ve neredeyse sadece *Klebsiella pneumoniae* plazmitlerinde bulunurlar (Eftekhar and Naseh 2015). *Acinetobacter baumannii*'de karbapenemaz grubu D, OKSA-laktamaz içerir. *Pseudomonas aeruginosa*'da Metallo-laktamazlar ilk kez keşfedildi ancak Enterobacteriaceae ailesi şu anda bu -laktamaz sınıfının genişleyen küresel bir acil durumunu yaşamaktadır (Bradford *et al*. 2015).

2.16.1 *P. aeruginosa* enfeksiyonunun teşhisi

P. aeruginosa enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen ağır hastalardan, teşhisin konulmasından itibaren bir saat içinde kan kültürü alınması, hastalığın doğru teşhisi ve antibiyotik tedavisine başlanması için zorunludur (Levy *et al*. 2018). Çoğu laboratuvar, kültürde *P. aeruginosa* tanımlandıktan sonra, antimikrobiyal direncin tanımlanmasına ve ayrıca minimum inhibitör konsantrasyonların ölçülmesine izin veren, ticari olarak temin edilebilen otomatik antimikrobiyal duyarlılık kitlerini kullanır. Bu, direnci belirlemek ve uygun antibiyotik tedavisine rehberlik etmek için önemli bir sonraki adımdır (Bassetti *et al*. 2018). Pnömoniye neden olduğu bilinen bir dizi bakteriyi test etmek için multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanan alt solunum yolu enfeksiyonlarına yönelik testler, BAL örneklerinde *P. aeruginos*a için iyi bir duyarlılık ve özgüllük sergilemiştir (Murphy *et al*. 2020). *P. aeruginosa* enfeksiyonunu teşhis etmek için 48-72 saat sürebilen standart kültürün aksine, hızlı bir tanı testi; eşzamanlı viral veya bakteriyel enfeksiyonu tanımlama yeteneği, PCR testlerinde tanımlanabilen bazı antimikrobiyal direnç genlerinin erken tanımlanması ve antibiyotik tedavisinin zamanında kaldırılması dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir (Kollef and Burnham 2017).

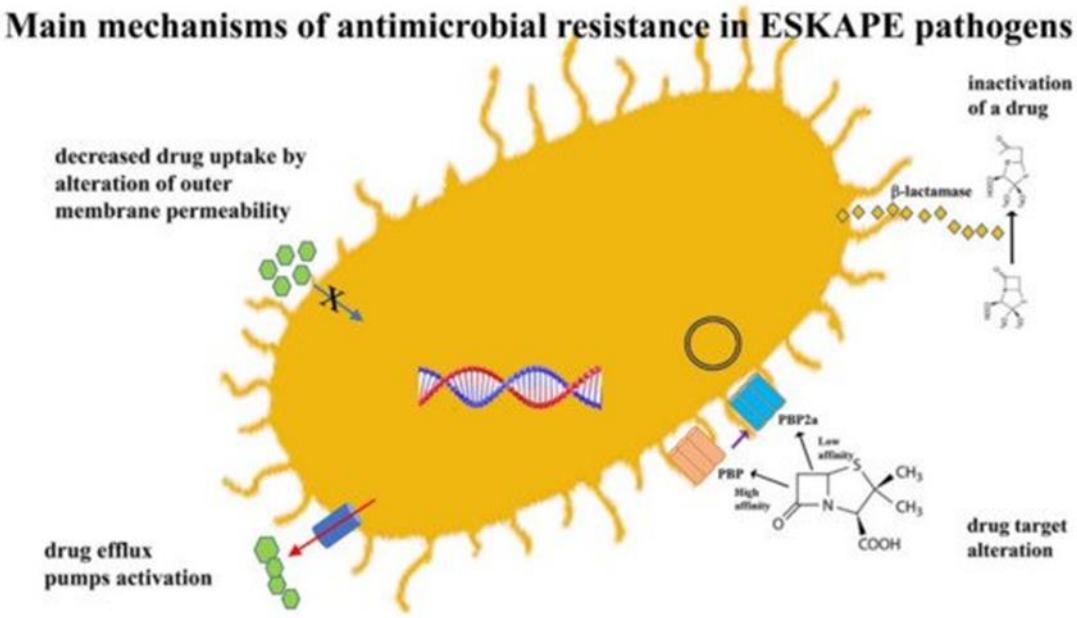
2.17 Karbapenem Aktivitesinin Rolü

Karbapenemler için şu anda mevcut olan penisilinler, sefalosporinler ve β-laktam / β-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına kıyasla diğer antibiyotiklerden daha geniş bir in vitro antibakteriyel spektrum göstermiştir (Bassetti *et al*. 2009). İmipenem, panipenem ve doripenem, Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibiyotiklerdir (Queenan *et al*. 2010). Gram negatif bakteriler açısından Meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem biraz daha güçlüdür (Bassetti *et al*. 2009). Buradaki önemli hususlar şunlardır: (i) İmipenem ve meropenem ile karşılaştırıldığında ertapenem, *P. aeruginosa*'ya karşı daha dar bir aktivite aralığına sahiptir (Oliver *et al*. 2004). (ii) Meropenem, *Acinetobacter baumannii*'ye karşı imipenem veya doripenem kadar etkili değildir (Oliver *et al*. 2004). (iii) *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*, imipenem ve meropenem olmamasına rağmen doripeneme karşı dirençlidir (Mandell 2009). Aynı zamanda doripenemin hidrolizine en dirençli karbapenemazdır; doripenemin hidrolizi imipeneminkinden 2 ila 150 kat daha azdır (Queenan *et al.* 2010) (iv) Meropenem, klavulanik asit ile eşleştirildiğinde kromozomal olarak üretilen laktamaz nedeniyle normalde laktamlara dirençli bir bakteri olan MDR *Mycobacterium* TB'nin öldürülmesinde benzersiz bir kullanıma sahiptir (Hugonnet *et al*. 2009).

2.18 İlaç Direncinin Ortaya Çıkması

Birçok farklı antibiyotik sınıfı olmasına rağmen, antibiyotik direncinin gelişimi ile en yakından ilişkili olanları tanımlamak için, daha sonra bu mekanizmalara göre gruplara ayrılan bu moleküllerin etki mekanizmalarını tanımlamak gerekir. Çizelge 2.1, ana antibiyotik gruplarının etki mekanizmalarını ve dirençlerini özetlemektedir.

Antimikrobiyal ajanların ana etki mekanizmaları Çizelge 2.1'de detaylandırılmıştır, Hücre duvarı, protein, nükleik asit ve metabolik yolları etkileyen bakteriyel aktivitelerin tümü bu tedavi yöntemi ile engellenir. İlaç akış pompası aktivasyonu, azaltılmış ilaç alımı, ilaç hedef modifikasyonu ve ilaç inaktivasyonu en yaygın direnç mekanizmalarıdır (Benkő *et al.* 2020) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 ESKAPE patojenlerinde antibiyotik direnç mekanizmaları **(**Mancuso 2021).

Çizelge 2.1 Antibiyotiklerin etki şekli ve direnç mekanizmaları (Kapoor *et al.* 2017)

Antimikrobiyal gruplar	Hareket mekanızması	Dırenç mekanızması
β-laktamalar Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	Hücre duvarı üretimini engeller	Beta-Laktamaz üretimi Penisilinaz Sefalosporinaz Karbapenemaz
β-laktamaz inhibitörleri	Beta-laktamaz enzimlerinin aktivitesini bloke eder	Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL)

2.19 *P. Aeruginosa*'da β-Laktamaz Üretimine Yönelik Gelişmekte Olan Stratejiler

β-laktam antibiyotikler (BLA), Alexander Fleming'in 1929'da stafilokoklara karşı terapötik bir ajan olarak penisilini keşfetmesinden bu yana en başarılı antibiyotik sınıfları olmuştur ve BLA'lar, tüm tıbbi reçetelerin yüzde 65'ini oluşturan bulaşıcı hastalıklara karşı en yaygın kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Genel olarak iyi tolere edilmelerine ve dirençli bakterileri öldürmedeki etkinliklerinin büyük olmasına rağmen, alerjik reaksiyonlar veya gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi advers olaylara neden olma potansiyeline sahiptirler (Bush and Bradford 2016). Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde, penisilin tarafından PG transpeptidasyonunun inhibisyon mekanizması ilk olarak 1965 yılında Tipper ve Strominger tarafından tanımlanmıştır ve bu mekanizma, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasının çapraz bağlanmasının son

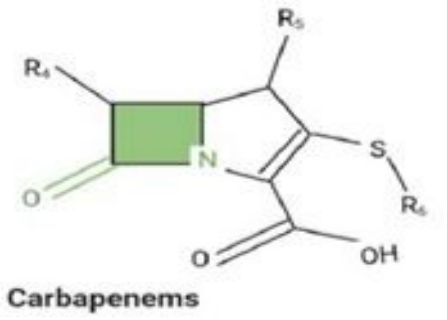
aşamalarında yer alan enzimlerin penisilin bağlayıcı proteinlere kovalent bağlanmasını takiben bakteri hücre duvarının oluşumunu bloke etmeye dayanmaktadır (Tipper and Strominger 1965). Bu mekanizma, ya penisilinin fonksiyonel PBP'lerde aktif bir serin bölgesine bağlanmasını ya da *Staphyloccocus aureus*'tan PBP2a'nın allosterik bir bölgesine bağlanmasını içerir, ilk durumda aktif bölgeye penisilin bağlanması enzimin asilasyonunu ve antibiyotik hidrolizini belirler (Frère *et al.* 1984). İkinci durumda allosterik bölgeye bağlanma vücudun duyarlılık tepkisini arttırır (Gonzales *et al.* 2015). Bozulmamış PG'yi yok eden hücre duvarı hidrolazları aktive edilir ve penisilin bağlayan proteinler (PBP)'nin BLA'lar tarafından inaktivasyonunun bir sonucu olarak aktif olarak bölünen hücrelerin parçalanmasıyla sonuçlanır (Sykes and Papich 2013). Gram-pozitif bakterilerdeki PG, Gram-negatif bakterilerden 50-100 kat daha kalın ve daha sıkı dokunmuştur, bu da yapısal bütünlüğünü korumasına izin verir (Silhavy *et al*. 2010). Gram pozitif bakteriler ise BLA'lar tarafından daha etkili bir şekilde hedeflenir. Bir ek not olarak, Gram negatif patojenlerin yüzeylerinde "dış zar" olarak bilinen ekstra bir zar tabakası vardır (May and Grabowicz 2018). Hücreyi, antibiyotikler de dahil olmak üzere farklı çevresel uyaranlardan ve tehlikeli maddelerden korumak için, glikolipid lipopolisakaritlerden (LPS) ve glikolipid gliserol fosfolipidlerden (GPL) oluşan bir çift lipid tabakası güçlü bir bariyer görevi görür (Miller 2016). Gram negatif organizmalar ve küçük moleküllerin pasif veya aktif alımına aracılık eden proteinler tarafından indüklenen septisemi ile ilişkili endotoksin şoku, dış zarın bariyer fonksiyonundan kaynaklanır (Vergalli *et al*. 2020).

2.20 β-Laktam Antibiyotiklerin (BLA) Sınıflandırılması

İmipenem, ertapenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemler, GSBL'ler dahil çoğu β-laktamaza daha dirençli olduğundan, en güçlü β-laktam antibiyotiklerdir. Bu β-laktam, penisilin benzeri beş üyeli halkanın C-1'inde kükürt veya oksijen yerine bir karbon atomunun yanı sıra C-6'da bir trans hidroksietil grubuna sahip olmasıyla diğerlerinden farklıdır (Şekil 2.3).

Karbapenemler, dış zardan artan penetrasyon güçleri, β-laktamazların etkisine karşı dikkate değer stabiliteleri ve neredeyse tüm PBP'ler için geliştirilmiş afiniteleri nedeniyle

Gram-pozitif, Gram-negatif, aerobik ve anaerobik mikroplara karşı etkilidir. Sadece *E. coli*, *K. pneumonia* ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu zor enfeksiyonlar karbapenemlerle tedavi edilebilir, bu nedenle yaygın olarak kullanılmazlar. MRSA, *E. faecium* ve *B. cepacia* dahil olmak üzere birçok Gram negatif aerobik çubuk, karbapenemlere dirençlidir (Wiley 2007).

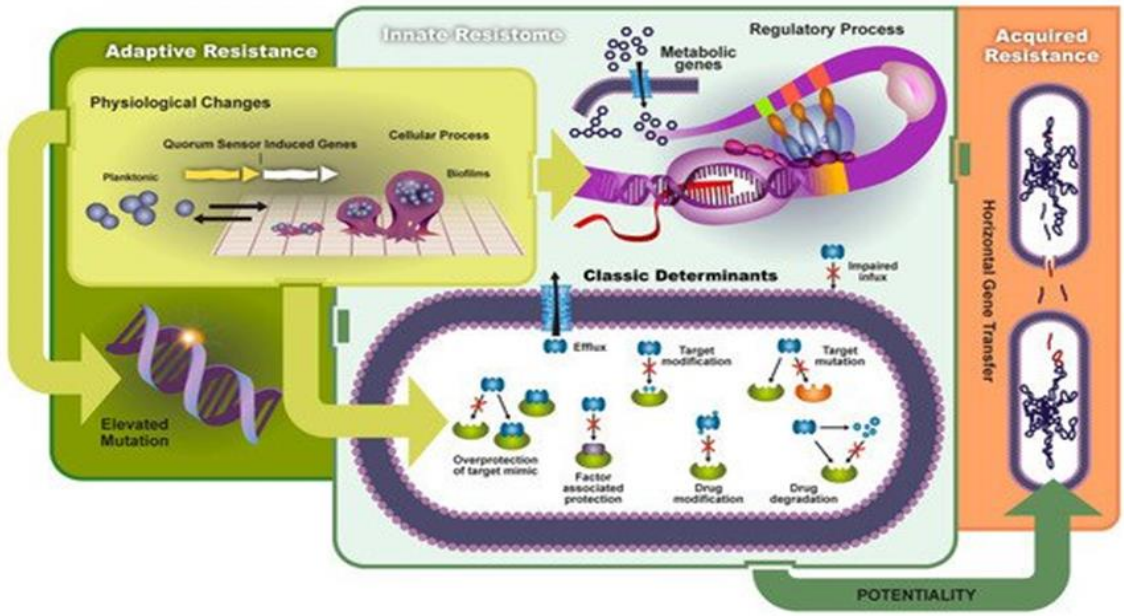


Şekil 2.3 BLA'ların ana sınıflarının kimyasal yapısı (β-laktam halkası yeşile boyanmıştır) (Vrancianu 2020)

2.21 Yüzey Moleküler Faktörü (Blaimp) Metallo-β-Laktamazların (MBL'ler) Araştırılması ve Rolü

Pseudomonas aeruginosa β -laktamlara, aminoglikozidlere ve kinolonlara karşı hassastır. Bu türdeki kilit karbapenem direnç mekanizmalarından biri, en yaygın olanları IMP ve VIM olan metallo-laktamazların (MBL'ler) üretimidir (Cornaglia *et al*. 2011). Aşağıdakilerin tümü Çin'de kaydedilmiştir: İMP-1, İMP-4, İMP -6, İMP -7, İMP -8, İMP -9 ve IMP-45 (Hong *et al*. 2015). Çin, Guangzhou'dan gelen *P. aeruginosa* izolatları, İMP-9'u ilk içeren izolatlardır (Xiong *et al*. 2006). Bu bölge, 2000 ve 2005-2007 yıllarında IMP-9 üreten bakteri salgınlarından etkilenmiştir (Chao *et al*. 2008). 2014 yılında Çin'in Pekin şehrinden bir köpek kökenli *P. aeruginosa*'da IMP-45'in (G214S) ilk vakasında meropenem direncinin imipenem direncinden daha güçlü olduğu gösterildi (Wang *et al*. 2014). Bunun sonucunda daha fazla klinik *Pseudomonas* IMP-45 üreten izolat bulundu (Yuan *et al*. 2017).Bunun bir örneği de Çin'in Şanghay kentindeki bir yoğun bakım ünitesinde, oraya geri gönderilen bir Fransız hasta üzerinde bulundu

(Janvier *et al*. 2017). Blaimp'nin küresel yayılma olasılığı nedeniyle, yalnızca bir IncP-2 tam dizili plazmidi, pOZ176 (500 kb), IMP-9'u kodlar ve blaOXA-10, aacA4 ve B-laktamlara ve aminoglikozitlere direnç kazandıran diğer genleri içerir. Bu plazmitte iki replikasyon geni, repA ve repA2 bulundu (Xiong *et al*. 2013). Tellürit direnci, *Pseudomonas* türleri ile sınırlı olan IncP-2 plazmitlerinde mevcuttur ve tipik olarak >300 kb uzunluğa ve tek bir kopyaya sahiptir (Jacoby *et al*. 1983).



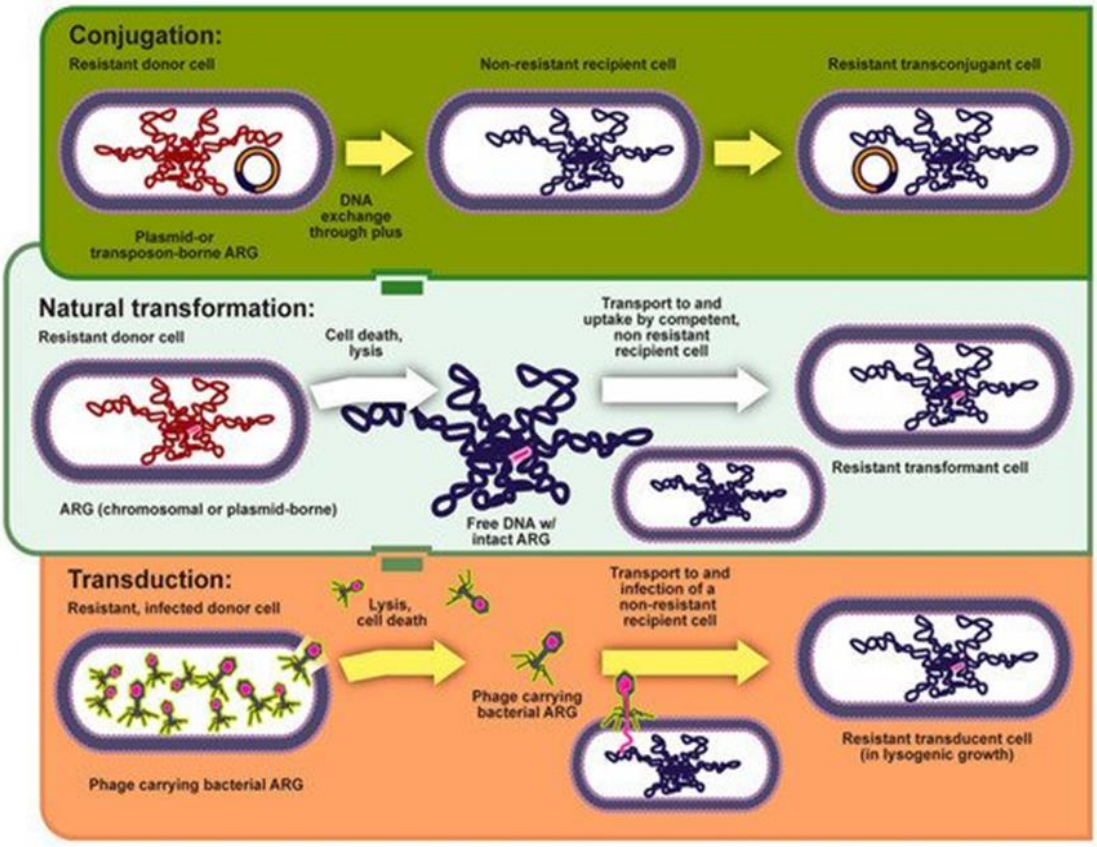
Şekil 2.4 Antibiyotik direnç türleri (Schroeder 2017)

Üç tip antibiyotik direnci vardır (Şekil 2.4): adaptif, doğuştan gelen ve edinilmiş. Bu tiplerin her birinin kendi bulaşma ve patojenite mekanizması vardır. Fizyolojik değişiklikler şunlara yol açabilir: (1) daha yüksek mutasyon oranları; (2) metabolik genlerdeki ve düzenleyici sistemlerdeki değişiklikler ve (3) çok çeşitli klasik antibiyotik etkisizleştirme ve direnç mekanizmaları (klasik belirleyiciler). Bakteriler, diğer bakterilerle paylaşarak böyle bir direnç ve virülans geliştirebilir.

2.22 Blaimp Gen Edinimi

Pek çok mikroorganizma ve patojenin birbirine yakın olduğu enfeksiyonlar genellikle yatay veya yanal gen transferiyle sonuçlanır, bu da antibiyotik direncinin çoğunluğunun bu şekilde yayılmasına neden olur (Juhas 2015).

Üç mekanizmadan biriyle yanal gen transferi gerçekleşebilir. (1) Çevreden DNA almak (Von Wintersdorff *et al*. 2016) (2) bakteriyofaj enfeksiyonu veya (Chen and Novick 2009) (3) plazmit rekombinasyonu/değişimi. Bununla birlikte, genetik materyalin transferi, evrimsel bir dezavantajdan yoksun değildir (Gandon and Vale 2014). Plazmidler, transpozonlar ve gen kümeleri, bakterilerin evrim üzerindeki bu yükü azaltmak için tasarladıkları genetik tekniklerden sadece birkaçıdır (Li and Nikaido 2009). Hareketli genetik elemanlarla çevrili bir operon veya küme, antibiyotik direncini tedavi etmek için en endişe verici stratejidir, çünkü antibiyotik direnci veren genetik bileşenlerin değişmemiş bir blok olarak hareket etmesine izin verir (Rodríguez-Rojas *et al*. 2013). Türler arasında genetik materyal transfer etme yeteneğinin bir sonucu olarak, antibiyotik direnci belirli bir ilacın ötesine yayılabilir. Antibiyotik direnci tipik olarak farklı bir antibiyotik sınıfına karşı yüksek düzeyde direncin bir sonucudur (Andersson and Hughes 2012).



Şekil 2.5 Konjugasyon ve spontan transformasyon (Schroeder 2017)

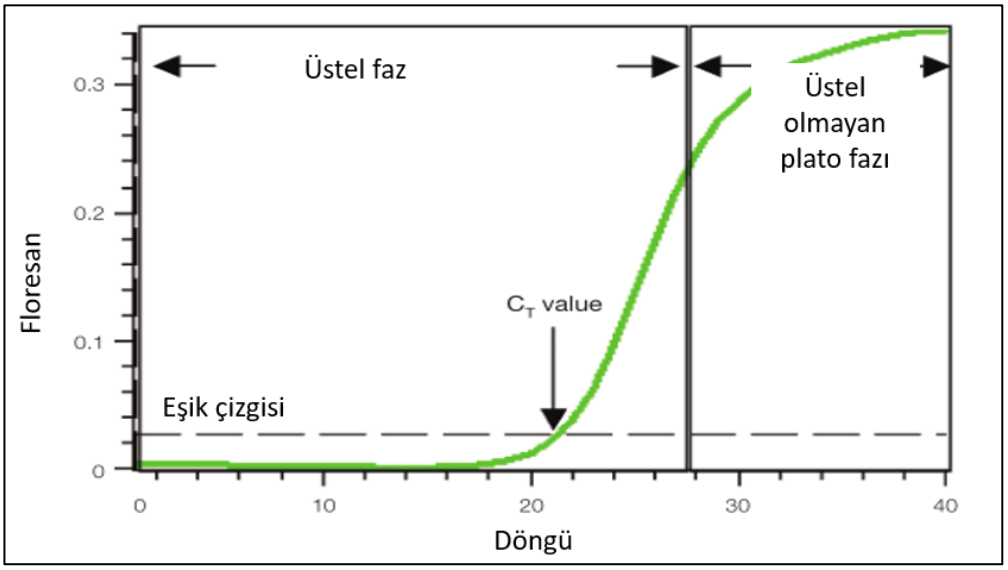
Konjugasyon ve spontan transformasyon (Şekil 2.5), genlerin yatay olarak aktarılabileceği iki yaygın yoldur. Direnç, transdüksiyon olarak bilinen bir süreçle bakteriyofaj yoluyla da iletilebilir.

2.23 Kantitatif PCR (qPCR)

Gerçek zamanlı, floresan tabanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), genomik çağın olanak sağlayan teknolojilerinden biridir ve mRNA'nın tespiti için tercih edilen yöntem haline gelmiştir (Bustin 2000).

Amplifikasyon grafiği, üstel bir faz ve ardından üstel olmayan bir plato fazı olmak üzere iki fazı gösterir. Üstel faz sırasında, her döngüde PCR ürününün miktarı yaklaşık olarak iki katına çıkar. Reaksiyon bileşenleri tüketilir ve sonuçta bileşenlerden bir veya daha

fazlası sınırlayıcı hale gelir. Bu noktada reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer. (28-40 döngüsü, (Şekil 2.6) (Frage *et al.* 2008) .



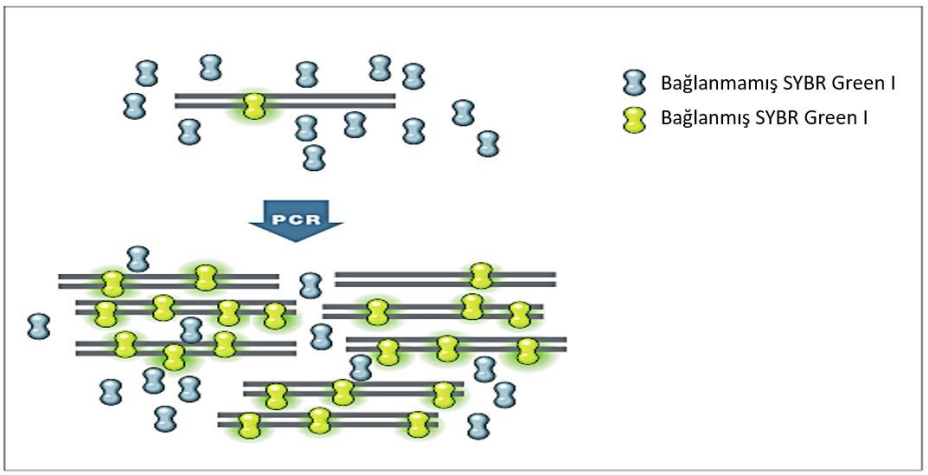
Şekil 2.6 Amplifikasyon grafigi (Al-Abodi 2018)

Başlangıçta, floresan arka plan seviyelerinde kalır ve ürün üstel olarak birikse bile floresandaki artışlar tespit edilemez (Şekil 2.6'deki döngüler 1-18). Sonunda, algılanabilir bir flüoresan sinyali vermek için yeterince güçlendirilmiş ürün birikir. Bunun meydana geldiği döngü numarası, eşik döngüsü veya C_T olarak adlandırılır. C_T değeri, reaktifler sınırlı olmadığında üstel fazda ölçüldüğünden, gerçek zamanlı qPCR, reaksiyonda mevcut olan ilk şablon miktarını güvenilir ve doğru bir şekilde hesaplamak için kullanılabilir.

Bir reaksiyonun C_T'si esas olarak amplifikasyon reaksiyonunun başlangıcında mevcut olan şablon miktarı ile belirlenir. Reaksiyonun başlangıcında büyük miktarda şablon mevcutsa, arka plan üzerinde bir flüoresan sinyali verecek kadar ürün biriktirmek için nispeten az amplifikasyon döngüsü gerekecektir. Bu nedenle, reaksiyon düşük veya erken bir C_T 'ye sahip olacaktır. Tersine, reaksiyonun başlangıcında az miktarda şablon mevcutsa, floresan sinyalinin arka planın üzerine çıkması için daha fazla amplifikasyon döngüsü gerekecektir. Bu nedenle, reaksiyon yüksek veya geç bir C_T 'ye sahip olacaktır (Rice *et al.* 2003).

2.23.1 DNA Bağlayıcı Boyalar (SYBR Green I)

Gerçek zamanlı PCR için en yaygın kullanılan DNA bağlayıcı boya, çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) spesifik olmayan şekilde bağlanan SYBR Green'dir. SYBR Green I, çözelti içinde serbest olduğunda çok az floresan sergiler, ancak dsDNA'yı bağladığında floresansı 1000 kata kadar artar (Şekil 2.7). Bu nedenle, bir reaksiyondan gelen genel flüoresan sinyali, mevcut dsDNA miktarı ile orantılıdır ve hedef yükseltildikçe artacaktır (Kumar *et al.* 2019).



Şekil 2.7 Gerçek zamanlı PCR'de DNA bağlayıcı boyalar: Boya molekülleri dsDNA'ya bağlandığında floresan önemli ölçüde artar (Al-Abodi 2018)

2.23.2 Erime eğrisi

Erime eğrisi analizi, spesifik olmayan ürünler de dahil olmak üzere farklı reaksiyon ürünlerini tanımlamak için kullanılabilir. Amplifikasyon reaksiyonunun tamamlanmasından sonra, sıcaklığın küçük artışlarla arttırılması ve her adımda floresan sinyalinin izlenmesiyle bir erime eğrisi oluşturulur. Reaksiyondaki dsDNA denatüre olduğunda (yani DNA "eridikçe") floresan azalır. Floresandaki değişimin negatif birinci türevi, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çizilir. Amplikonun erime sıcaklığındaki karakteristik bir tepe noktası (Tm, bir DNA dupleksinin baz çiftlerinin% 50'sinin ayrıldığı sıcaklık), onu farklı sıcaklıklarda eriyen primer dimerler gibi diğer ürünlerden ayırır (Rolando *et al.* 2020).

2.23.3 Primer ve Amplikon Tasarımı

Başarılı bir gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, ürünün etkili ve spesifik amplifikasyonunu gerektirir. Hem primerler hem de hedef sekans bu verimliliği etkileyebilir.

Amplikon tasarımı için, amplikon 75–200 bp olacak şekilde tasarlanır. Daha kısa amplikonlar tipik olarak daha yüksek verimlilikle amplifiye edilir. Oluşabilecek herhangi bir primer-dimerden kolayca ayırt edilebilmesi için bir amplikonun en az 75 bp olması gerekir. Ek olarak, mümkünse ikincil yapıdan kaçınılır, %50–60'lık bir GC içeriği korunur ve 50ºC ile 65ºC arasında bir erime sıcaklığı (T_m) seçilir. T_m değerleri hesaplanır. Sonunda ikincil yapıdan kaçınılır; hedef dizinin dışındaki primer konumları ayarlanır (Rodríguez *et al.* 2015).

2.23.4 Tahlil Validasyonu ve Optimizasyonu

SYBR Green I qPCR reaksiyonu, SYBR Green, şablon (CDNA) ve primerler içeren PCR ana karışımını içerir. Önceden formüle edilmiş gerçek zamanlı PCR ana karışımları Tampon, DNA polimeraz, dNTP'ler ve SYBR Green I boya içerir (Bookout *et al.* 2006).

2.24 Gen ifadesi deneyinin adımları

2.24.1 Adımlar şunları içerir:

- RNA, hedef numuneden ve normal numuneden izole edildi.
- RNA, PCR tekniği kullanılarak cDNA'ya ters kopyalandı.
- Hedef genlerin (blaimp) ve referans genin (GAPDH) miktarı, bir gerçek zamanlı qPCR tahlili kullanılarak cDNA numunelerinin her birinde belirlendi..
- Veriler analiz edildi ve iki numunedeki hedef genlerin her birinin nispi ifadesi hesaplandı (Abdel-Hadi *et al.* 2011).

2.24.2 cDNA'nın mRNA'dan dönüştürülmesi

RNA ilk önce ters transkriptaz kullanılarak bir reaksiyonda cDNA'ya kopyalanır. Ortaya çıkan cDNA'nın bir bölümü daha sonra çoklu qPCR reaksiyonları için şablon kaynağı olarak kullanılabilir. RT adımı, iki tipin bir karışımı olan oligo(dT) primerleri, rastgele primerler ile hazırlanabilir (Harrison *et al.* 2000).

2.24.3 Göreceli Ölçüm deneyi

RNA, hedef numuneden (stres altında) ve normal numuneden ekstrakte edilir ve mRNA miktarını (kopya numarası) belirler. Bununla birlikte, her iki numunede de bir ters transkriptaz enzimi çalıştırarak cDNA'ya (gen ekspresyon kopya numarasının tespiti için şablon) dönüştürür. Her iki numunedeki Blaimp-cDNA ve GAPDH-cDNA seviyeleri daha sonra bir RT-qPCR tahlili ile belirlendi. Normalizasyon için hedef ve normal örnek a'da GAPDH mRNA ekspresyon seviyesi aşağıdaki gibi belirlendi (Kubista *et al.* 2006).

2.24.4 Gen ifadesi sonuç analizi

Normalleştirici olarak referans genler kullanılarak test örneğinde ve kalibratör örneğinde bir hedef genin nispi ifadesini belirlemek için hem hedef hem de referans genlerin ifade düzeylerinin RT-qPCR kullanılarak belirlenmesi gerekir. CT değerleri ölçüldükten sonra, test örneğindeki hedef genin kalibratör (normal) örneğine göre ifade düzeyini belirlemek için farklı yöntemler kullanılabilir. 2 –ΔΔC T yöntemi olarak da bilinen Livak yöntemi (Chang *et al.* 2010).

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Ekipman ve aletler

Bu proje sırasında kullanılan ekipman ve aletlerin listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan ekipman ve aletler

Ekipman/Alet	**Üretici Firma**	**Menşei**
Otoklav	Sturdy	Taiwan
Laminar akış kabini	K&k	South Korea
Bileşik ışık mikroskobu	Olympus	Japan
Elektrikli fırın	Memmert	Germany
Eppendorf santrifüj cihazı	Hettich	Germany
Eppendorf tüp	Sigma	England
Exispin PCR santrifüj cihazı	Bioneer	South Korea
Inkübatör	Memmert	Germany
Hot plate manyetik karıştırıcı	Heidolph	Germany
Mikropipetler (farklı hacimlerde)	Cyan	Belgium
PCR termocycler	BIORAD T100	USA
Real Time termocycler (nicel)	AB™ 7500 Fast	USA
Hassas tartı	Sartorius	Canada
Uv Transilluminator	ECX-15	European
Vortex karıştırıcı	Stuart	UK
Su distilatörü	K&K	South Korea

3.1.2 Referans suşları

Bu çalışmada kullanılan referans suşları Çizelge 3.2'te listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan referans suşları

Suş adı	**Laboratuvar tanımlama**	**Temel özellikler**	**Kaynak**
Pseudomonas aeruginosa	Amerikan tip kültür koleksiyonu (ATCC ®27853)	Hastane ortamından izole edilmiş	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Tıp Fakültesi/ Musul Üniversitesi

3.1.3 Kültür ortamları

Bu çalışmada kullanılan kültür ortamları aşağıdaki Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ortamlar

ORTAM	ÜRETICI	MENŞEI
MacConkey agar	Himedia	Hindistan
Muller Hinton agar	Himedia	Hindistan
Besin suyu agarı	Himedia	Hindistan
Nutrient agar	Himedia	Hindistan

3.1.4 Antibiyotik diskleri

Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotik diskler aşağıda yer alan Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan antibiyotik disklerin bilgileri

İnhibisyon zonu çapı (mm)			Konsantrasyon µg/mL	Sembol	Antibiyotik	Antibiyotik sınıfı
S*	I*	R*				
≥19	16-18	≤15	10	IMP	İmipenem	Karbapenemler
≥21	15-20	≤14	100	PRL	Piperasilin	Piperasilinler
≥18	15-17	≤14	30	CAZ	seftazidim	Sefalosporinler
≥18	15-17	≤14	10	FEP	Sefepim	
≥15	12-14	≤11	30	TE	Tetrasiklin	Tetrasiklinler
≥15	13-14	≤12	10	TOB	Tobramisin	Aminoglikozitler
≥17	15-16	≤14	30	AK	Amikasin	
≥15	13-14	≤12	10	CN	Gentamisin	
≥17	13-16	≤12	10	NOR	Norfloksasin	Florokinolonlar
≥22	15-21	≤14	5	LEV	Levofloksasin	

*S; Senstitive (Hassas) I; Intermedate (Orta) R; Resistance (Dirençli)

3.1.5 Moleküler çalışmalar

3.1.5.1 Messenger-RNA Ekspresyon Değerlendirmesi

mRNA izolasyonu, mRNA-cDNA sentezi ve ekspresyonu için kullanılan uygun kitler Çizelge 3.5'da listelenmiştir.

Çizelge 3.5 mRNA'nın hazırlanması ve ekspresyonu için kullanılan kitler hakkında bilgi

Kit	Uygulama	Üretici firma	Ülke
RiboEx and Hybrid-R	mRNA izolasyonu	GeneAll	Güney Kore
Hyper Script™ First strand synthesis	mRNA-cDNA sentezi	Wizbio	Güney Kore
RealAmp™SYBR qPCR master mix	mRNA ekspresyonu	Wizbio	Güney Kore

3.1.5.2 Hedef mRNA Primerleri

Macrogen firması (Güney Kore) tarafından sağlanan, üreticinin talimatlarına göre hazırlanan Blaimp gen ekspresyonunun tespiti için kullanılan spesifik primerler aşağıdaki Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6 *Blaimp* gen ekspresyonunun tespitinde kullanılan oligonükleotid primerleri dizisi (Goldsworthy 2008).

Primer adı	oryantasyon	Diziler (5́ -3́)	TA* °C	Amplikon Boyutu(bp.)
16SrRNA	**F**	GGTCTGTAACTGACTAGGCACAA	56	192
	R	GTGGACTACCAGGTTATCTAATCCT		
Blaimp	**F**	TCACTTGGTTTGTGGAGCGT	57	165
	R	TGGCTTGAACCTTACCGTCT		

TA* = Tavlama sıcaklığı

3.2 Metotlar

3.2.1 Tamponların, çözeltilerin, reaktiflerin ve boyaların hazırlanması

Tüm çözeltiler ve boyalar aşağıda ifade edildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.2.1.1 Tampon ve çözeltiler

Tüm tamponlar ve çözeltiler talimatlar izleyenerek hazırlandı.

- **Normal Salin çözeltisi**

Tarif edildiği gibi, otoklav ile sterilize edilmiş 1000 mL damıtılmış suda 8,5 g NaCl'nin çözülmesinde, bu çözeltinin 1000 mL'si kullanıldı. Bu çözelti, Broth kültürleri için bir seyrelticidir. (Sambrook and Russell 2001, Collee *et al.* 1996, MacFaddin 2000)

- **HCl çözeltisi**

Bu çözeltiyi yapmak için, 100 mL damıtılmış suda 8,6 mL konsantre HCl seyreltildi. Ortamın pH'ını ayarlamak için bu tampon kullanıldı. (Sambrook and Russell 2001, Collee *et al.* 1996, MacFaddin 2000)

- **NaOH çözeltisi**

Çözelti, 40 (Gr) NaOH'un 1L suda çözülmesi ve çalkalanmasıyla yapıldı. Bu tampon, daha önce kullanılan ortamın pH'ını ayarlamak için kullanıldı (Sambrook and Russell 2001, Collee *et al.* 1996, MacFaddin 2000)

- **McFarland tüpleri standart çözeltisi (0,5)**

Bu çözelti, Pseudomonas bakterilerinin duyarlılığının test edilmesinde kullanılmak üzere sülfürik asidin 0,05 mL (% 1) baryum klorür çözeltisi içinde çözülmesiyle hazırlandı (Sambrook and Russell 2001, Collee *et al.* 1996, MacFaddin 2000).

3.2.1.2 Boyalar

- **Gram boyama**

Gram boyama çözeltileri ile yapıldı (Cruickshank *et al.* 1975).

3.2.2 Kültür ve tanı ortamlarının hazırlanması

3.2.2.1 Hazır ortamlar

Nutrient agar kültür besiyeri (Çizelge 3.3 de verilmiştir), üreticinin talimatlarına göre hazırlanarak, otoklavda sterilize edildi.

3.2.3 Sterilizasyon metodu

- 121°C De ve 15 pound/inç2 basınçta 15 dakikalık bir otoklavlandı
- Yüksek sıcaklığa duyarlı solüsyonlar, Millipore filtreleri kullanılarak sterilize edildi (0,22l) (Cruickshank *et al.* 1975)
- Cam kaplar 180°C De 2 saat etüv kullanılarak kuru ısı ile sterilize edildi.

3.2.4 Vakalar

Musul şehrinde bulunan üç hastaneye (İbn Sina, Musul Genel ve Cumhuriyet Hastanesi) kış mevsiminde (2021 Kasım ile 2022 Nisan ayları arasında) başvuran ve klinik olarak

sepsis tanısı konulan her iki cinsiyetten toplam 80 hasta (erkek 40 ve kadın 40) ile çalışma yapıldı.

3.2.5 Örnek toplama

Tüm numuneler, taşıma besiyeri sürüntüleriyle veya yeterli miktarda beyin kalp infüzyon suyu (örn 5mL) eklenerek toplandı, daha sonra laboratuvara nakledildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi (Mims *et al.* 2018) .

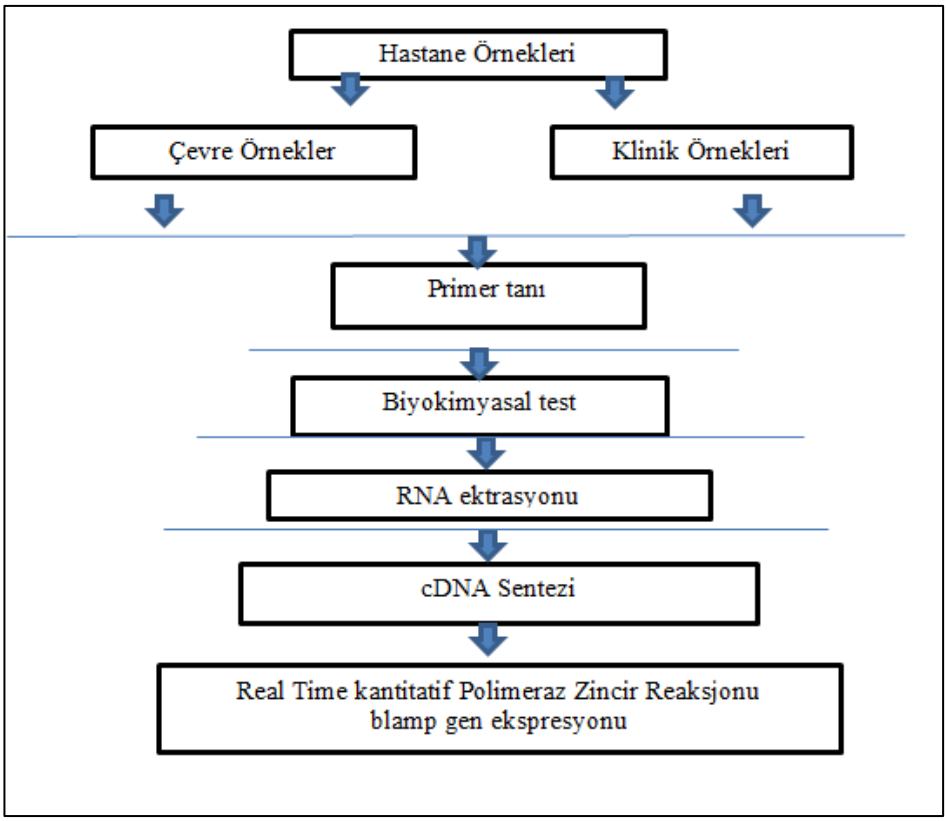
Diğer cihazlardan alınan numunelere gelince (Çizelge 3.7), bunlar normal bir tuzlu su çözeltisi ile nemlendirilmiş pamuklu çubuklarla alındı, ardından gerekli alan silindi, çubuk taşıma ortamına (beyin kalp agarı) yerleştirildi ve implante edilecek laboratuvara aktarıldı (Mims *et al.* 2018) .

Çizelge 3.7 Hastanede toplanan örneklerin dağılımı

No.	Klinik Örnekler
12	Nazal
21	Konjonktiva
19	Boğaz tamponları ve trakeal aspirat
15	Deri lezyonları ve yara enfeksiyonu
13	Yatak yarası sürüntüsü
45	Sıvı emici aletler
25	Vantilatörler
150	Total

3.2.6 Çalışma tasarımı

Çalışmanın amacına ulaşmak için, aşağıdaki gibi tasarlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *P. aeruginosa*'nın izolasyon ve tanımlanması proprosedürlerini gösteren şematik diyagram

3.2.7 *Pseudomonas* türleri'nin tanımlanması

3.2.7.1 Kültürel morfoloji

- **Besin suyu agarı**

Büyüyen koloniler pigmentlere ve koku üretimine (üzüm benzeri koku) göre tanımlandı (Cruickshank *et al*. 1975).

- **Kanlı agar**

P.aeruginosa bakterisi kanlı agar besiyerinde gri-siyah koloniler göstermiş, Mueller agar besiyerinde de yeşilimsi sarı renklenme göstermiş ve MacConkey agarda laktozu

fermente etmemiştir, gram boyama ile boyandığında gram negatif basil şeklindedir ve oksidaz testi için pozitif reaksiyon göstermiştir.

3.2.7.2 Mikroskobik inceleme

Pseudomonas izolatlarının mikroskobik incelemesi, Gram boyalı yayılımlarındaki görünümlerine göre gerçekleştirildi.

3.2.7.3 Biyokimyasal testler

MacFaddin (2000)'in tarif ettiği şekilde oksidaz testi yapılmıştır. Filtre kağıdına % 1 sulu tetrametil-para-fenilen diamin dihidroklorür çözeltisi uygulanmıştır. Bakteri kültürlerini filtre kağıdına yaymak için bir cam çubuk kullanılmıştır. Mor koyu rengin ortaya çıkması kültür oksidazın pozitif olduğunu göstermiştir.

- **Katalaz**

Hidrojen peroksit (%3 H_2O_2) kullanılarak hazırlanmış ve bakterilerin katalaz enzimi üretme yeteneklerinin saptanmasında kullanılmıştır.

3.2.8 Antimikrobiyal duyarlılık testi

Duyarlılık testi, *P.aeruginosa*.'nin yirmi bir izolatının fenotipik, biyokimyasal ve mikroskobik olarak tanımlanmasından sonra Mueller-Hinton agar üzerinde disk yayma yöntemiyle yapıldı (Bauer *et al.* 1966).

3.2.9 Bakteriyel inokulumun hazırlanması

- Beyin kalp infüzyon suyunun 5 cc'sinde üç ila beş izole koloni askıya alındı.
- 18-24 saat boyunca enfekte broth 37°C'de tutuldu.

- Gelişmekte olan broth kültürünün bulanıklığını 1,5x108 hücre/mL (0,5 McFarland standart tüp büyümesi) optik eşdeğerine ayarlamak için sterilize edilmiş broth kullanıldı.

3.2.10 Test plakalarının çizgilenmesi

- Pamuklu çubuk, saf bakteri kolonileri alınarak hazırlanan bakteri süspansiyonu içeren bir tüpe daldırıldı ve ardından iki saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
- Mueller-Hinton Agarının ortasından yüzeyine paralel çizgiler çekildi ve ardından çanak, tüm çanak tamamen emilene kadar 60 derecelik bir açıyla döndürüldü. Daha sonra tutarlı ve homojen bir dağılım elde etmek için kenarları silindi.
- Tabletler kullanılmadan önce petri kapları oda sıcaklığında 15-20 dakika kurumaya bırakıldı.

3.2.11 Disklerin uygulanması

- Alev ve soğutulmuş forseps kullanarak, materyale tam olarak yapışmalarını sağlamak için aşılanmış agar plakalarının üzerine antimikrobiyal diskler dikkatlice yerleştirildi.
- Şeffaf bir cetvel ile tabağın alt tarafından ölçülen inhibisyon bölgelerinin çapı kullanılarak, plakalar ters çevrildi ve gece boyunca inkübasyon için 37°C'de bir inkübatöre yerleştirildi (CLSI 2022).

3.3 Hedef Genler için Ekspresyon Çalışması

3.3.1 Messenger-RNA ekstraksiyonu

mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- $1x10^7$ kültür hücrelerine RiboEx uygulandı, pipet ile karıştırıldı ve çıkarılmadan önce oda sıcaklığında beş dakika inkübe edildi.

- Karışım 4°C'de 10 dakika 11,000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir tüpe döküldü ve istenildiği gibi yeniden işlendi.
- Bu noktada karışım karıştırılarak 2 dakika inkübe edildikten sonra 12,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
- 700 µL RB1 tamponu eklenip pipetaj ile karıştırıldıktan sonra 700 µL süspansiyon kolona aktarıldı.
- 10,000 rpm'de süpernatant 30 saniye santrifüj edildi. Kolonun yerine yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
- Kolon, 500 µL SW1 tamponu ile yüklendi ve yeni bir toplama tüpü yerleştirilmeden önce 10,000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi.
- Kolondan kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için bir dakika 10,000 rpm santrifüj kullanıldı. Yerine yeni bir kolon takıldı.
- Kolona RNaz içermeyen su ilave edildi ve oda sıcaklığında bir dakika inkübe edildi.
- Bir dakikalık 10,000 rpm santrifüj işlemi tamamlandı. Bozulmayı önlemek için mRNA numuneleri -80°C'de saklandı.

3.3.2 Hedef mRNA-cDNA sentezi

- **cDNA Synthesis**

RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi aşamasına geçildi. Gerekli bilgiler aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri

Bileşenleri	**Hacim (µL)**
10X Reaksiyon Tamponu	2
20X dNTP karışımı	1
Primerler (hekzamer)	2
RTaz	1
RNaz İnhibitörü	0,5
RNaz içermeyen Su	3,5
RNA Örneği	10
Toplam	20

cDNA üretmek için reaksiyon koşulları Çizelge 3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.9 mRNA-cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	Adım 1	**Adım 2**
Sıcaklık (°C)	55	85
Zaman (dakika)	60	5

3.3.3 Hedef gen ekspresyonunun amplifikasyon karışımı

Amplifikasyon karışımı Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10 Hedef gen ekspresyonunun amplifikasyon karışımı

Amplifikasyon karışımı bileşenleri	**Hacim (µL)**
2X Master karışım	10
ROX boya	1
Forward primer (10µM)	1
Reverse primer (10µM)	1
cDNA şablonu	4
RNaz içermeyen damıtılmış su	3
Toplam	20

3.3.4 Hedef mRNA ekpresyonu koşulları

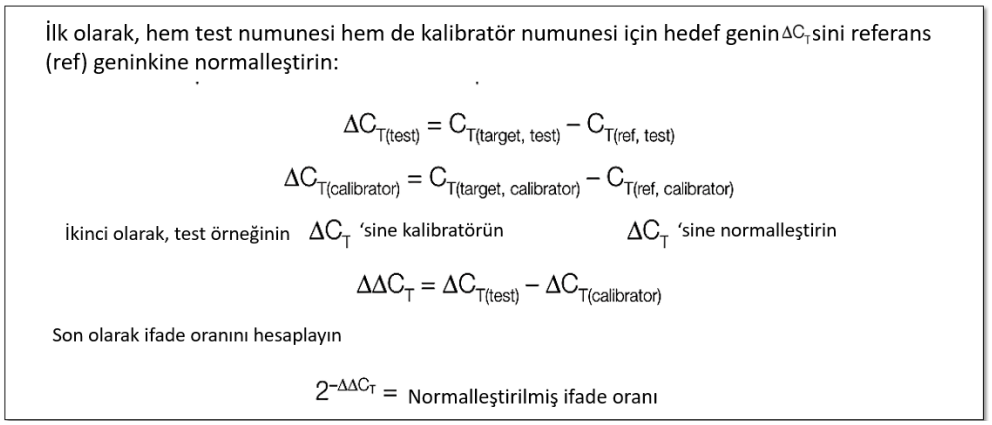
Reaksiyon parametreleri Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11 Real time qPCR hedef mRNA ekpresyonu

PCR Adımı	**Sıcaklık(°C)**	**Zaman(saniye)**	**Dönüş(no.)**
İlk denaturasyon	95	300	1
Denaturasyon	95	30	40
Sertleştirme	60	30	
Erime eğrisi	65-95	5	1

3.4 Gen ekspresyonunun sonuç analizi

Sonuç, veri analizi için Excel'e aktarıldı ve hücre canlılığının standart sapmasının belirlenmesi ile üç kopya gen ekspresyonunun ortalama ve standart hataları dahil edildi. Veriler, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olarak 0,01'e eşit bir Z değeri veren Ki-kare testi kullanılarak analiz edildi. Referans genleri normal faktör olarak kullanarak test ve kalibratör örneklerinde hedef genin nispi ekspresyonunu belirlemek için bilgisayarlı tomografi değerleri ölçüldükten sonra hem hedef hem de referans genlerin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR kullanılarak belirlendi. Test örneğindeki hedef genin ekspresyon düzeyini belirlemek için farklı yöntemler kullanılabilir. Kalibratör numunesi (normal) ile ilgili, Şekil 3.2'de olduğu gibi CT-2 yöntemi olarak da bilinen Levac yöntemi kullanılmıştır:



Şekil 3.2 Gen ifadesi sonuç analizi (Chang *et al.* 2010)

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *P. aeruginosa* nın klinik örneklerden izolasyonu ve çevresel örneklerden

Musul şehir hastanelerinden (İbn Sina Hastanesi, Musul General ve Al-Jamhuri Hastanesi) 80 klinik ve 70 kullanılan cihazlardan numune olmak üzere toplam 150 hastane numunesi alınmıştır. Klinik numuneler 40 erkek ve 40 kadın örnek olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Klinik numuneler boğaz sürüntüleri, trakeal aspirat, nazal, konjonktiva, deri lezyonları, yara enfeksiyonları ve yatak yarası sürüntülerinden toplanmıştır. Diğer bir grup kullanılan cihazlardan numuneler ise bu hastanelerdeki sıvı emiciler ve ventilatörlerden elde edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* için pozitif sonuç veren 21 örneğin dağılımı, 8'i klinik enfeksiyonlardan ve 13'ü de çevresel kaynaklardan izole edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Klinik ve çevresel örneklerden *P. aeruginosa* nın varlığına dair veriler

Örnekleme yeri ve dağlımı		**Örneklerin alındığı yer**		***P. aeruginosa* izole, bulunma yüzdesi**	**Klinik örneklerin sayı yüzde dağılımı**	
Yeri	**Sayısı**	**İnsan ya da nesne**	**Dağılımı**	**Tespit sayısı**	**Yeri**	**Sayı**
Klinik örnek	80	Erkek	40	3	Boğaz tamponları ve trakeal aspirat	2
					Nazal	1
					Konjonktiva	1
		Kadın	40	5	Deri lezyonları ve yara enfeksiyonu	1
					Yatak yarası sürüntüsü	3
Kullanılan cihazlar	70	Sıvı emici aletler	45	9		
		Vantilatörler	25	4		
Toplam	150		150	21		

Bu alanda tüm dünyada birçok çalışma yapılmıştır, bunlardan biri olan 58i'i klinik ve 20'si çevresel olmak üzere toplam 78 *Pseudomonas aeruginosa* hastane enfeksiyonu ile çalışan Levinson *et al*. (2020)'a ait olup, bu çalışma, bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Başka bir hastane enfeksiyonu çalışması Karami *et al.* (2019), toplam 110 örnekten 22'sinin *Pseudomonas aeruginosa* pozitif olduğunu göstermiş olup, bu çalışma da yapmış olduğumuz çalışmaya yakın sonuç vermiştir (Çizelge 4.1).

4.2 *P. aeruginosa* izolatları dışında saptanan diğer bakteriler

Musul şehir hastanelerinden toplanan 150 numunenin 42'si negatif, 108'i pozitif sonuç vermiştir. Bu 108 sonuç, 25'i *Staphylococus* spp., 12'si *Streptococcus* spp., 16'sı *E. coli*, 23'ü, *Klebsiella* spp., 21'i *Pseudomonas*, 5'i *Proteus* spp ve 6'sı *Micrococcus* spp olmak üzere Çizelge 4.2'de verildiği gibi dağılım göstermiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İzole edilen *P. aeruginosa* izolatları ile diğer bakteri örneklerinin dağılımı

Bakteri	**No**
Staphylococcus spp.	25
Streptococcus spp.	12
E. coli	16
Klebsiella spp.	23
P. aeruginosa	21
Proteus spp.	5
Micrococcus spp	6
	108

4.3 *P. aeruginosa*'nın Fenotipik Yapısı

P. aeruginosa bakterileri, kan agarları ortamında parlak gri renkte büyüme ve MacConkey ortamında soluk, fermente edilemeyen bir laktoz şekeri büyümesi gösterdi. bir gram lekesi ile lekelendiğinde gram negatif çubuklar şeklinde ortaya çıktı. Çözünür boyalar üretme yeteneğine sahip suda ve piyosiyaninde, sitokrom oksidaz zincirinden sorumlu bir protein üretme kabiliyetine ek olarak, bazen çiftler halinde ve bazen kısa zincirler halinde görülen, 1.5-3 µm genişliğinde, sporofit, zarfsız, çubuk şeklinde bir

aerobik bakteridir. Genellikle tek kamçıya, nadiren de olsa bir ucunda iki veya üçe sahiptirler, çok hareketlidirler ve kolayca yapışırlar. (Celedon ve Diaz 2021)

4.4 *P. aeruginosa*'nın Antibiyotik Duyarlılık testi

P. aeruginosa'nın 10 antibiyotike karşı antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır ve prosedüre uygun değerlendirme yapılmıştır. Levofloksasin e dirençli 1, İmipenem dirençli 2 izolat bulunmaktadır. Enyüksek direnç ise 19 izolatla Seftazidim antibiyotiği olmuştur. Seftazidim e duyarlı izolat ise hiç tespit edilmemiştir. Gentamisin antibiyotiği 17 izolatla en duyarlı olmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *P. aeruginosa*'nın antibiyotik duyarlılık testi profili

Dirençli izolatların sayısı	Orta duyarlıkta izolatların sayısı	Duyarlı izolatların sayısı	Antibiyotik
2	8	11	**İmipenem**
6	8	7	**Piperasilin**
7	2	12	**Norfloksasin**
1	7	13	**Levofloksasin**
3	16	2	**Amikasin**
19	2	0	**Seftazidim**
2	2	17	**Gentamisin**
7	3	11	**Tobramisin**
7	5	9	**Sefepim**
17	3	1	**Tetrasiklin**

Metallo-β-laktamaz (MBL) genlerinin varlığı, geniş spektrumlu β-laktam direnci sağlayabilen antibeta-laktamlara karşı dirençteki artışı önemli ölçüde artırır. Bu genler, tüm β-laktam sınıflarını bozabilen enzimleri kodlar, böylece aktiviteleri β-laktamaz inhibitörleri tarafından azaltılamaz. Bununla birlikte, MBL genleri genellikle aminoglikozit direnç genleriyle ilişkilidir (Walsh 2005)

Behzadi *et al.* (2022) tarafından 166 izolat üzerinde antibiyotik direnci ile biyofilm oluşturma yeteneği ve virülans faktörleri arasındaki olası ilişkiyi araştırmak için yapılan bir çalışmada, izolat sayısı bakımından antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri: siprofloksasin 78 izolat, levofloksasin 75 izolat, seftazidim 53 izolat, sefepim 50 izolat,

gentamisin 44 izolat, amikasin 34 izolat, meropenem 18 izolat, imipenem 16 izolat ve kolistin 1 izolat şeklinde tespit edilmiştir.

Liu *et al.* (2022), tarafından imipeneme duyarlılıklarını belirleme amacıyla 150 *P. aeruginosa* izolatı ile yapılan farklı bir araştırma, bunların %66,7'sinin imipeneme duyarsız olduğunu buna rağmen, %80'inin sefidrokol, seftazidim/avibaktam, seftolosan/tazobaktam ve amikasine duyarlı olduğunu gösterd.

Qin *et al.* (2022) tarafından yapılan araştırmaya göre, bakteriler, çeşitli çevresel uyaranlarla karşılaştıklarında antibiyotiklere direnci artırmak için kullandıkları, gen ve/veya protein ekspresyonundaki değişikliklerle adaptif direnç kazanırlar. *P. aeruginosa* da antibiyotiklere adaptif direnç elde etmek için en yaygın strateji olarak biyofilmler oluşturmaktır. Bu bakteriler patojeniteyi artırmak için biyofilmler üretebilir. Antibiyotiklerin yokluğunda bakteriler büyümeye devam eder ve kronik enfeksiyona neden olur (Sanz-García *et al.* 2022).

Antibiyotiklere karşı artan direnç kazanılması durumunda klinik olmayan ortamların patojenlerle kontaminasyonunun insan sağlığı üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir,. Bununla birlikte, çevresel kontaminasyonun bir sonucu olarak doğadaki ilaç konsantrasyonları genellikle minimum inhibitör konsantrasyonlarından daha düşük olduğundan, ilgili çoklu ilaca dirençli ve akış pompalarının etkinliğinin aracılık ettiği mutantların ortaya çıkmasına neden olduğundan, bu potansiyel risk genellikle göz ardı edilir (Sanz-García *et al.* 2022).

4.5 Kantitatif Gerçek Zamanlı-PCR

4.5.1 *Bla$_{imp}$* gen izolatları için moleküler tanımlama

Ters transkripsiyon-kantitatif PCR (RT-qPCR), SYBR GREEN (cDNA dahil olmak üzere herhangi bir çift sarmallı DNA'yı tanıyan bir floresan boya) boyası kullanılarak gerçekleştirildi. Impenem'in *P. aeruginosa*'da Blaimp geninin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla iki aşamalı bir RT-qPCR yöntemi uygulandı. Çalışmanın ilk adımı olarak, hedef gen ve housekeeper geni için spesifik primer kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi yapıldı, ekstraksiyon tamamlandıktan hemen sonra genomik RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi, cDNA sentezinin bir adımında RNA'da herhangi bir kayıp veya bozulma olmadan tam bir dönüşüm elde etmek için gerçekleştirildi. İkinci adım olarak, çalışılan bu genin Ct değeri aralığını ölçmek için kantitatif PCR (RT-qPCR) cihazı kullanıldı (Schmittgen ve Livak 2008)..

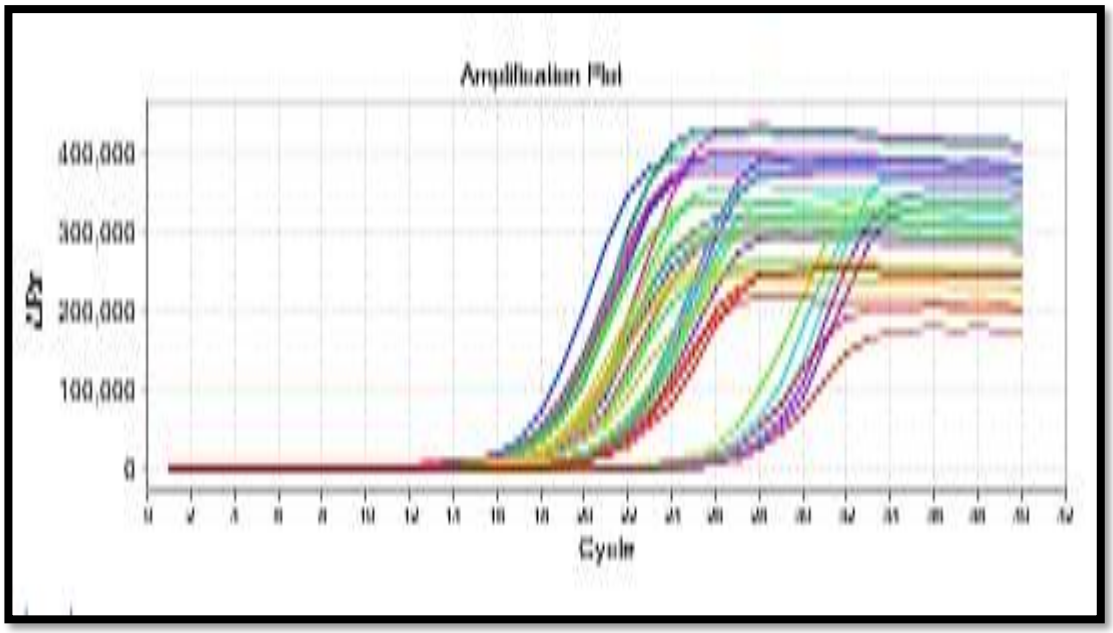
Deney, her numune üzerinde toplam dört kez yapıldı ve her numune için verilen gen ifadesinin miktarı, bu dört ölçümün ortalaması alınarak belirlendi. Ct, numunenin Ct'si referans genin Ct'sinden düşülerek hesaplandı. Bu, gen ekspresyonunun seviyesini belirlemek için yapıldı. Karşılaştırmalı Ct değeri, çeşitli örneklerdeki gen ifadesini karşılaştırmak için altın denklem yaklaşımı olarak adlandırılan bir metodoloji olan Schmittgen ve Livak (2008)'nin Kat Değişimi = $2^{-\Delta\Delta ct}$ yöntemi olarak da bilinir. Bu yöntem, bağıl gen ekspresyonu verilerine dayanmaktadır. Hem tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen vakalarda, her numune bir kontrol geni ile ilişkilendirildi. Bu, gözlemlenen farklılıkların hedef genin ifadesindeki değişimlere atfedilebileceğini garanti etmek için yapıldı (Schmittgen ve Livak 2008).

4.5.2 Çoklu eğri sonuçları

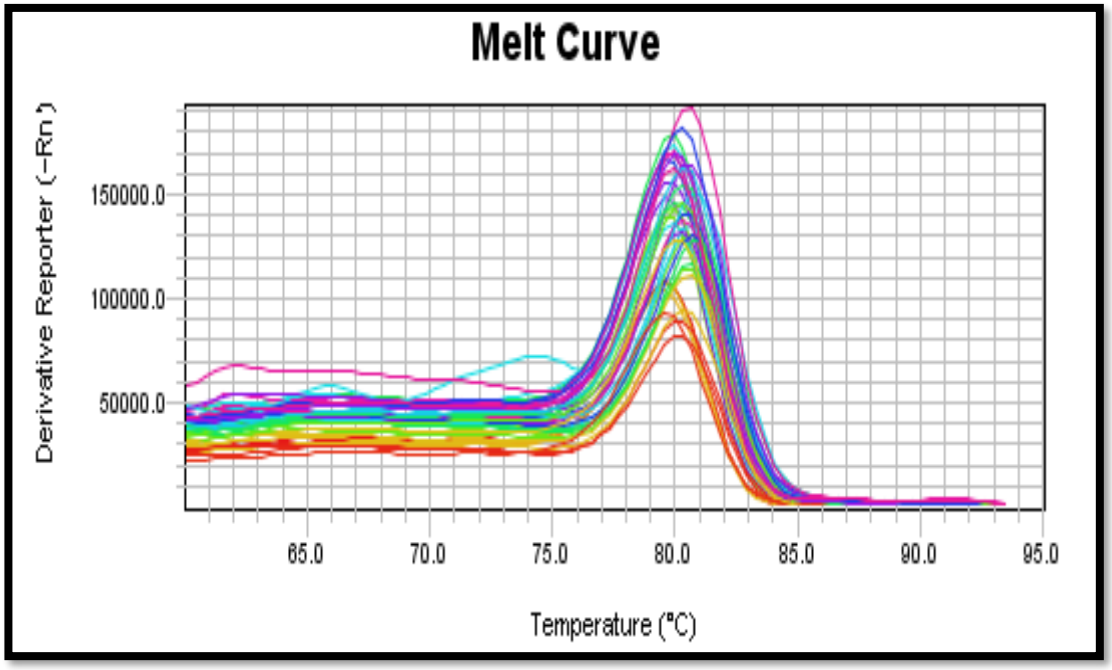
Amplifikasyonun geçerliliği, şablon (cDNA) 89 °C ile 72 °C arasındaki bir sıcaklıkta primer ile bağlandığında incelendi. Bir ikili DNA ipliği oluştu ve bu ikinci iplikçik, çift bant ile SYBR GREEN boyasını bağladı. Bağlandıklarında floresan ışıdılar ve cihaz

floresan sinyalini okudu ve bunu bir koda dönüştürdü (amplifikasyon). Bu, genin gerçek bir amplifikasyonunun kanıtıdır çünkü kullanılan polimeraz enzimi (DNAPOL) 72 °C sıcaklıkta çalışır Şekil 4.1.

Ama 60-70 °C sıcaklık arasında bir amplifikasyon varsa, bu hayali amplifikasyonun varlığının kanıtıdır, yani bir primer başka bir primer ile ilişkilendirilmiştir ve bir dimer oluşmuştur. Bu da kontaminasyonun varlığının ve tasarlanan primerin, tasarım sırasında amplifikasyon ürünü tarafından belirlendiğinin kanıtıdır Şekil 4.2.



Şekil 4.1 *P. aeruginosa*'da *Blaimp* geninin amplifikasyon eğrisi. (21 izolatta farklı gen ekspresyon değerleri ortaya çıkmıştır)



Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'da *Blaimp* geninin erime eğrisi

4.6 Gen Ekspresyon Analizi (Blaimp Geni)

Blaimp geni, antibiyotiklere direnç ile bağlantılı önemli genlerden biridir çünkü bu gen, toplumda ve hastanelerde tedavi olarak onaylanan çok çeşitli antibiyotiğe direnç gösteren bir enzimin üretimini kodlar. İlerlemiş hastalık ve cerrahi vakalarda bu direnç ortaya çıkarsa, bu, bakteri hücre duvarına etki ettikleri için kullanımı güvenli kabul edilen penisilinler ve sefalosporinler dahil olmak üzere B-laktam antibiyotikler gibi birçok antibiyotiğe direnç olduğu anlamına gelir. Bu durum, karbapenem ve diğer B-laktam antagonistlerine karşı antibiyotik direncinden sorumlu enzimin aktivitesinin varlığını tespit etmede Blaimp geninin rolüne işaret eder (Iwata *et al.* 2020).

Sonuçlar, antijen için sekiz izolatla ortalama bir sınıfın varlığını gösterdi ve bu, antijen imipenem'e dirençten sorumlu enzim ile Blaimp geninin aktivitesine karşılık gelmektedir (1.34, 0.1307, 0.1171, 1.4345, 0.18725, 0.981366, 1.8343, 0.5320) Çizelge 4.4 . Bu sekiz izolat P <0.01'de anlamlı değildi ve bu da izolatların teoride antibiyotiklere direnç göstermediğine işaret etmiştir. Son olarak, Blaimp geninin son iki izolattaki aktivitesi 0.124149 ve 0.048616 olarak belirlendi ve bu da yeterli dirençli enzim üretiminin

olmaması nedeniyle izolatların antijen imipeneme duyarlılığını sağladı (Segawa *et al.* 2013).

Sıvı aspirasyon cihazı, antibiyotiğe dirençli bakterilerle enfekte olmuş önceki hastalardan alınan sıvıları içermesi nedeniyle imipeneme dirençli bakteriyel izolatların sürekli büyümesi için uygun bir ortam oluşturur (Al-Marjani *et al.* 2010). Bu nedenle, sıvı aspirasyon tüpünü değiştirerek aynı cihazın kullanılması, bu bakterilerin imipeneme karşı yüksek direnç gibi bir yeteneği olmayan yeni hastalara bakteri bulaşmasına sebep olacaktır ve bu nedenle cihaz, hastanelerde kullanım sırasında hastalar arasında enfeksiyon bulaşması için bir araç haline gelebilir ve bu, yüksek dirençli izolatların antibiyotiklere ve hastane topluluğuna yayılmasına neden olur (Elsayeir 2018).

Çizelge 4.4 İmepenem Direnci ve bla_{imp} Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki

No	**İzolasyon yeri**	**Antibiyotik Duyarlılık testi***	***Blaimp* gen ifadesi**	
			Blaimp gen	16S rRNA gen
1	Sıvı emici aletler	R	6.995424	1
2	trakeal aspirat	R	2.876179	1
3	Vantilatörler	M	1.340951	1
4	Boğaz tamponları	M	0.130724	1
5	Boğaz tamponları	M	0.117121	1
6	Sıvı emici aletler	M	1.434595	1
7	Yatak yarası sürüntüsü	M	0.187257	1
8	yara enfeksiyonu	M	0.981362	1
9	Sıvı emici aletler	M	1.834312	1
10	Deri lezyonları	M	0.532052	1
11	Sıvı emici aletler	S	1.627259	1
12	Nazal	S	0.261773	1
13	Konjonktiva	S	0.124159	1
14	Boğaz tamponları	S	0.048616	1

*R; Resistance (Dirençli) M; Moderate (Orta) S; Senstitive (Hassas) 16S rRNA gen; Referans genler veya bir diğer adı ile Housekeeping genler (HKGs); hücrelerin fonksiyonel rollerinden bağımsız olarak, bir hücrenin varlığı için gerekli olan genlerdir.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Hastaneler ve sağlık tesisleri, çok sayıda patojenik *Pseudomonas aeruginosa* suşu için rezervuar olarak kanıtlanmıştır ve birçok antibiyotik sınıfına karşı içsel direnç mekanizmasının varlığının yanı sıra ilgili tüm tedavilere karşı direnç kazanma yeteneği nedeniyle önemli bir nozokomiyal patojen olduğu anlaşılmıştır. Çok ilaca direnç (MDR) yaygınlaşmakta ve artmaktadır. MDR suşlarının klinik bakım ortamlarında ortaya çıkması bu ilaca dirençli suşların esasen tüm güvenilir antipsödomonal antibiyotiklere direnç göstermesi nedeniyle tedavi edilmelerini zor ve pahalı hale getirmektedir.

İlaç direncinin paternini ve arkasındaki mekanizmayı anlamak da önemlidir. Mikropların başta yatay gen transferi ve biyofilm oluşumu olmak üzere antibiyotik ilaç direnci elde etmek için çeşitli mekanizmalar kullandıklarına dair artan bilimsel kanıtlar vardır.

Antibiyotik direnci gösteren *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları için mevcut klinik çözüm, teşhise dayalı kesin bir tanı ve kombine antibiyotik tedavisi gerektirir. Tekrarlayan birkaç enfeksiyon, antibiyotik direncinin çoğalmasını durdurmak için ek bakıma ihtiyaç duyar. *Pseudomonas aeruginosa* çevredeki ortamı kontamine eder. Bu mikroplar tam olarak antibiyotiğe dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'dır ve daha birçokları patojenik olmayan mikroplara gen transferi için potansiyel bir kaynaktır. MDR gelişimi dolayısıyla risk faktörlerini belirlemek ve ayrıca ilaca dirençli *P. aeruginosa*'ya bağlı ciddi enfeksiyonların başarılı şekilde tedavi edilebilmesi için en etkili antimikrobiyal tedavilere ve tedavi süresini belirlemek için klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.2 Öneriler

Hastanelerde görev yapan tüm sağlık personelinin ve hastanede kaldıkları süre boyunca hastalara refakat edenlerin, kişisel hijyenine dikkat etmesi oldukça önemlidir. Özellikle,

bakterilerin direnemeyeceği sterilizasyon yöntemleri ve sterilizasyon malzemelerin kullanılması tavsiye edilir.

Antibiyotik direncinin yayılmasına neden olabilecek reçetesiz satılan antibiyotiklerin gelişi güzel kullanımının azaltılması halk sağlığı açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca, hastane enfeksiyonlarının yayılmasını önlemek için hastanelerin kapsamlı biçimde günlük temizliğinin yapılması, Dünya Sağlık Örgütü'nün belirttiği küresel önlem protokollerinin kati şekilde uygulanması ve gereken tedbirlerin alınması, yapılması gerekenlerin başında gelir.

KAYNAKLAR

Abdel-Hadi, A., Carter, D., and Magan, N. 2011. Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic Aspergillus section Flavi strains from Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques. World Mycotoxin Journal, 4(1): 69-77.

Adley, C. C., and Ryan, M. P. 2016. The nature and extent of foodborne disease. In Antimicrobial food packaging (pp. 1-10). Academic Press.

Adrie, C., Garrouste-Orgeas, M., Essaied, W. I., Schwebel, C., Darmon, M., Mourvillier, B., and Deiler, V. 2017. Attributable mortality of ICU-acquired bloodstream infections: impact of the source, causative micro-organism, resistance profile and antimicrobial therapy. Journal of Infection, 74(2): 131-141.

Al-Abodi, H. R. J. 2018 . Suspicion in the form of infection is the basis for selecting the appropriate method for examining the toxoplasmosis disease of bends that have no symptoms from patients. Int. J. Adv. Res, 6(9): 655-662.

Alegre-Díaz, J., Herrington, W., López-Cervantes, M., Gnatiuc, L., Ramirez, R., Hill, M., and Emberson, J. R. 2016. Diabetes and cause-specific mortality in Mexico City. New England Journal of Medicine, 375(20): 1961-1971.

Al-Marjani, M. F., Khalil, M. A., Jazar, Z. H., and Hassen, Z. N. 2010. Detection of Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates producing IMP-1 Metallo-ß-Lactamase in some Baghdad hospitals. Tikrit Journal of Pure Science, 15(1).

Alp, E., and Damani, N. 2015. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. Journal of Infection in Developing Countries, 9(10).

Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Hancock, R. E., and Martínez, J. L. 2011. The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to β-lactams. Virulence, 2(2): 144-146.

American Diabetes Association 2020. 15. Diabetes care in the hospital: standards of medical care in diabetes-2020. Diabetes Care, 43(1): S193-S202.

Andersson, D. I., and Hughes, D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resistance Updates, 15(3): 162-172.

Arega, B., Wolde-Amanuel, Y., Adane, K., Belay, E., Abubeker, A., and Asrat, D. 2017. Rare bacterial isolates causing bloodstream infections in Ethiopian patients with cancer. Infectious Agents and Cancer, 12(1): 1-6.

Azoulay, E., Schellongowski, P., Darmon, M., Bauer, P. R., Benoit, D., Depuydt, P., and Soares, M. 2017. The Intensive Care Medicine research agenda on critically ill oncology and hematology patients. Intensive Care Medicine, 43(9): 1366-1382.

Babcock, H. M., Zack, J. E., Garrison, T., Trovillion, E., Kollef, M. H., and Fraser, V. J. 2003. Ventilator-associated pneumonia in a multi-hospital system differences in microbiology by location. Infection Control and Hospital Epidemiology, 24(11): 853-858.

Bahrani-Mougeot, F. K., Paster, B. J., Coleman, S., Barbuto, S., Brennan, M. T., Noll, J., and Lockhart, P. B. 2007. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. Journal of Clinical Microbiology, 45(5): 1588-1593.

Baranoski, S., and Ayello, E. A. 2008. Wound care essentials: Practice principles. Lippincott Williams and Wilkins, 1(9).

Bassetti, M., Nicolini, L., Esposito, S., Righi, E., and Viscoli, C. 2009. Current status of newer carbapenems. Current Medicinal Chemistry, 16(5): 564-575.

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., and Guery, B. 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs in Context, 7.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., and Sheris, J. C. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol, 45: 493–496.

Behzadi, P., Gajdács, M., Pallós, P., Ónodi, B., Stájer, A., Matusovits, D., and Donadu, M. G. 2022 . Relationship between Biofilm-Formation, Phenotypic Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Environmental Pseudomonas aeruginosa. Pathogens, 11(9): 1015.

Benkő, R., Gajdács, M., Matuz, M., Bodó, G., Lázár, A., Hajdú, E., and Pető, Z. 2020. Prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in hungary: a 5-year retrospective survey. Antibiotics, 9(9): 624.

Bergey, D. H. 2001. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Vol. 2). Springer Science & Business Media, 13(7): 667.

Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., and Plésiat, P. 2015. Mutations in β-lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(10): 6248-6255.

Black, A. D. 2016. Non-infectious mimics of community-acquired pneumonia. Pneumonia, 8(1): 1-5.

Boev, C., and Kiss, E. 2017. Hospital-acquired infections: current trends and prevention. Critical Care Nursing Clinics, 29(1): 51-65.

Bookout, A. L., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., Pesola, J. M., and Kramer, M. F. 2006 . High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. Current Protocols in Molecular Biology, 73(1): 15-8.

Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., and Bartlett, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases, 48(1): 1-12.

Bradford, P. A., Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Wise, M. G., Hackel, M., and Sahm, D. F. 2015. Correlation of β-lactamase production and colistin resistance among Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(3): 1385-1392.

Bucior, I., Pielage, J. F., and Engel, J. N. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. PLoS Pathogens, 8(4): e1002616.

Burri, R., and Stutzer, A. 1895. Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Abt II, 1: 257-265.

Bush, K., and Bradford, P. A. 2016. β-Lactams and β-lactamase inhibitors: an overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6(8): a025247.

Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25(2): 169-193.

Carvalho, A. S., Lagana, D., Catford, J., Shaw, D., and Bak, N. 2020. Bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies. Infection, Disease and Health, 25(1): 22-29.

CDC 2021. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, 5(8): 65-764.

Chamon, R. C., da Rocha, J. A., Martins, I. A., Pires, L. L., de Almeida, B. M., Leite, N. S., and Martins, I. S. 2020. KPC-2 producing Pseudomonas putida as an unexpected pathogen of catheter-associated bloodstream infection. The Journal of Infection in Developing Countries, 14(04): 411-414.

Chang, K. H., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Kerin, M. J., and Miller, N. 2010 . MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. BMC Cancer, 10(1): 1-13.

Chao, Z., Xiao-Feng, W., Dan-Hong, S., Jin-Ping, Y., and Nan-Shan, Z. 2008. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-9-type metallo-beta-lactamase in Guangzhou, China. International Journal of Antimicrobial Agents, 32(4): 363-365.

Chen, J., and Novick, R. P. 2009. Phage-mediated Intergeneric Transfer of Toxin Genes. Science, 323(5910): 139-141.

CLSI 2022. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29thedn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: CSLI Supplement M100.

Collee, J. G., Fraser, A. G., and Marmion, B. P.1996. Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone, USA. P. 973.

Cornaglia, G., Giamarellou, H., and Rossolini, G. M. 2011. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams?. The Lancet Infectious Diseases, 11(5): 381-393.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., and Marmion, B. P. 1975. Medical Microbiology. 12th ed. Churchill Livingstone, England.P. 587.

Curran, C. S., Bolig, T., & Torabi-Parizi, P. 2018. Mechanisms and targeted therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 197(6): 708-727.

Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St. John, J. A., Ekberg, J. A., & Beacham, I. R. 2014. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. Clinical Microbiology Reviews, 27(4): 691-726.

Davis, L. E. 2018. Acute bacterial meningitis. Continuum: Lifelong Learning in Neurology, 24(5): 1264-1283.

Dehbashi, S., Tahmasebi, H., Alikhani, M. Y., Keramat, F., & Arabestani, M. R. 2020. Distribution of Class B and Class A β-lactamases in clinical strains of *Pseudomonas*

aeruginosa: comparison of phenotypic methods and high-resolution melting analysis (HRMA) assay. Infection and Drug Resistance, 13: 2037.63.

Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Prescott, H. C., Martinez, F. J., Curtis, J. L., Lama, V. N., & Huffnagle, G. B. 2014. Analysis of culture-dependent versus culture-independent techniques for identification of bacteria in clinically obtained bronchoalveolar lavage fluid. Journal of Clinical Microbiology, 52(10): 3605-3613.

Doroszkiewicz, H., Sierakowska, M., & Muszalik, M. 2018. Utility of the Care Dependency Scale in predicting care needs and health risks of elderly patients admitted to a geriatric unit: a cross-sectional study of 200 consecutive patients. Clinical Interventions in Aging, 13: 887.

Dowling, D. J., & Levy, O. 2014. Ontogeny of early life immunity. Trends in Immunology, 35(7): 299-310.

Dupont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. 1995. The infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy volunteers. New England Journal of Medicine, 332(13): 855-859.

Eftekhar, F., & Naseh, Z. 2015. Extended-spectrum β-lactamase and carbapenemase production among burn and non-burn clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Iranian Journal of Microbiology, 7(3): 144.

Elsayeir, A. H. E. 2018. Phenotypic Detection of Antibiotic Resistant among Urinary Tract Infections Isolates in National Public Health Laboratory (Doctoral dissertation, Hadia Abass Eltaib).

Elsner, H. A., Sobottka, I., Mack, D., Laufs, R., Claussen, M., & Wirth, R. 2000. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 19(1): 39-42.

European Centre for Disease Prevention and Control. 2019. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. ECDC Annual Epidemiological Report for 2017.

Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., & Fischer, F. 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology, 18(5): 459-480.

Fernández-Sabé, N., Carratalà, J., Rosón, B., Dorca, J., Verdaguer, R., Manresa, F., & Gudiol, F. 2003. Community-acquired pneumonia in very elderly patients: causative organisms, clinical characteristics, and outcomes. Medicine, 82(3): 159-169.

Flores-Mireles, A., Hreha, T. N., & Hunstad, D. A. 2019. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation, 25(3): 228-240.

Fouzia, N., Amir Afzal, K., Sana, R., & Rabaab, Z. 2013. Prevalence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multi-drug resistant bacteria at two Pakistani hospitals and implications for public health.

Frère, J. M., Joris, B., & Shockman, G. D. 1984. Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. CRC Critical Reviews in Microbiology, 11(4): 299-396.

Gahlot, A., Kumar, S., & Som Nath, M. P. 2015. ARI in Underfive Children with Associated Risk Factors, 1 (2): 323-396.

Gandon, S., & Vale, P. F. 2014. The evolution of resistance against good and bad infections. Journal of Evolutionary Biology, 27(2): 303-312.

Gonzales, P. R., Pesesky, M. W., Bouley, R., Ballard, A., Biddy, B. A., Suckow, M. A., & Dantas, G. 2015. Synergistic, collaterally sensitive β-lactam combinations suppress resistance in MRSA. Nature Chemical Biology, 11(11): 855-861.

Harrison, D. C., Medhurst, A. D., Bond, B. C., Campbell, C. A., Davis, R. P., & Philpott, K. L. 2000 . The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia—caspase-3 as a case study. Molecular Brain Research, 75(1): 143-149.

Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., & McColley, S. A. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clinical Microbiology Reviews, 24(1): 29-70.

Heirali, A., McKeon, S., Purighalla, S., Storey, D. G., Rossi, L., Costilhes, G., & Parkins, M. D. 2016. Assessment of the microbial constituents of the home environment of individuals with cystic fibrosis (CF) and their association with lower airways infections. PLoS One, 11(2): e0148534.

Heredia, N., & García, S. 2018. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. Animal Nutrition, 4(3): 250-255.

Hong, D. J., Bae, I. K., Jang, I. H., Jeong, S. H., Kang, H. K., & Lee, K. 2015. Epidemiology and characteristics of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infection & Chemotherapy, 47(2): 81-97.

Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry 3rd, C. E., & Blanchard, J. S. 2009. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Science, 323(5918): 1215-1218.

Hwang, W., & Yoon, S. S. 2019. Virulence characteristics and an action mode of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, 9(1): 1-15.

Igbinosa, I. H., Nwodo, U. U., Sosa, A., Tom, M., & Okoh, A. I. 2012. Commensal Pseudomonas species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. International Journal of Environmental Research and Public Health, 9(7): 2537-2549.

Iwata, S., Tada, T., Hishinuma, T., Tohya, M., Oshiro, S., Kuwahara-Arai, K., & Kirikae, T. 2020. Emergence of carbapenem-resistant Providencia rettgeri and Providencia stuartii producing IMP-type metallo-β-lactamase in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(11): e00382-20.

Jacoby, G. A., Sutton, L., Knobel, L. A. U. R. A., & Mammen, P. A. T. R. I. C. I. A. 1983. Properties of IncP-2 plasmids of Pseudomonas spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 24(2): 168-175.

Jajoo, M., Manchanda, V., Chaurasia, S., Sankar, M. J., Gautam, H., Agarwal, R., & Investigators of the De lhi N eonatal I nfection S tudy (DeNIS) collaboration, New Delhi, India. 2018. Alarming rates of antimicrobial resistance and fungal sepsis in outborn neonates in North India. PLoS One, 13(6): e0180705.

Janvier, F., Otto, M. P., Jové, T., Mille, A., Contargyris, C., Meaudre, E., & Jeannot, K. 2017. A case of multiple contamination with methylase ArmA-producing pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(2): 618-620.

Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., & Car, J. 2017. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. Systematic Reviews, 6(1): 1-7.

Jia, H., Li, L., Li, W., Hou, T., Ma, H., Yang, Y., & Chen, M. 2019. Impact of healthcare-associated infections on length of stay: a study in 68 hospitals in China. BioMed Research International, 3(1): 2-9.

Juhas, M. 2015. Horizontal gene transfer in human pathogens. Critical Reviews in Microbiology, 41(1): 101-108.

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Journal of anaesthesiology, Clinical Pharmacology, 33(3): 300.

Karami, P., Mohajeri, P., Mashouf, R. Y., Karami, M., Yaghoobi, M. H., Dastan, D., & Alikhani, M. Y. 2019. Molecular characterization of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(7): 1731-1736.

Kingston, L., O'Connell, N. H., & Dunne, C. P. 2016. Hand hygiene-related clinical trials reported since 2010: a systematic review. Journal of Hospital Infection, 92(4): 309-320.

Kitagawa, K., Shigemura, K., Yamamichi, F., Osawa, K., Uda, A., Koike, C., & Fujisawa, M. 2019. Bacteremia complicating urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa*: Mortality risk factors. International Journal of Urology, 26(3): 358-362.

Kollef, M. H., & Burnham, C. A. D. 2017. Ventilator-associated pneumonia: the role of emerging diagnostic technologies. In Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers, 38(3): 253-263.

Kollef, M. H., Chastre, J., Fagon, J. Y., François, B., Niederman, M. S., Rello, J., & Rehm, C. 2014. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Critical Care Medicine, 42(10): 2178-2187.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3): 95-125.

Kumar, R. R., Goswami, S., & Praveen, S. 2019. Quantitative Real-Time PCR for Analysing the Expression of. Omics meet Plant Biochemistry: Applications in Nutritional Enhancement with One Health Perspective, 221.

Kyi, M., Colman, P. G., Wraight, P. R., Reid, J., Gorelik, A., Galligan, A., & Fourlanos, S. 2019. Early intervention for diabetes in medical and surgical inpatients decreases hyperglycemia and hospital-acquired infections: a cluster randomized trial. Diabetes Care, 42(5): 832-840.

Lakoh, S., Yi, L., Sevalie, S., Guo, X., Adekanmbi, O., Smalle, I. O., & Firima, E. 2022. Incidence and risk factors of surgical site infections and related antibiotic resistance in Freetown, Sierra Leone: a prospective cohort study. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 11(1): 1-12.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. 2006. Biology of Pseudomonas stutzeri. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(2): 510-547.

Langan, K. M., Kotsimbos, T., & Peleg, A. Y. 2015. Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. Current Opinion in Infectious Diseases, 28(6): 547-556.

Langendonk, R. F., Neill, D. R., & Fothergill, J. L. 2021. The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11: 307.

Lau, G. W., Hassett, D. J., & Britigan, B. E. 2005. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. Trends in Microbiology, 13(8): 389-397.

Levinson, W. 2018. Review of medical microbiology and immunology. McGraw Hill Professional, 4(1): 2-7.

Levinson, W., Chin-Hong, P., Joyce, E. A., Nussbaum, J., & Schwartz, B. 2020. Overview of immunity. Review of medical microbiology & immunology: Guide to Clinical Infectious Diseases. 16th ed. New York: McGraw-Hill.

Leylabadlo, H. E., Kafil, H. S., Yousefi, M., Aghazadeh, M., & Asgharzadeh, M. 2016. Persistent infection with metallo-beta-lactamase and extended spectrum β-lactamase producer Morganella morganii in a patient with urinary tract infection

after kidney transplantation. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, 7(2): 179.

Liu, P. Y., Ko, W. C., Lee, W. S., Lu, P. L., Chen, Y. H., Cheng, S. H., ... & Hsueh, P. R. (2022). In vitro activity of cefiderocol, cefepime/enmetazobactam, cefepime/zidebactam, eravacycline, omadacycline, and other comparative agents against carbapenem-non-susceptible Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolates associated from bloodstream infection in Taiwan between 2018–2020. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 55(5): 888-895.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2018. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Methods, 25(4): 402-408.

Loebinger, M. R., Wells, A. U., Hansell, D. M., Chinyanganya, N., Devaraj, A., Meister, M., & Wilson, R. 2009. Mortality in bronchiectasis: a long-term study assessing the factors influencing survival. European Respiratory Journal, 34(4): 843-849.

López-Causapé, C., Cabot, G., del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. 2018. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, 9: 685.

Lu, J., Wang, Y., Jin, M., Yuan, Z., Bond, P., & Guo, J. 2020. Both silver ions and silver nanoparticles facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes. Water Research, 169: 115229.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA, 9(1): 1-7.

Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., & Fridkin, S. K. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. New England Journal of Medicine, 370(13): 1198-1208.

Magill, S. S., Hellinger, W., Cohen, J., Kay, R., Bailey, C., Boland, B., & Fridkin, S. 2012. Prevalence of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Jacksonville, Florida. Infection Control & Hospital Epidemiology, 33(3): 283-291.

Magill, S. S., O'Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyati, G., Nadle, J., & Edwards, J. R. 2018. Changes in prevalence of health care–associated infections in US hospitals. New England Journal of Medicine., 379(18): 1732-1744.

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. 2021. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. Pathogens, 10(10): 1310.

Mandell, L. 2009. Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection. Clinical Infectious Diseases., 49(1): S1-S3.

Massart, N., Mansour, A., Ross, J. T., Piau, C., Verhoye, J. P., Tattevin, P., & Nesseler, N. 2020. Mortality due to hospital-acquired infection after cardiac surgery. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.

Metersky, M. L., & Kalil, A. C. 2017. New guidelines for nosocomial pneumonia. Current Opinion in Pulmonary Medicine, 23(3): 211-217..

Micek, S. T., Kollef, M. H., Torres, A., Chen, C., Rello, J., Chastre, J., & Menon, V. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of pneumonia classification. Infection Control & Hospital Epidemiology, 36(10): 1190-1197.

Miller, S. I. 2016. Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. MBio, 7(5): e01541-16.

Millett, E. R., Quint, J. K., Smeeth, L., Daniel, R. M., & Thomas, S. L. 2013. Incidence of community-acquired lower respiratory tract infections and pneumonia among older adults in the United Kingdom: a population-based study. PloS One, 8(9): e75131.

Mims, C., Goering, R. V., & Dockrell, H. M. 2018. Mims Medical Microbiology. 4th ed. Elsevier Mosby, USA.

Mogayzel Jr, P. J., Naureckas, E. T., Robinson, K. A., Brady, C., Guill, M., Lahiri, T., & Marshall, B. C. 2014. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. Pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. Annals of The American Thoracic Society, 11(10): 1640-1650.

Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., & Ramos, J. L. 2014. Antibiotic resistance determinants in a Pseudomonas putida strain isolated from a hospital. PloS One, 9(1): e81604.

Murphy, C. N., Fowler, R., Balada-Llasat, J. M., Carroll, A., Stone, H., Akerele, O., & Bourzac, K. M. 2020. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray pneumonia/pneumonia plus panel for detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection. Journal of Clinical Microbiology, 58(7): e00128-20.

Negi, Y. K., Prabha, D., Garg, S. K., & Kumar, J. 2011. Genetic diversity among cold-tolerant fluorescent Pseudomonas isolates from Indian Himalayas and their characterization for biocontrol and plant growth-promoting activities. Journal of Plant Growth Regulation, 30(2): 128-143.

Norbury, W., Herndon, D. N., Tanksley, J., Jeschke, M. G., & Finnerty, C. C. 2016. Society SSCotSI. Infection in burns. Surg Infect (Larchmt), 17(2): 250-255.

Nussbaum, S. R., Carter, M. J., Fife, C. E., DaVanzo, J., Haught, R., Nusgart, M., & Cartwright, D. 2018. An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. Value in Health, 21(1): 27-32.

Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., & DuPont, H. L. 1999. Virulence of three distinct Cryptospovidium parvum isolates for healthy adults. The Journal of Infectious Diseases, 180(4): 1275-1281.

Oliver, A., Levin, B. R., Juan, C., Baquero, F., & Blázquez, J. 2004. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(11): 4226-4233.

Ontong, J. C., Ozioma, N. F., Voravuthikunchai, S. P., & Chusri, S. 2021. Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomycin, and piperacillin on multidrug resistant Klebsiella pneumoniae isolates. Plos one, 16(1): e0244673.

Origüen, J., Fernández-Ruiz, M., López-Medrano, F., Ruiz-Merlo, T., González, E., Morales, J. M., & Aguado, J. M. 2016. Progressive increase of resistance in Enterobacteriaceae urinary isolates from kidney transplant recipients over the past decade: narrowing of the therapeutic options. Transplant Infectious Disease, 18(4): 575-584.

Ortega, Y. R., & Adam, R. D. 1997. Giardia: overview and update. Clinical Infectious Diseases, 25(3): 545-549.

Pachori, P., Gothalwal, R., & Gandhi, P. 2019. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes & Diseases, 6(2): 109-119.

Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L., Dinkelacker, A., Vogel, W., Dörfel, D., & Willmann, M. 2017. Genomic characterisation of clinical and environmental

Pseudomonas putida group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Genomics, 18(1): 1-11.

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., ... & Wu, M. (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1): 1-27.

Raza, S. S., Sultan, O. W., & Sohail, M. R. 2010. Gram-negative bacterial endocarditis in adults: state-of-the-heart. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 8(8): 879-885.

Recio, R., Mancheño, M., Viedma, E., Villa, J., Orellana, M. Á., Lora-Tamayo, J., & Chaves, F. 2020. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(2): e01759-19.

Reynolds, D., & Kollef, M. 2021. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. Drugs, 81(18): 2117-2131.

Rice, J., & Pierce, K. 2003. A simple diagnostic assay to detect mutations in exons 7-8 of the human p53 tumor suppressor gene from single cells using Linear-After-the-Exponential (LATE)-PCR.

Robertson, F. C., Lepard, J. R., Mekary, R. A., Davis, M. C., Yunusa, I., Gormley, W. B., & Park, K. B. 2018. Epidemiology of central nervous system infectious diseases: a meta-analysis and systematic review with implications for neurosurgeons worldwide. Journal of Neurosurgery, 130(4): 1107-1126.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. 2015 . Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In PCR Primer Design, 31-56.

Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. International Journal of Medical Microbiology, 303(6-7): 293-297.

Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. 2020. Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. Nucleic Acids Research, 48(7): e42-e42.

Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Leblebicioglu, H., Mehta, Y., & Roncancio-Vill, G. E. 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.

Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., & Hijjawi, N. 2016. It's official–Cryptosporidium is a gregarine: What are the implications for the water industry. Water Research, 105: 305-313.

Sabel, C., Pringle, D., & Schoerstrom, R. 2010. Infectious disease diffusion. A companion to Health and Medical Geography, 111-132.

Sader, H. S., Huband, M. D., Castanheira, M., & 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.

Sakamoto, S., Miyazawa, K., Yasui, T., Iguchi, T., Fujita, M., Nishimatsu, H., & Ichikawa, T. 2019. Chronological changes in epidemiological characteristics of lower urinary tract urolithiasis in Japan. International Journal of Urology, 26(1): 96-101.

Sambrook, J. & Russel, D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. (3rd ed). Cold Spring Harbor, USA. Pp.5-52.

Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. 2022. Evolution under low antibiotic concentrations: a risk for the selection of Pseudomonas aeruginosa multidrug-resistant mutants in nature. Environmental Microbiology, 24(3): 1279-1293.

Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., & Huffnagle, G. B. 2014. Microbiology, genomics, and clinical significance of the Pseudomonas fluorescens species complex, an unappreciated colonizer of humans. Clinical Microbiology Reviews, 27(4): 927-948.

Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. 2017. The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. Genes, 8(1): 39.

Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., & Ushida, K. 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. Environmental Microbiology Reports, 5(1): 127-134.

Serra-Burriel, M., Keys, M., Campillo-Artero, C., Agodi, A., Barchitta, M., Gikas, A., & López-Casasnovas, G. 2020. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. PloS One, 15(1): e0227139.

Shalabi, A., Ehrlich, T., Schäfers, H. J., & Becker, S. L. 2017. Infective endocarditis caused by Pseudomonas stutzeri in a patient with Marfan syndrome: case report and brief literature review. IDCases, 10: 22-25.

Shoemark, A., Ozerovitch, L., & Wilson, R. 2007. Aetiology in adult patients with bronchiectasis. Respiratory Medicine., 101(6): 1163-1170.

Sikora, A., & Zahra, F. 2021. Nosocomial infections. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(5): a000414.

Silva, M., Marra, A. R., Pereira, C. A., Medina-Pestana, J. O., & Camargo, L. F. 2010. Bloodstream infection after kidney transplantation: epidemiology, microbiology, associated risk factors, and outcome. Transplantation, 90(5): 581-587.

Smyth, A. R., Bell, S. C., Bojcin, S., Bryon, M., Duff, A., Flume, P., & Wolfe, S. 2014. European cystic fibrosis society standards of care: best practice guidelines. Journal of Cystic Fibrosis, 13: S23-S42.

Steiner, T. S., Thielman, N. M., & Guerrant, R. L. 1997. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply?. Annual Review of Medicine, 48(1): 329-340.

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

Stiller, A., Schröder, C., Gropmann, A., Schwab, F., Behnke, M., Geffers, C., & Gastmeier, P. 2017. ICU ward design and nosocomial infection rates: a cross-sectional study in Germany. Journal of Hospital Infection, 95(1): 71-75.

Sydnor, E. R., & Perl, T. M. 2011. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. Clinical Microbiology Reviews, 24(1): 141-173.

Sykes, J. E., & Papich, M. G. 2013. Antibacterial drugs. Ch. 8. Canine and Feline Infectious Diseases, 66-86.

Tan, G., Xi, Y., Yuan, P., Sun, Z., & Yang, D. 2019. Risk factors and antimicrobial resistance profiles of Pseudomonas putida infection in Central China, 2010–2017. Medicine, 98(44).

Tang, M., Quanstrom, K., Jin, C., & Suskind, A. M. 2019. Recurrent urinary tract infections are associated with frailty in older adults. Urology, 123: 24-27.

Tazinya, A. A., Halle-Ekane, G. E., Mbuagbaw, L. T., Abanda, M., Atashili, J., & Obama, M. T. 2018. Risk factors for acute respiratory infections in children under five years attending the Bamenda Regional Hospital in Cameroon. BMC Pulmonary Medicine, 18(1): 1-8.

Thangkhiew, I. 1986. Successful treatment with ceftazidime of a Pseudomonas fluorescens chest infection in a myasthenic patient. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18(3): 428-429.

Timsit, J. F., Ruppé, E., Barbier, F., Tabah, A., & Bassetti, M. 2020. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. Intensive Care Medicine, 46(2): 266-284.

Tipper, D. J., & Strominger, J. L. 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 54(4): 1133.

Tofas, P., Samarkos, M., Piperaki, E. T., Kosmidis, C., Triantafyllopoulou, I. D., Kotsopoulou, M., & Daikos, G. L. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 88(4): 335-341.

Tondi, D., Cross, S., Venturelli, A., P Costi, M., Cruciani, G., & Spyrakis, F. 2016. Decoding the structural basis for carbapenem hydrolysis by class A β-lactamases: fishing for a pharmacophore. Current Drug Targets, 17(9): 983-1005.

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Swartz, S., & Mokdad, A. H. 2017. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet Infectious Diseases, 17(11): 1133-1161.

Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynie, L., Acosta-Gutierrez, S., Naismith, J. H., & Winterhalter, M. 2020. Porins and small-molecule translocation across the outer

membrane of Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology, 18(3): 164-176.

Vincent, J. L., Sakr, Y., Singer, M., Martin-Loeches, I., Machado, F. R., Marshall, J. C., & EPIC III Investigators. 2020. Prevalence and outcomes of infection among patients in intensive care units in 2017. Jama, 323(15): 1478-1487.

Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., & Wolffs, P. F. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. Frontiers in Microbiology, 173.

Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Dobre, E. G., Barbu, I. C., Cristian, R. E., Popa, M., ... & Chifiriuc, M. C. 2020. Emerging strategies to combat β-lactamase producing ESKAPE pathogens. International Journal of Molecular Sciences, 21(22): 8527.

Walsh, T. R. 2005. The emergence and implications of metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology and Infection, 11: 2-9.

Wang, Y., Wang, X., Schwarz, S., Zhang, R., Lei, L., Liu, X., & Shen, J. 2014. IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69(9): 2579-2581.

Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., & Sievert, D. M. 2016. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. Infection Control & Hospital Epidemiology, 37(11): 1288-1301.

Weiner-Lastinger, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., & Dudeck, M. A. 2020. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. Infection Control & Hospital Epidemiology, 41(1): 1-18.

Wigneswaran, J., Van Wyck, D., Pegues, D., Gholam, P., & Nissenson, A. R. 2018. Hepatitis C virus infection in patients with end-stage renal disease. Hemodialysis International, 22(3): 297-307.

Wiley, J. 2007. Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA, 2013.

Williams, B. J., Dehnbostel, J., & Blackwell, T. S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. Respirology, 15(7): 1037-1056.

Williams, F. N., Herndon, D. N., Hawkins, H. K., Lee, J. O., Cox, R. A., Kulp, G. A., & Jeschke, M. G. 2009. The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. Critical Care, 13(6): 1-7.

World Health Organization. 2006. WHO guidelines on hand hygiene in health care (advanced draft): global safety challenge 2005-2006: clean care is safer care (No. WHO/EIP/SPO/QPS/05.2 Rev. 1). World Health Organization.

World Health Organization. 2016. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis (No. WHO/HIV/2016.06). World Health Organization.

World Health Organization. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health. Monitoring global progress on addressing antimicrobial resistance: analysis report of the second round of results of AMR country self-assessment survey, 2018.

World Health Organization. 2021. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. World Health Organization.

Xiong, J., Alexander, D. C., Ma, J. H., Déraspe, M., Low, D. E., Jamieson, F. B., & Roy, P. H. 2013. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(8): 3775-3782.

Xiong, J., Hynes, M. F., Ye, H., Chen, H., Yang, Y., M'zali, F., & Hawkey, P. M. 2006. bla IMP-9 and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(1): 355-358.

Young, P. Y., & Khadaroo, R. G. 2014. Surgical site infections. Surgical Clinics, 94(6): 1245-1264.

Yuan, M., Chen, H., Zhu, X., Feng, J., Zhan, Z., Zhang, D., & Li, J. 2017. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying Blaimp-45 and armA, from clinical Pseudomonas putida. Oncotarget, 8(40): 68439.

Zaglool, D. A., Khodari, Y. A., Othman, R. A. M., & Farooq, M. 2011. Prevalence of intestinal parasites and bacteria among food handlers in a tertiary care hospital. Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association, 52(4): 266.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mohammed Hazim Hamdoon HAMDOON

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Musul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	2000-2004