ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAK'TA İDRAR YOLU ENFEKSİYONU OLAN BİREYLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TÜRÜNÜN VİRÜLANS FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI tarafından hazırlanan **"Irak'ta İdrar Yolu Enfeksiyonu Olan Bireylerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Türünün Virülans Faktörünün Moleküler Çalışması"** adlı tez çalışması 09/02/2023 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 : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Farah Thamer Abdullah SAMAWI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Biyoloji
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji
Gazi Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Orman Mühendisliği Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Irak'ta İdrar Yolu Enfeksiyonu Olan Bireylerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Türünün Virülans Faktörünün Moleküler Çalışması**" 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 (09/02/2023).

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK'TA İDRAR YOLU ENFEKSİYONU OLAN BİREYLERDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TÜRÜNÜN VİRÜLANS FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Farah Thamer Abdullah SAMAWI

Bu çalışma, idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *Pseudomanas aeruginosa*'nın saptanmasını ve bazı antibiyotiklere karşı direncini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan materyal, 18 Mart- 9 Ekim 2022 tarihleri arasında Bağdat'taki Yarmouk Eğitim Hastanesine başvuran 150 hasta (idrar yolu enfeksiyonu olan) ve 50 sağlıklı (kontrol) bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu, hasta bireylerin ailelerinde bulunan sağlıklı bireylerden ve sağlık personelinden oluşmakta olup yaşları 10-50 arasında değişmektedir. Bakteriyel izolatlar VİTEK 2 sistemi ile doğrulandı. Bakteriyel genlerin saptanmasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda, idrar yolu enfeksiyonlarının giderilmesinde en aktif rolün Piperasilin/tazobaktam, Sefepim ve Seftazidim antibiyotikleri olduğu tespit edildi. Ayrıca, AlgU geni örneklerin %88'inde pozitifken, PelF geni örneklerin %80'inde pozitif olarak bulundu. Elde edilen suşlar Ulusal Veri Bankası'nda (NCBI) tescil edilerek, PelF geni için OP353999 ve AlgU geni için OP345000 koduyla seri numarası alındı.

2023, 57 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa,* İdrar Yolu Enfeksiyonu, AlgU, PelF

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR STUDY OF VIRULENCE FACTOR OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SPECIES ISOLATED FROM INDIVIDUALS WITH URINARY TRACT INFECTION IN IRAQ

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Farah Thamer Abdullah SAMAWI

This study was conducted to investigate the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, which causes urinary tract infections, and its resistance to some antibiotics. The material to be used in the study consists of 150 patients (with urinary tract infection) and 50 healthy (control) individuals who applied to Yarmouk Training Hospital in Baghdad between 18 March and 9 October 2022. The control group consists of healthy individuals and health personnel in the families of the sick individuals and their age ranges between 10-50 years. Bacterial isolates were confirmed with the VITEK 2 system. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect bacterial genes. In line with the data obtained, it was determined that Piperacillin/tazobactam, Cefepim and Ceftazidime antibiotics played the most active role in the elimination of urinary tract infections. Also, while the AlgU gene was positive in 88% of the samples, the PelF gene was found to be positive in 80% of the samples. Obtained strains were registered in the National Data Bank (NCBI) and serial numbers were obtained with the code OP353999 for the PelF gene and OP345000 for the AlgU gene.

2023, 57 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Urinary tract infection, AlgU, PelF

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren değerli danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN başta olmak üzere, çalışmanın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren herkese sonsuz teşekkür ederim.

Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI
Çankırı, Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Pseudomonas Türlerinin Mikrobiyolojisi **3**
2.2 *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi **3**
2.3 *P. aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar **4**
2.3.1 Solunum yolu enfeksiyonları **4**
2.3.2 İdrar yolu enfeksiyonları (İYE) **5**
2.3.3 Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları **6**
2.3.4 Bakteriyel keratit **6**
2.3.5 Kulak enfeksiyonları **7**
2.4 *P. aeruginosa*'nın Patogenezi **7**
2.4.1 Yapışıklıklar (Adezyon) **7**
2.4.2 Tip III salgı sistemi (T3SS) **8**
2.4.3 *P. aeruginosa*'nın diğer virülans özellikleri **9**
2.5 *P. aeruginosa* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnci **9**
2.6 Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları **11**
2.6.1 Beta-laktamlar **12**
2.6.2 Aminoglikozitler **13**
2.6.3 Aktif akış pompaları **14**
2.6.4 Membran geçirimsizliği ve porin değişimi **14**
2.6.5 Hedef değişikliği **15**
2.7 *P. aeruginosa*'nın Teşhisi **15**

2.8 Moleküler Teşhis ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 16
2.9 DNA Dizilimi 17
2.10Virulans Faktörleri ve Genler 17
3. MATERYAL VE METOT 19
3.1 Materyal 19
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları 19
3.1.2 Kimyasal malzemeler 20
3.1.3 Kullanıma hazır kültür besiyeri 20
3.1.4 Antibiyotikler 21
3.1.5 DNA ekstraksiyonu ve PCR testi malzemeleri 21
3.2 Yöntemler 21
3.2.1 Hastalar ve kontrol 22
3.2.2 Örneklerin toplanması 22
3.2.3 Doğrudan inceleme 22
3.2.4 Dolaylı inceleme 23
3.2.5 VITEK teşhisi 24
3.2.6 Bakteri izolatlarının bakımı ve saklanması 24
3.2.7 Bulanıklık ölçümü 24
3.2.8 VITEK 2 ile antimikrobiyal duyarlılık testi 25
3.3 Moleküler Tanı 25
3.3.1 İncelenen bakterilerden DNA ekstraksiyonu 26
3.3.2 Jelden DNA ekstraksiyonu 29
3.3.3 PCR 30
3.3.4 AlgU ve PelF genlerinin tespiti 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 35
4.1 Numune Toplama 35
4.2 Bakteriyel İzolasyon ve Tanı Sonuçları 35
4.3 Örneklerin Cinsiyete ve Yaş Grubuna göre Dağılımı 36
4.4 Enfeksiyon Alanına göre Pozitif Örneklerin Sayısı ve Yüzdesi 37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 46
ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Millimetre
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

GNB	Gram negatif bakteriler
HKP	Hastane kaynaklı pnömoniye
KF	Kistik fibroz
KFTR	Kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici
KSOM	Kronik süpüratif otitis media
LPS	Lipopolisakkarit
MDR	Çoklu ilaç dirençli
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonları
OM	Otitis media
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
T3SS	Tip III salgı sistemi
TBE	Tris borat EDTA tamponu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi 29
Şekil 3.2 PCR ürünü bant boyutu 292 bp 33
Şekil 3.3 PCR ürünü bant boyutu 789 bp 34
Şekil 4.1 MacConkey agarında *P. aeruginosa*'nın büyümesi 35
Şekil 4.2 AlgU ve PelF genleri arasındaki pozitiflik yüzdesinin karşılaştırılması 38
Şekil 4.3 Sekans hizalama (%98) CP049161,1..... 40
Şekil 4.4 Sekans hizalama (%93) LR134342,1 42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Laboratuvar cihazları 19
Çizelge 3.2 Kimyasallar 20
Çizelge 3.3 Kültür besiyeri 20
Çizelge 3.4 Antibiyotikler 21
Çizelge 3.5 DNA ekstraksiyonu ve PCR testi malzemeleri 21
Çizelge 3.6 AlgU ve PelF genlerininin spesifik primerleri 31
Çizelge 3.7 Maxime PCR preMix kitinin bileşenleri (i-Taq) 32
Çizelge 3.8 Teşhis geni için spesifik etkileşim karışımı 32
Çizelge 3.9 Optimum PCR koşulları 32
Çizelge 4.1 Örneklerin cinsiyete göre dağılımı 36
Çizelge 4.2 Örneklerin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı 37
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* bakterilerinin antibiyotiklere yanıt yüzdeleri 39
Çizelge 4.4 *Pseudomonas aeruginosa*'nın AlgU geni için sekans hizalaması 41
Çizelge 4.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın PelF geni için sekans hizalaması 43

1. GİRİŞ

Tüm nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının (İYE) %20 ile 49'unu hastanede yatan hastalarda en sık görülen enfeksiyonlar oluşturmaktadır ve en yaygın hastalıklardan biri haline gelmiştir (Horcajada *et al.* 2013). *Pseudomonas aeruginosa,* hastanelerdeki İYE'lerin %7-10'una neden olur (Djordjevic *et al.* 2013). Gram negatif, fermente olmayan bakteriler, birçok antibiyotiğe karşı yüksek doğal bir direnç sahiptir. Bu özellik, patojenin yeni antibiyotik direncini hızlı bir şekilde kazanmasıyla birlikte, özellikle enfeksiyon hastane kökenli olduğunda, bulaşıcı hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunur. *P. aeruginosa* ile İYE sebebiyle hastanede yatan hastalarda düşük oranda gerçekleşen sağkalımın potansiyel nedenlerini araştıran hiçbir tıbbi araştırma yoktur. Bunlara ek olarak, % 5 ile %33 arasında değişen bakteriyemisi olanlar hariç, bu bireylerin ölüm oranı bilinmemektedir (Horino *et al.* 2012, Morata *et al.* 2012).

Günümüzde doktorların karşılaştığı en büyük zorluklardan biri, tıp camiasında artan antibiyotik direnci prevalansı nedeniyle Gram negatif bakterilerin (GNB) neden olduğu enfeksiyonların nasıl yönetileceğidir (Pena *et al.* 2009). *Pseudomonas aeruginosa,* özellikle ağır hasta ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde Gram negatif çubukların neden olduğu enfeksiyonlara hakimdir (El Zowalaty *et al.* 2015). E. *coli, Klebsiella* türleri, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeurogenosa* gibi diğer son derece önemli patojenlerle birlikte antibiyotik direnci nedeniyle en çok ilgilenilen patojenlerden biridir (Boucher *et al.* 2009).

P. aeruginosa, çeşitli antibiyotik ve antiseptiklere karşı yerleşik bir güce sahip olması nedeniyle hastanelerde yaygın bir hastalıktır, bu da nihayetinde çok çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı yeni direnç mekanizmaları geliştirebilecekleri ve ıslak ortamlarda hayatta kalabilecekleri anlamına gelir. Pseudomonas türlerindeki çeşitli ilaç direnç mekanizmaları, tümü *P. aeruginosa*'ya direnç sağlayan porinleri, penisilin bağlayıcı proteinleri, atık pompaları ve kromozomal β-laktamazı kodlayan genlerin mutasyonundan oluşmaktadır. Doğuştan gelen direnç, aşırı eksprese edilmiş bir akış pompası ve dış zarın düşük geçirgenliği ile karakterize edilir (Oie *et al.* 2009, Santajit and

Indrawattana 2016). *Pseudomonas aeruginosa'*nın konakçı-patojen etkileşimlerini tetikleyerek enfeksiyona neden olabileceği kabul edilmektedir. Antimikrobiyal direnç klinik ortamlarda kullanım için izin verilen antibiyotiklerin etkinliğini azaltarak, *P. aeruginosa* daha yüksek bir tehlike seviyesi oluşturmuştur. Bu ilaca dirençli Pseudomonas türleri için tedavi seçenekleri her iki mekanizma da sıklıkla bir arada bulunduğundan ve çok sayıda ilaca birleşik direnç sağladığından oldukça kısıtlıdır (Memar *et al.* 2016).

Bu bilgiler doğrultusunda, Bazı antibiyotiklere karşı bakteri direncinin tespiti, *P. aeruginosa*'da virülans ve antibiyotiğe dirençli genlerin PCR ile saptanması ve16S RNA geni kullanılarak moleküler incelemesi amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Pseudomonas Türlerinin Mikrobiyolojisi

Bazen Psödomonadlar olarak da bilinen Pseudomonas cinsi, ailenin tıbbi açıdan en önemli türü olarak *P. aeruginosa*'yı içerir. *P. aeruginosa,* oksidaz pozitif, fermente olmayan, hareketli, spor oluşturmayan gram negatif aerobik bir bakteridir. Mavi-yeşil bir pigment olan piyosiyanin ve parlak sarı-yeşil bir pigment olan pyoverdine gibi suda çözünür pigmentlerin oluşumu nedeniyle agar üzerinde açıkça tanımlanabilir (Motos *et al.* 2023, Peng *et al.* 2014). *P. aeruginosa* insanları, hayvanları, bitkileri ve su ekosistemlerini enfekte edebilen bir bakteridir (Jeong *et al.* 2014). İnsan kolonizasyonu sindirim sisteminde başlar ve daha sonra koltuk altı ve perine gibi nemli cilt bölgelerine yayılır.

P. aeruginosa, gelişmek için çok az besin gereksinimine ihtiyaç duyar ve yayılmak için çok çeşitli çevresel maddeler kullanabilir. Ayrıca, *P. aeruginosa* anaerobik olarak büyüme yeteneğine sahiptir ve fermantasyona ihtiyaç duymaz; bunun yerine enerjisini karbonhidratların oksidasyonundan alır. Hastane odaları, klinikler ve tıbbi cihazlar gibi kuru yüzeyli lavabolar, duş kabinleri ve hatta kontamine distile su gibi olumsuz ortamlarda hayatta kalabilir. Bunun nedeni, büyümek için yalnızca minimum miktarda beslenmeye ihtiyaç duymasıdır. Sonuç olarak, nozokomiyal enfeksiyonların önemli bir kaynağıdır. Portekiz'de yapılan bir araştırmada, hastane ortamı psödomonların varlığı açısından aşırı derecede kirli ve enfeksiyon bulaşma riskini yüksek olarak bulunmuştur (Willmann *et al.* 2014).

2.2 *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi

Gessard (1882)'de *P. aeruginosa*'yı yeşil irinden izole eden ilk kişidir. Geniş yayılışa sahip olması nedeniyle, *P. aeruginosa* birçok insan hastalığında önemli bir rol oynayabilir. Normal bağırsak florasında bulunabilir, ancak hasar görmemiş tipik epitelyuma iyi tutunamaz. Bu nedenle sağlıklı insanlarda enfeksiyona neden olmaz

(Micek *et al.* 2015), aksine bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda fırsatçı bir patojen görevi görür. Adaptasyon kabiliyeti ve güçlü hayatta kalma kapasitesi nedeniyle, yatak korkulukları, solunum ekipmanı, monitörler, ventilatör düğmeleri ve diyaliz tüpleri dahil olmak üzere tıbbi cihazları ve yüzeyleri 6 saatten 6 aya kadar değişen sürelerde yaygın olarak kontamine ettiği bilinmektedir (Babu *et al.* 2014). *P. aeruginosa* el kremlerinden, bazı temizlik solüsyonlarından, cerrahi aletler ve endoskopi ekipmanlarından yetiştirilebilir. Aynı zamanda birçok popüler antimikrobiyal tedaviye karşı doğal ve kazanılmış direnç gösterir (Barrasa-Villar *et al.* 2017, Riu *et al.* 2016).

P. aeruginosa, kan dolaşımı enfeksiyonları ve solunum cihazlarının neden olduğu zatürree gibi hastane kaynaklı çeşitli rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir. Pnömoninin 2. en sık nedeni, gram negatif BSI'nın 3. en sık nedeni ve 4. en sık izole edilen nozokomiyal patojen olup, tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların (HAI) %10'unu oluşturur. *P. aeruginosa* en sık izole edilen ikinci bakteridir (%16) ve Yunanistan'da yapılan bir çalışmada hastane enfeksiyonu olan 8,247 yatan hastanın penem grubu antibiyotik direncinin %49,4'ünden sorumlu olarak bulunmuştur. Diğer gram-pozitif organizmaların enfeksiyonları ile *P. aeruginosa* karşılaştırıldığında, kan dolaşımı enfeksiyonlarından daha yüksek ölüm oranı bildirilmiştir (Lister *et al.* 2009).

2.3 *P. aeruginosa*'nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar

P. aeruginosa'nın neden olduğu enfesksiyonlar aşağıda detay verildiği üzere beş başlık altında incelenmiştir.

2.3.1 Solunum yolu enfeksiyonları

P. aeruginosa, kronik akciğer enfeksiyonlarının nüksetmesine, akciğer fonksiyonlarının kademeli olarak bozulmasına ve yüksek morbidite ve ölüm oranlarına yol açan kistik fibrozlu (KF) hastalarının hava yollarında uzun süre kalma kapasitesiyle bilinir (Winstanley *et al.* 2016). Bu genetik olarak kalıtsal akciğer durumunun patofizyolojisi, *P. aeruginosa*'nın KF'li insanları nasıl enfekte ettiği sürecinde önemli bir rol oynar. Kistik

fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (KFTR) olarak adlandırılan klorür kanalı proteini, epitel dokularının homeostazını korumak için hayati öneme sahiptir ve hastalığın nedenidir. KFTR kanalının işlev bozukluğu, epitel boyunca klorür iyonu taşınmasının kontrolünü bozarak, sodyum hiper absorpsiyonuna ve azalmış mukosiliyer klirense yol açar (De Boeck *et al.* 2014). Hava yollarının kalın, viskoz mukus tarafından tıkanması ve mukus hipoksisi ile *P. aeruginosa* kolonizasyonu teşvik edilir (Farrell *et al.* 2017). *P. aeruginosa*'nın solunum yollarında kolonizasyonu, KF'si olmayan hastalarda, özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda da meydana gelebilir. Azalmış mukosiliyer klirens, KOAH hastalarının KF hastalarıyla paylaştığı semptomlardan biridir. Bu risk faktörleri altında *P. aeruginosa* kolonize olabilir ve enfeksiyona neden olabilir (Burgener and Moss 2018).

P. aeruginosa ayrıca bağışıklığı baskılanmış kişilerde hastane kaynaklı pnömoniye (HKP) sebep olur. Mekanik ventilasyondaki hastalarda genellikle ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) olarak da bilinen HKP gelişir (Rosen *et al.* 2018).

2.3.2 İdrar yolu enfeksiyonları (İYE)

İYE'ler tüm nozokomiyal enfeksiyonların %20 ile 49'unu oluşturan başlıca nedenlerden biridir. Ayrıca *P. aeruginosa*, İYE enfeksiyonlarının %10'undan sorumludur. *P. aeruginosa* ile bu enfeksiyonlar tipik olarak kateterizasyonu, üriner sistem enstrümantasyonunu veya ameliyatı takip eder, İYE sonuçları arasında piyelonefrit, morbidite ve nadir durumlarda ölüm olabilir. Bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştıran, kateterin sokulmasının neden olduğu mukozal epitel katmanlarının potansiyel bozulması nedeniyle, patojenler hedef konakçılarına girme aracı olarak kateterleri kullanır (Masuda and Ohya 2013, Mesaros *et al.* 2007).

P. aeruginosa'lı İYE, yakın zamanda idrar yolu enstrümantasyonu, kalıcı idrar kateter ve altta yatan kronik hastalığı olan hastalarda daha yaygındır. Aynı zamanda idrar yolu enstrümantasyonu olan hastaların İYE'ye (hipertansiyon, demans veya *diabetes mellitus* gibi) sahip olma olasılığı ve ölüm oranlarında %20'ye kadar artış olduğu bilinmektedir. İlerlemiş kronik hastalığın varlığı ve etkili olan sınırlı sayıda antimikrobiyal tedavinin

olumlu sonuçların oluşmasını engellemektedir. Bu gibi durumlarda predispozan durumun ortadan kaldırılması bakım standardının bir parçasıdır ve tipik olarak septik şok durumun tedavisi için yeterli olduğu düşünülen tek bir antibiyotik kürünün uygulanması da gerekmektedir (Lamas Ferreiro *et al.* 2017).

2.3.3 Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

P. aeruginosa, ciddi yanıkları ve yara enfeksiyonlarını kolonize eden en sık keşfedilen bakteridir. Yüksek morbidite ve mortalite oranları, çok ilaca dirençli (MDR) *P. aeruginosa* yara enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir. Cerrahi yaralardaki ameliyat sonrası yara enfeksiyonları nozokomiyal *P. aeruginosa* salgınlarına bağlanmıştır. Septisemi, bakteriyel ajanın ilk enfeksiyon bölgesinden kan dolaşımına yayılmasından kaynaklanabilir. *P. aeruginosa* ile ilişkili septisemi, geçmişte yüksek ölüm oranlarıyla bağlantılı olarak ilişkilendirilmiştir (Spernovasilis *et al.* 2021).

Sıcak küvetlerde, yüzme havuzlarında ve farklı su kaynaklarında *P. aeruginosa* ile kontaminasyon hafif cilt enfeksiyonlarına neden olabilir. Kırmızı tabanlı ve beyaz püstüllü kaşıntılı bir döküntü daha önce *P. aeruginosa* kaynaklı foliküler dermatit olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, *P. aeruginosa*, "yeşil tırnak sendromu" olarak da bilinen onikoliz gibi tırnak koşullarını kolonize edebilir (Morand and Morand 2017).

2.3.4 Bakteriyel keratit

P. aeruginosa, bakteriyel keratitin en yaygın nedenidir ve kontakt lensleri olan, göz ameliyatı geçirmiş ve önceden var olan bir oküler hastalığı olanları etkiler. *P. aeruginosa*'nın hasarlı kornea epitel hücrelerine hızla içselleştiği ve tutunduğu belirtilmiştir. Uzun süre kontakt lens aşınmasının korneanın epitel yüzeyini bozduğu ve kontakt lensle ilişkili keratitin nedeni olan kornea aşınmalarına neden olduğu bilinmektedir (Hilliam *et al.* 2020). Ayrıca, hastaların uygun kontakt lens bakımını ihmal etmeleri, kontakt lens kontaminasyonunun neden olduğu bakteriyel keratit ile ilişkilendirilmiştir (Choy *et al.* 2012).

2.3.5 Kulak enfeksiyonları

Orta kulağı etkileyen herhangi bir bulaşıcı duruma orta kulak iltihabı denir (Wallis *et al.* 2015). Kronik süpüratif otitis media (KSOM) olarak bilinen bir orta kulak durumu, delikli kulak zarı yoluyla altı haftadan uzun süre devam eden orta kulak drenajı ile tanımlanır. Bakteriyel enfeksiyon, KSOM'nin en sık nedenidir (Mittal *et al.* 2015). Dünyadaki en tehlikeli sağlık sorunlarından biri olan KSOM; işitme kaybına, menenjit ve beyin apsesi gibi potansiyel olarak ölümcül merkezi sinir sistemi sonuçlarına neden olur (Sun and Sun 2014).

2.4 *P. aeruginosa*'nın Patogenezi

P. aeruginosa'nın patogenezi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve çoğunluk algılamanın karmaşık bir süreçte arabulucu görevi gördüğü gösterilmiştir. *P. aeruginosa'*da, belirli reseptörleri aktive etmeyi amaçlayan otomatik tetikleyiciler olarak bilinen sinyal molekülleri üreterek hücreden hücreye iletimi sağlayan iki nükleer algılama sistemi vardır (Park *et al.* 2022). Bununla birlikte, indükleyici seviyesinin eşiği aşması için büyük bir popülasyon yoğunluğu gereklidir. Maksimum reseptör aktivasyonu, biyofilmlerin gelişimine ek olarak birçok virülans ajanının üretimini tetikler (Sabnis *et al.* 2021). Konağı enfekte etmek ve bağışıklık sisteminden geçmek için adezyonlar, T3SS (tip III salgı sistemi) ve diğer salgılanan proteinler gibi çeşitli virülans özelliklerine sahiptir (Ozer *et al.* 2021).

2.4.1 Yapışıklıklar (Adezyon)

Kolonizasyon ve hastalık başlangıcına yönelik ilk adım, konakçı hücre yüzeyine bakteriyel yapışmadır. *P. aeruginosa*'daki yapışmaya, tip IV pili ve biyofilm oluşumu aracılık eder. Bakterinin hücre yüzeyine yapışık olan ipliksi çıkıntılar, tip IV pili olarak bilinir. Daha önce keşfedilen tip IV pilinin biyosentezi ve işleyişinde yer alan genlerin sayısı 40'tan fazladır (Bertrand *et al.* 2010). *P. aeruginosa* tarafından salınan hücre dışı polisakkaritler, mikro koloniler etrafında gömülü biyofilm matrisinin geliştirilmesinde de

çok önemli olan aljinat, polisakarit kodlayan lokus (PEL) ve polisakkarit sentez lokusunu (PSL) içerir (Byrd *et al.* 2010). Bakteri, biyofilmler tarafından insan bağışıklık sisteminin bileşenlerinden ve antibiyotik direncinden korunur.

Bunun yanı sıra, tip IV pili ve biyofilm gelişimi, lipopolisakkaritler (LPS) gibi bir dizi başka hücre yüzey özelliklerine sahiptir. *P. aeruginosa*'daki LPS yapısı iki farklı glikoform sergiler ve lipid A ve O-antijen yapısı açısından çeşitlilik gösterir. Bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu iltihaplanmayı tetiklemekle görevli olan doğuştan gelen bağışıklık sistemi, tanıma molekülü olarak LPS'yi kullanır (Maldonado *et al.* 2016). LPS sinyallemesinin karmaşık işlemine, LPS-LBP kompleksleri oluşturmak için polisakarit bağlayıcı proteine (LPB) bağlanan LPS aracılık eder, bunlar daha sonra toll benzeri reseptör-4 ikincil aktivasyonu için CD14 reseptörlerine taşınır. Lipid A'daki asilasyon derecesi, tamamen heksa-asilatlı bir şekilde oluşan inflamatuar yanıtı etkiler.

2.4.2 Tip III salgı sistemi (T3SS)

P. aeruginosa'nın T3SS'si, iğneye benzeyen ve konakçı (T3SS) ile etkileşime aracılık eden bir protein eklentisidir. T3SS, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasına zehirli efektör proteinler sokarak bakterilerin hayatta kalması için gerekli olan hücresel aktiviteyi bloke eder. *P. aeruginosa'*daki dört efektör toksin, ekzoenzimler S, T, U ve Y olarak tanımlanmıştır. İki işlevli bir enzim olduğu için, aynı ExoY molekülünde hem GTPaz aktive edici protein (GAP) aktivitesi hem de ADP-ribosiltransferaz aktivitesi bulunabilir. Hem ExoS hem de ExoT, adenilat siklazlar olarak tanımlanmıştır. Önceki araştırmalara göre, ExoS, ExoT ve ExoY proteinlerinin işlevleri, sırayla fagositozu önleyen ve epitel hücre istilasını önleyen sitolitik aktivite kazanmaktır. Ek olarak, bu proteinler, hücre iskeletini değiştiren endotelyal hücre bağlantılarının geri çekilmesinin hücresel yuvarlanması ve parçalanması ile bağlantılıdır (Belyy *et al.* 2016).

ExoU ise fosfolipid membranları kırarak hücreleri öldürebilen fosfolipaz A2 (PLA2) aktivitesine sahip etkili bir sitotoksindir. ExoU'nun ayrıca fibroblastlar, makrofajlar ve epitel hücreleri gibi farklı hücre tiplerine karşı sitolitik etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Ek olarak PLA2 aktivitesi, prostaglandinler üretmek için siklooksijenaz ve

lipoksijenaz yolları tarafından kullanılan araşidonik asit üreterek iltihaplanmaya neden olur (Ince *et al.* 2015).

2.4.3 *P. aeruginosa*'nın diğer virülans özellikleri

Hemolitik hem de hemolitik olmayan bir fosfolipaz C, *P. aeruginosa* (PLC) tarafından salgılanır. Araştırmalara göre, hemolitik PLC, ökaryotik zarlarda ve konakçı akciğer yüzey aktif maddesinde bol miktarda bulunan ve akciğer hasarından birincil derecede sorumlu olan fosfatidilkolin ve sfingomyelini parçalamaktadır. Hemolitik olmayan PLC'nin biraz patojenik etkisi vardır. İzolatların nereden geldiği önemli değil, önceki araştırmalar *P. aeruginosa*'nın yüksek bir lasB geni frekansına sahip olduğunu göstermiştir (Chadha *et al.* 2022).

P. aeruginosa tarafından salgılanan sarı-yeşil bir flüoresan pigment olan Pyoverdin, çevredeki ortamdan demiri emmek ve aktarmak için dış zardaki belirli protein reseptörlerini bir siderofor olarak kullanarak çalışır. Her bir *P. aeruginosa* suşu tarafından yalnızca bir tür pyoverdine üretilmesine rağmen, üç çeşit keşfedilmiştir (Bonnington and Kuehn 2014). Pyoverdin, hayvan modellerinde virülansla ilişkilendirilmiştir çünkü piyoderinden yoksun mutantlar virülans göstermezler. *P. aeruginosa* ayrıca piyosiyanin de dahil olmak üzere bir dizi fenazin salgılar. *P. aeruginosa*'nın hızlı teşhisinde sıklıkla kullanılan piyosiyanin adı verilen mavi, redoks aktif ikincil bir metabolit, mavi-yeşil bir renk üretir. Daha önceki çalışmalara göre, piyosiyanin, çeşitli hücre işlemlerine müdahale etmesi nedeniyle önemli bir hastalık oluşturma faktörü olarak kabul edilmektedir (Alatraktchi *et al.* 2020).

2.5 *P. aeruginosa* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnci

Çoklu ilaç direnci (MDR), son zamanlarda yaygınlaşmıştır ve şu anda küresel düzeyde ciddi bir tehdit oluşturduğu düşünülmektedir (Potron *et al.* 2015). Çeşitli çalışmalar, Çoklu ilaç direnci suşlarının büyümesi için risk faktörlerini değerlendirmiştir. Brezilya'da yapılan bir vaka kontrol çalışması, Metallo-laktamaz (MBL) suşları olan 142 hastanın ve

MBL olmayan suşları olan yirmi altı hastanın enfeksiyonlarını karşılaştırdı (Lucena *et al.* 2014). Çok değişkenli analiz ile yoğun bakımda kalış süresi ve idrar yolu enfeksiyonu, MBL enfeksiyonları için en önemli iki risk değişkeni olarak bulundu. Ek olarak, MBL suşları, hastalığın erken başlangıcı ve mortaliteye hızlı bir geçiş ile bağlantılıdır.

2010 yılında Brezilya'da yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan 54 yoğun bakım ünitesi hastası iki yıllık retrospektif bir çalışmaya konu olmuştur (Matos *et al.* 2016). 63 CRPA atağının retrospektif çalışmasına göre, 20 *P. aeruginosa* bakteriyemi ve CRPA'nın biyofilm oluşturma yeteneği incelenerek CRPA bakteriyemili hastalarda mortalite için bağımsız olarak öngörücü faktörler olarak belirlenmiştir (Jeong *et al.* 2014). APACHE II skoru, başka bir araştırma ile kolonizasyonun bağımsız bir belirleyicisi olarak tanımlanmıştır (DalBen *et al.* 2013). Diğer bir çalışmada, bağışıklığı baskılanmış bireylerde 93 kontrol ve 31 ilaca dirençli *P. aeruginosa* kolonizasyonu örneği eşleştirilmiştir. Kolonizasyon, siprofloksasin almak, üriner kateter kullanmak, santral venöz katetere sahip olmak ve CRP seviyesi 10 mg/L'den fazla olmakla bağlantılı olarak tespit edilmiştir (Willmann *et al.* 2014). Başka bir çalışma, *P. aeruginosa* nozokomiyal pnömonili hastaların dünya çapındaki tarihsel istatistiklerine bakarak MDR ve buna bağlı ölüm için risk faktörlerini belirlemiştir (Micek *et al.* 2015). 740 hastanın 226'sında MDR tipi enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Yaş azaltma, diyabet ve yoğun bakım ünitesine kabulün tümü bağımsız MDR belirleyicileri olarak görev yapmıştır. Hastane içi mortalite bağımsız olarak MDR ile ilişkili olarak tespit edilmiştir (MDR olmayanlar için %31,7'ye karşılık MDR olanlar %44,7, p=0,001).

Yapılan bir çalışmada, MBL aracılı direnci olan veya olmayan *P. aeruginosa* ile imipeneme dirençli (IR) olan *P. aeruginosa* karşılaştırıldı (Babu *et al.* 2014). Temel hastalık, Charlson indeksi ve diğer faktörlerin tümü, imipeneme dirençli MBL-*P. aeruginosa* grubunda görülen daha yüksek ölüm oranına aracılık etmede rol oynamıştır. Araştırmacılar, MBL üretiminden ziyade imipenem direncinin prognozun en önemli belirteci olduğunu buldular (örn. Virülans). Diğer bir çalışmada, 324 hastada ve 676 kontrolde direncin morbidite, ölüm oranı ve kalış süresi üzerindeki etkisi değerlendirildi (Barrasa-Villar *et al.* 2017). Araştırmacılar, dirençli patojeni olan bireylerin enfeksiyondan sonraki ilk 30 günde genel olarak daha fazla ölüm ve ölüm oranına sahip

olduğunu buldular. Kontrollerin %19,7'sinde ve hastaların %15,1'inde *Pseodumanas* (ikinci sırada Gram) tespit edilmiştir (Righi *et al.* 2017).

Toplam 30 çalışmanın 18'i (%60) karbapeneme dirençli Pseudomonas türleri enfeksiyonlar göstermiştir. Dünya çapında karbapeneme dirençli Pseudomonas enfeksiyonu olan hastaların %33 ile %71'i hayatını kaybetmiştir. Bulgular, karbapenemlere dirençli enfeksiyonların duyarlı olanlardan daha yüksek ölüm oranına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bir meta-analiz çalışması, mortalitedeki bu artışı bildirmiştir (Liu *et al.* 2015). Genel olarak, bu sonuçlar çoklu Akut Fizyoloji ve Kronik Sağlık Değerlendirmesi II enfeksiyonlarının varlığının, altta yatan hastalığın, entübasyonun ve kateter kullanımının direncin büyümesi için risk faktörleri olduğunu ve direncin kendisinin daha yüksek mortalite ile bağlantılı olduğunu göstermektedir.

2.6 Antibiyotik Direncinin Mekanizmaları

Bakteriler, antibiyotiklere direnmek için azaltılmış geçirgenlik, akış sistemleri, antibiyotik etkisizleştirici enzimler ve hedef değişiklikleri kullanır (Pena *et al.* 2009). *P. aeruginosa*, beta-laktamlar, aminoglikozitler, kinolonlar ve polimiksinler için içsel, kromozomal olarak kodlanmış veya genetik olarak ithal edilmiş direnç belirteçlerine sahiptir. *P. aeruginosa* en fazla direnç mekanizmasını sergiler. Penisilin içeren beta-laktamaz inhibitörleri (BLI) (klavulanik asit veya tikarsilin ve piperasilin ile tazobaktam), monobaktamlar (aztreonam), fosfomisin ve polimiksinler, Amikasin, Gentamisin ve Tobramisin aminoglikozidlerdir (kolistin, polimiksin B). *P. aeruginosa* enfeksiyonları için en sık kullanılan antibiyotiklerdir (El Zowalaty *et al.* 2015). Tek ajanlı MDR dahil olmak üzere *P. aeruginosa* suşlarının grupları, mutasyonlar, zarın geçirgenlik değişiklikleri, antibiyotikleri etkisiz hale getiren veya hedefleri değiştiren enzimlerin yatay kazanımı ve direnç belirleyici ifadeyi yöneten düzenleyici mekanizmalar hızla MDR, XDRB ve PDR suşları üretir. Bu mekanizmaların paralel gelişimi, çeşitli suşların çeşitli zorlukları tolere etmesine izin vermiştir (Fujii *et al.* 2014).

ECDC'nin 2016'da yayınlanan verilerine göre, Avrupa'daki *P. aeruginosa* suşlarının %33,9'u izlenen en az bir antibiyotik sınıfına (florokinolonlar, aminoglikozidler,

seftazidim, karbapenemler ve piperasilin-tazobaktam) karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Bu analiz, güney ve doğu Avrupa'nın tipik olarak kuzey Avrupa'dan daha yüksek direnç oranları yaşadığı, tüm antibiyotik sınıfları için ülkeler arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin, Polonya, Letonya ve Romanya'daki genişletilmiş izolatların %25 ile %50'si, Slovakya, Hırvatistan, Macaristan, Bulgaristan, Sırbistan veya Yunanistan'a kıyasla %50'den fazla karbapenemlere dirençli suşlara sahiptir. Bulgaristan, Yunanistan, Romanya, Hırvatistan ve Slovakya'da keşfedilen istilacı suşların %25 ile 50'si, yukarıda bahsedilen antimikrobiyallerin üç veya daha fazlasına karşı direnç göstermiştir (ECDC 2016).

2.6.1 Beta-laktamlar

P. aeruginosa'nın vahşi tip suşu, indüklenebilir, BLI'ye dirençli C sınıfı AmpC sefalosporinleri kodlar (Sligl *et al.* 2015). Sefamisinlere, üçüncü kuşak sefalosporinlere (C3G), karbapenem, ertapenem ve sefotaksime karşı dirençlidir. Düşük AmpC sefalosporin ekspresyonu normaldir (Öncül *et al.* 2014, Lund-Palau *et al.* 2016). *P. aeruginosa* vahşi tip suşu, C4G sefepim, karboksipenisilin, C3G seftazidim, üreidopenisilin, aztreonam, doripenem, meropenem ve imipenem'e karşı duyarlıdır. Nokta mutasyonları ve/veya indüklenmiş veya konstitütif AmpC aşırı ekspresyonu, karbapenemler dışında beta-laktam direncini azaltır. *Enterobacteriaceae*'den farklı olarak *P. aeruginosa* AmpC, sefepime müdahale eder (Lund-Palau *et al.* 2016). *P. aeruginosa*, amber sınıfı A serin β-laktamazlar TEM (Bush fonksiyonel grup 2b), PSE ve CARB (karbesilinaz, Bush fonksiyonel grup 2c) üretme yeteneğine sahiptir (Lister *et al.* 2009). Nadiren, bu enzimlerin ana karboksipenisilin ve üreidopenisilin substratları BLI'ye dayanabilir. Bu enzimler, sefepim, sefpirome ve aztreonam'a değişen derecelerde direnç gösterir, ancak seftazidime ve karbapenem, bu β-laktamaz türlerini içeren *P. aeruginosa* izolatlarına karşı sürekli olarak etkilidir (Strateva and Yordanov 2009).

P. aeruginosa'nın A Sınıfı serin genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar PER, VEB, GES ve BEL'i (ESBL) ürettiği gösterilmiştir. Büyük olasılıkla yatay gen transferinin sonucu olan üç ESBL *Enterobacteriacae* tipi enzim olan TEM, SHV ve CTX-M'nin varlığı da *P. aeruginosa*'da gösterilmiştir. Genetik olarak benzerliği düşük olan bu A

Sınıfı GSBL enzimleri, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler, C3G ve C4G (seftazidime, sefepim ve sefpirome) ile aztreonam'a direnç oluşturmasına rağmen karbapenemlere direnç göstermezler (Picão *et al.* 2009).

Bazen oksasilinazlar olarak adlandırılan D Sınıfı beta-laktamazlar, *P. aeruginosa*'da bulunur ve Bush fonksiyonel grup 2d'ye aittir. Aktif genetik elementlerin doğrudan aktarımının bir sonucu olarak *P. aeruginosa*'ya ithal edilen tek OXA tipi enzim, *P. aeruginosa*'nın doğal olarak oluşan bir oksasilinaz olan OXA-50'dir (Girlich *et al.* 2004). Yaygın oksasilinazlar olan OXA1, OXA2 ve OXA10, sefepim ile reaksiyona girme ve üreidopenisilinler ile karboksipenisilinlere direnç sağlama potansiyeline sahiptir. BLI'ye sıklıkla direnç gösterirler (Lister *et al.* 2009). OXA2 ve OXA10 ile ilgili geniş spektrumlu oksasilinazlar, aztreonam sefepim ve seftazidimin hidroliz spektrumunu genişletir. Ayrıca, BLI sıklıkla aktivitelerini azaltmaz, bu da bunların geleneksel laboratuvar yöntemleri kullanılarak tanımlanmasını zorlaştırır (Bradford 2001).

Enterobacteriaceae familyasına bağlı *P. aeruginosa* suşlarının karbapenemaz enzimleri içerdiği saptanmıştır. *P. aeruginosa,* Sınıf A KPC veya GES2 karbapenemazlar ve Sınıf B-MBL karbapenemazlar üretir (Lister *et al.* 2009). Bir karbapenemaz olan GES-2, GES-1'deki bir nokta mutasyonu ile oluşturulurken, KPC karbapenemaz, *P. aeruginosa* tarafından *Enterobacteriaceae'*den doğrudan transfer edilerek elde edilmiştir (Villegas *et al.* 2007). Bu enzimlerin çoğu, hızlı yayılmalarına yardımcı olmak için plazmitler, integronlar ve kasetler dahil olmak üzere mobil genetik elementler üzerinde kodlanır. MBL'ler BLI'ye dirençlidir ve karbapenemler (imipenem ve meropenem) dahil olmak üzere tüm β-laktamlara karşı geniş bir aktivite fantomuna sahiptir. Yalnızca monobaktam aztreonam MBL'ler tarafından parçalanmadığından ve MBL aktiviteleri genellikle diğer β-laktam direnci mekanizmalarıyla ilişkili olduğundan, geleneksel tanı yöntemleri genellikle MBL'leri dışlar (Mendes *et al.* 2004).

2.6.2 Aminoglikozitler

Aminoglikozitler modifiye edici enzimler (AME'ler), antibiyotik molekülündeki amino ve hidroksil sübstitüentlerine asetil, fosfat veya adenil grupları ekleyerek

aminoglikozitleri etkisiz hale getirir. Aminoglikozitlerin 30S ribozomal alt birim hedefi için afinitesi ve etkileri bu değişikliklerle belirgin şekilde azalır. Asetiltransferazlar (AAC), fosfotransferazlar (APH) ve nükleotidiltransferazlar aileleri, genellikle plazmitlerde (ANT) kodlanan üç AME ailesidir. AAC ve ANT aileleri, *P. aeruginosa*'da keşfedilen AME'nin büyük çoğunluğuna ev sahipliği yapmaktadır (Poole 2005a). Bu enzimler, antibiyotik molekülü üzerindeki farklı konumlarla etkileşime girdiklerinde tüm aminoglikozitlere çapraz direnç sağlamazlar. Herhangi bir *P. aeruginosa* suşunun, çeşitli aminoglikozit sübstitüentleri üzerinde etkili olan birkaç aminoglikozit modifiye edici enzime sahip olması, onları bu sınıftaki tüm antibiyotiklere karşı bağışık hale getirebilir. Amikasin sıklıkla bu enzimler için zayıf bir substrattır ve *P. aeruginosa* üzerinde diğer aminoglikozitlerden daha yüksek bir antibiyotik etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

2.6.3 Aktif akış pompaları

P. aeruginosa, sınırlı zar geçirgenliği ve aktif akış pompaları nedeniyle doğal olarak çok sayıda farklı antibiyotik sınıfına direnç gösterir (Poole 2005b). *P. aeruginosa*'daki direnç-nodülasyon-bölünme (RND) dışa akış mekanizmaları ailesi, antibiyotik direncinin gelişmesinden sorumludur (Livermore 2002). MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN ve MexXY-OprM, bir dizi antibiyotiğe direnç kazandırdığı bulunan dört ana akış sistemidir. Bu mekanizmalar üç proteinden oluşur: sitoplazmik membran akış pompası proteini MexB, MexD, MexF ve MexY; sitoplazmik ve dış zar proteinleri arasındaki periplazmik boşluktaki protein ve dış zar gözenek proteini OprM. Yalnızca elde edilen dirençte bulunan diğer 2 mekanizmanın aksine, MexAB-OprM ve MexXY-OprM hem doğal hem de elde edilmiş dirençte yer alır. Antibiyotik baskısının getirdiği düzenleyici sistem modifikasyonlarından sonra bu dışa akış mekanizmaları aşırı ifade edildiğinde, polimiksinler hariç her türlü antibiyotiğe direnç ortaya çıkar (Strateva and Yordanov 2009).

2.6.4 Membran geçirimsizliği ve porin değişimi

Aminoglikozit, beta-laktam ve kinolon direncinin tümü, olası mekanizmalar olarak membran geçirgenliği veya azaltılmış geçirgenlik ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin,

tekrarlanan antibiyotik basıncına maruz kalan kistik fibroz izolatları sıklıkla bu direnç mekanizmasına sahiptir. LPS'deki değişiklikler, substrat absorpsiyonu ile ilgili membran proteinlerindeki modifikasyonlar ve taşıma sistemlerinin çalışması için gerekli olan membran enerjileriyle ilgili enzim gelişimlerinin inaktivasyonu, membran geçirimsizliği ile sonuçlanabilecek yollardan sadece birkaçıdır (Lambert 2002). Beta-laktamlar söz konusu olduğunda, porin OprD'nin imipenemin ve daha küçük bir boyuta kadar meropenem artırdığı genel olarak bilinir. Azalan imipenem duyarlılığı, değişen OprD yapısından ve/veya azalmış ifadeden kaynaklanır. Yaygın olarak akış mekanizmalarının aktivasyonu ile birleştirilen OprD'nin modifikasyonu, imipenemin yanı sıra kinolonlar ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotik sınıflarına karşı yüksek derecede dayanıklılığa katkıda bulunur (Mesaros *et al.* 2007).

2.6.5 Hedef değişikliği

Hedef modifikasyonu, *P. aeruginosa*'da 16S rRNA metillenmiş aminoglikozitler, penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) modifikasyonu ile β-laktamlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV mutasyonları ile florokinolonlar ve LPS modifikasyonu ile polimiksinler için bir direnç mekanizması olarak kabul edilmiştir. Aminoglikozitlere karşı yüksek düzeyde dayanıklılık, 16S rRNA'nın RmtA veya RmtB metilazlar tarafından metilasyonuyla sağlanır. Bunlar, plazmitler ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementler üzerindeki genler tarafından yapılır (Doi and Arakawa 2007).

Ancak bakteri kromozomu üzerinde bulunan genlerin hedef yerleri değiştirildiğinde beta-laktamlara ve kinolonlara karşı direnç oluşur. Penisilin bağlayıcı protein4'ü (PBP4) değiştirdikten veya PBP3'ü aşırı ifade ettikten sonra, *P. aeruginosa* sporadik olarak artan penisilin hedef direnci göstermiştir (Yamane *et al.* 2004).

2.7 *P. aeruginosa*'nın Teşhisi

P. aeruginosa suşlarını ayırt etmek ve antibiyotik yönetiminin işleyişi için hızlı antibiyotik duyarlılık testi (AST) sağlamak için bir dizi teknik ve prosedür kullanması

gerekir. Ayrıca kistik fibrozis gibi klinik durumlarda uzun süreli kolonizasyonu açıklamak ve hastane ortamlarında epidemiyolojik salgınları takip etmek için mobil genetik bileşenlerde kodlanan direnç mekanizmalarını bulmayı mümkün kılan analitik tekniklere ihtiyaç vardır. Ortak besiyerinde gelişen mikrobiyal kolonilerin görünümü ve fenotipik tanımlamasına dayanarak, *P. aeruginosa* basit prosedürler kullanılarak tanımlanır. Potansiyel koloniler, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF) gibi çağdaş yöntemler kullanılarak hızlı bir şekilde tanımlanabilir. Gerekirse *P. aeruginosa,* polimikrobiyal ortam veya klinik örneklerden, örneğin seçici ortamlar kullanılarak ayrılabilir (Croxatto *et al.* 2012).

P. aeruginosa suşu tiplemesi, tür düzeyinde tanımlama için kullanılanlardan daha seçici performansa sahip ekstra laboratuvar teknikleri gerektirir. Bu, epidemiyolojik hastane salgınlarını izlemek, hastalık salgınlarını belgelemek ve yayılmalarını yavaşlatmak veya durdurmak için gereklidir. Darbe alan jel elektroforezi (PFGE), kromozomal restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi analizi (RFLP) ve multilokus sekans tiplemesi (MLST) moleküler yöntemlerin bazı güncel örnekleridir (Cholley *et al.* 2015). Gelecekte, bu tekniklerin yerini, geleneksel moleküler tiplendirme süreçlerinden önemli ölçüde daha yüksek ayrım gücü sunan hızlı genom dizileme ve yüksek verimli dizileme teknolojileri alabilir (Buchan and Ledeboer 2014, Fernández *et al.* 2013). Yanlış açıklama değerlendirmesine (Hassas, Orta, Direnç), büyük hatalara (yanlış dirençli) ve çok büyük hatalara neden olabilecek yanlış ham belirtilerin (disk difüzyonu, MİK, otomatik sistemler) rapor edilmesini önlemek için teşhis laboratuvarlarının faydaları ve kullanılan çeşitli tekniklerin dezavantajlarıNI (yanlış duyarlı) tam olarak anlaması gerekir (McMullen *et al.* 2017).

2.8 Moleküler Teşhis ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonu, DNA polimeraz enzimi Taq polimeraz, dNTP'ler ve DNA polimerlerinin özel veya rastgele başlatıcılarını kullanarak kısa DNA dizilerini artırabilen hücre dışı bir enzimatik reaksiyon olarak tanımlanabilir. Reaksiyon birkaç rotordan oluşur ve her döngü üç aşama içerir (Green and Sambrook 2019). Bu teknik, dünyadaki genetik araştırma laboratuvarlarında popüler ve yaygındır. Ayrıca çoğu bilimsel

çalışmada benimsenen temel haline gelmiştir. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA göstergeleri, RAPD-PCR'dir. PCR teknolojisine ve etki prensibine dayanan göstergelerden biri, yüksek sitozin içeriğine ve %50-70'lik yönlere sahip 10 nitrojen bazından oluşan rastgele bir dizi ile kısa öneklerin kullanımına dayanmaktadır. Bu başlatıcılar daha sonra DNA şeridi üzerindeki tamamlayıcı bölgelere bağlanmaya başlar. Test sonuçlarında ortaya çıkan tutarsızlıklar, başlatıcı diziyi tamamlayan sitelerde giriş ve silme ve nitrojen bazının değiştirilmesi gibi mutasyonlar nedeniyle, tek tek türler için DNA bandının nitrojen bazlarının sekanslarından veya kalıp DNA bandına ön ekin konumunun değiştirilmesi kaynaklanmaktadır (Schmidt and Bleichert 2020).

2.9 DNA Dizilimi

"DNA dizilimi" terimi, DNA molekülündeki nitrojen bazlarını (Adenin, Guanin, Sitosin ve Timin) tanımlamaya yönelik teknikleri ifade eder. DNA, nihai olarak her bir genetik ürünün ve organizmaların her bir bileşeninin yapısını belirleyen bilgi veri tabanıdır. Genetik kalıtımı oluşturan eksiksiz uygulama seti, DNA boyunca baz dizilişinde bulunur.

2.10 Virulans Faktörleri ve Genler

Ekzotoksin A, ekzoenzim S, elastaz ve sialidaz, *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu sayısız virülans faktöründen sadece birkaçıdır. Bu bileşenler, hücreden hücreye sinyal mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ekzotoksin A ve virülans faktörleri protein üretimini engeller (Ghafoor *et al.* 2011).

Pel eksikliği olan *P. aeruginosa* mutantı ve yabani tipi tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, karbonhidrat bileşenleri açısından incelenerek selülaz işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçlar, Pel'in glikoz açısından zengin, selüloz benzeri bir polisakkarit olduğunu göstermiştir (Vasseur *et al.* 2005). Bunlara ek olarak, farklı bir araştırma, pelikülün lipopolisakkaritlere benzer moleküllerden oluştuğunu ortaya çıkarmıştır (8 ekzoenzim S, bir T3SS tarafından salgılanır) (Coulon *et al.* 2010).

Ekstrasitoplazmik sigma faktörü AlgU'nun neden olduğu aşırı aljinat üretimi, kistik fibroz hastalarında bildirilenler gibi kalıcı enfeksiyonlara neden olan bazı *P. aeruginosa* izolatlarının bir özelliğidir (Mougous *et al.* 2006). Anti-sigma faktörü MucA normalde AlgU'yu sitoplazmik zarda tutar. AlgU, MucA nedeniyle hedef promotörlere bağlanamaz veya bunları etkinleştiremez (Irie *et al.* 2010). AlgU, MucA'dan salındıktan sonra aljinat üretmek için çok önemli olanlar da dahil olmak üzere bir dizi geni aktive eder (Ramsey and Wozniak 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmamızda kullanılan materyaller beş alt başlık olarak incelenmiştir.

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları ve araçları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Laboratuvar cihazları

Makine	**Şirket**	**Menşei**
Otoklav	Gallankamp	İngiltere
Hassas Denge	Kernpfb	Almanya
Işık mikroskobu	Olympus	Çin
Kuluçka makinesi	Jrad	Çin
Santrifüj	Gallankamp	İngiltere
Millipore filtreler (0,22) µm	Difco	ABD
Sıcak plaka	Gallankamp	İngiltere
Ependorff tüpleri	Sigma	İngiltere
Konik şişeler	BBL	ABD
Tek kullanımlık Petri kapları	Al-Hani	ABD
Test tüpleri	Superestar	Hindistan
Slaytlar ve kapak slaytları	Superestar	Hindistan
Sterilize pamuklu çubuklar	SterellinLtd	İngiltere
Standart tel döngü	Himedia	Hindistan
Elektroforez sistemi	CBS, Scientif	ABD
U.V. transillüminatör	Vilber	Fransa
AURA™ PCR Kabini		İtalya
Hızlı Mini santrifüj	Bio San	Almanya
Termostat	Bio San	Almanya
Vorteks	Digsystem	Almanya
Mini güç kaynağı		Çin
Termal Döngüleyici	Labnet	ABD
Belge sistemi	Labnet	ABD
Kombi-spin	Bio San	Almanya
Biyopet Değişkenler	Gallankamp	Almanya

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasallar

Kimyasal malzeme	**Şirket**	**Menşei**
H_2SO_4	BDH	İngiltere
NaCI	BDH	İngiltere
Etanol %95	Merck, KgaA	Almanya
H_2O_2	BDH	İngiltere
Üre	BDH	İngiltere
Jelatin	BB	ABD
HCI	BDH	İngiltere
Mutlak metanol	Merck KgaA	Almanya
İsoamil alkol	BDH	İngiltere
Setramid (N-asetil-NNNtrimetil amonyum bromür)	BDH	İngiltere
α-naftol	BDH	İngiltere
Gliserol	BDH	İngiltere
Glikoz	BDH	İngiltere

3.1.3 Kullanıma hazır kültür besiyeri

Çalışmada kullanılan kullanıma hazır implantasyon halkaları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Kültür besiyeri

Ortam	**Şirket**	**Menşei**
Kanlı agar tabanı	Himedia	Hindistan
Çikolata agarı	Himedia	Hindistan
Setrimid agar	Himedia	Hindistan
Mueller-Hinton agar	Oxoid	İngiltere
Simmons sitrat agar	Himedia	Hindistan
MacConkey agar	LAB M limited	Birleşik Krallık
Beyin-kalp infüzyon suyu	Oxoid	İngiltere
Üre agar bazı	Himedia	Hindistan
Besin agarı	LAB M limited	Birleşik Krallık
Besin suyu	LAB M limited	Birleşik Krallık
Besin jelatin ortamı	ACCUMIX	Hindistan

3.1.4 Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotik listesi, konsantrasyonları ve etkililik ölçütleri Çizelge 3.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.4 Antibiyotikler

Antibiyotikler	Sembol	Konsantrasyon (µg)	Dayanıklı	Orta seviye	Hassas
Piperasilin/Tazo Baktam	PTZ	75 ug	<18	-	>18
Sefazolin	CZ	30 ug	<14	15-18	>19
Seftazidim	CAZ	30 ug	<14	15-17	>18
Sefepim	CPM	30 ug	<19	-	>19
İmipenem	IPM	10 ug	<20	-	>21
Amikasin	AK	30 ug	<14	15-16	>17
Antibiyotik	CN	10 ug	<9	9-12	>12
Siprofloksasin	CIP	5 ug	<15	15–20	>21
Levofloksasin	LVX	5 ug	<20	-	>20
Tigesiklin	TGC	30 ug	<15	16-32	>33

3.1.5 DNA ekstraksiyonu ve PCR testi malzemeleri

Çalışmada kullanılan DNA ekstraksiyonu ve PCR testi malzemeleri Çizelge 3.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.5 DNA ekstraksiyonu ve PCR testi malzemeleri

Malzeme	Katalog no	Şirket
Agaroz	8100,11	Condalab/USA
Kırmızı güvenli boyama	21141	Intron/Korea
6X boya yükleme	21161	Intron/Korea
Markör 100 bp	24073	Intron/Korea
PCR ön karışım	25025	Intron/Korea
TBE tampon 10 X	IBS.BT004	Intron/Korea
Primer	---	Alpha DNA/Canada
DNA ekstraksiyon Mini kit	17045	Intronbiotechnology/Korea

3.2 Yöntemler

Çalışmamızda kullanılan yöntemler sekiz başlık altında incelenmiştir.

3.2.1 Hastalar ve kontrol

Çalışmada kullanılacak olan materyal, 18 Mart- 9 Ekim 2022 tarihleri arasında Bağdat'taki Yarmouk Eğitim Hastanesine başvuran 150 hasta (idrar yolu enfeksiyonu olan) ve 50 sağlıklı (kontrol) bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubu, hasta bireylerin ailelerinde bulunan sağlıklı bireylerden ve sağlık personelinden oluşmakta olup yaşları 10-50 arasında değişmektedir. Hastalar hastaneye yatırıldığında, diyabetik durum, böbrek yetmezliği vb. dışında herhangi bir idrar yolu enfeksiyonu belirtisi olup olmadığı bilgileri alınarak not edildi.

3.2.2 Örneklerin toplanması

Her kişinin idrar örneği mümkün olan en aseptik şekilde alındı. Aseptik bir ortamda her denekten bir orta akım idrar örneği (MSU) örneği toplandı. Toplamadan sonraki 30 dakika içinde, tüm numuneler steril vidalı kapaklı kaplarda inceleme ve kültür için klinik laboratuvara gönderildi.

3.2.3 Doğrudan inceleme

Doğrudan inceleme iki şekilde yapılmıştır.

3.2.3.1 İdrar örneğinin mikroskobik incelenmesi

İdrar yolu semptomları veya anormal bir makroskopik analiz olduğunda, idrar tortusunun mikroskobik değerlendirmesi tüm analizlerin önemli bir bileşenidir. İdrar örnekleri santrifüjlendikten sonra süpernatan çıkarıldı ve tortu temiz bir sürgü üzerine aktarıldı. Ardından idrar tortusunun üzerine bir örtü sürgüsü yerleştirildi. Herhangi bir irin hücresi, bakteri hücresi, alçı, kristal, eritrosit veya epitel hücresi bulduğunda, doğrudan yüksek güçlü bir ışık mikroskobu altında incelemeye alındı.

3.2.3.2 İdrar numunelerinin gram boyaması

İyi karıştırılmış ancak santrifüjlenmemiş idrarın gram boyaması teşhis için yardımcı olabilir. 100,000 bakteri/mL idrar bakteri yoğunluğu, yüksek büyütme alanı başına bir veya daha fazla bakterinin saptanması ile ilişkilidir. Ek olarak, maya, *Escherichia coli* gibi büyük Gram-negatif basiller, *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroskobik Gram-negatif basiller ve enterokoklar gibi Gram-pozitif koklar arasında ayrım yapabilir.

3.2.4 Dolaylı inceleme

Dolaylı inceleme iki şekilde yapılmıştır.

3.2.4.1 İdrar kültürü

Elde edilen idrar numuneleri, 0,001 mililitre idrar ölçen kalibre edilmiş bir bakteriyolojik öze kullanılarak doğrudan sürme yöntemiyle hazırlanan besiyerine (MacConkey agar, Blood agar plakları ve Chocolate agar) doğrudan kültürlendi, aşılanmış plaklar aerobik olarak gece boyunca 37°C'de inkübe edildi ve ertesi gün büyüme açısından incelendi, eğer üreme saptanmadıysa plakalar, negatif kültürler olarak atılmadan önce 24 saat daha yeniden inkübe edildi. Bakterilerin pozitif büyümesi, *Enterobacteriaceae* için, kan ve MacConkey's agar üzerinde, *P. aeruginosa* ise Cetrimide agar üzerinde kültürlendi.

3.2.4.2 İzole edilmiş bakterilerin tanımlanması (Mikroskobik inceleme)

Gram boyamalarına, boyutlarına, şekillerine ve hücre düzenlemelerine bağlı olarak, mikroskobik inceleme bakterileri kok, basil ve Gram-pozitif veya Gram-negatif bakteriler olarak sınıflandırmak için kullanıldı. Kültür ortamı üzerindeki koloni morfolojisi, 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından incelenmiştir. *P. aeruginosa* rutin laboratuvar besiyerlerinde kolayca üredi. Kanlı agarda koloniler düz ve beta-hemolitik olarak gözlemlendi. *P. aeruginosa* izolatlarının çoğu, besleyici agarda görülebilen pigmentler üretir. MacConkey agarda *P. aeruginosa* soluk ve karakteristik pigmentler olarak

belirlendi. Gram pozitif veya gram negatif bakteri olup olmadığını bakterilerin morfolojisini, boyutunu ve türünü saptamak için gram boyama yapıldı.

3.2.5 VITEK teşhisi

Floresan tabanlı teknolojileri kullanarak bakteri ve seçim testlerini tespit etmek için yeni bir otomatik yöntem VITEK 2 yöntemidir (BioMe'rieux). Araştırmalar, mikrobiyal kültür toplandığında, yöntemin güvenilir tanımlama ve duyarlılık bulguları verdiğini göstermiştir (Ling *et al.* 2003). Yetmişli yıllarda bu sistem ana inokulumun hazırlanmasından sonra tanımlama ve AST için gerekli tüm prosedürleri otomatik olarak alan ve standartlaştıran bir otomatik tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi olarak geliştirilmiştir (Funke *et al.* 1998). Cihaz, her testte her 15 dakikada bir kinetik analizleri sağlar. Optik sistemler, bulanıklık, flüoresan ve kolorimetrik sinyalleri kaydetmek için bir fotometre ve çok kanallı ölçümlerden oluşur. Cihaz, enstrüman makinesi ve bilgisayar olmak üzere iki temel bileşenden oluşur ve makine beş temel bileşenden oluşur.

3.2.6 Bakteri izolatlarının bakımı ve saklanması

Bakterilerin tanımlanmasının ardından, besleyici agar içeren slaytlara bakteri enjekte edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 4°C'de saklandı. Her ay bu prosedür tekrarlandı.

3.2.7 Bulanıklık ölçümü

Sulu çözeltiler çok temiz su kullanılarak üretilmiştir. %1 sulu baryum klorür ve %1 sülfürik asit alikotları, McFarland bulanıklık standartlarını oluşturmak için birleştirildi. 1000 mg L-1 bromotimol mavisi stok solüsyonu üretmek için katı boya, pH 9,5'te uygun hacimde 0,1 mol L-1 borik asit içinde çözüldü.

BTB çalışma standartları, çözücü olarak aynı tamponu kullanırken stok çözeltiyi kademeli olarak seyrelterek geliştirilmiştir. Özel tüp tutucu, Solidworks 3D yazılımı

(Dassault Systèmes Solidworks Corporation, MA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan madde, akrilonitril bütadien stirenin (ABS) termoplastik bir versiyonu olan ABSplus (Stratasys, Eden Prairie, MN, ABD)'dır. Tutucunun tabanı, sağlam bir çelik platformla güçlendirildi ve stabiliteyi artırmak için tutucunun altından 20 mm uzağa SMA (SubMiniature versiyon A) bağlantılı iki adet 6 mm'lik yönlendirme merceği yerleştirildi. Elektronik Ek Malzeme, tüp tutucunun ölçümleri ve parçaları hakkında derinlemesine ayrıntılar sağlar.

Bu çalışmada kullanılan algılama sistemi birimi, Spectra Suite 2.0.162 programı tarafından çalıştırılan bir UV-VIS USB4000 minyatür spektrofotometre ve bir LS-1 görünür ışık kaynağından oluşmaktadır. Işık, iki adet 400 m SMA sonlandırılmış optik kablo üzerinden iletildi. Karşılaştırma amacıyla seçilen büyüme deneylerinde OD'yi ölçmek için bir Jasco V-530 UV-Vis masaüstü spektrofotometresi kullanıldı. Bu örnekte, 10 mm tek kullanımlık plastik küvetler kullanıldı. OD ölçümleri 600 nm'de, BTB standartları ise 625 nm'de ölçülmüştür. Sıvı besiyeri, testler boyunca bir kültür kürü olarak kullanıldı.

3.2.8 VITEK 2 ile antimikrobiyal duyarlılık testi

Üreticinin talimatlarına göre duyarlılık testleri, yazılım sürümü 5,01 ve AST-GP71 (stafilokoklar) veya AST-GP2 (Enterobacteriaceae) kartları kullanılarak VITEK 2 (bioMérieux, Inc., Durham, NC) sisteminde yapıldı. 24 saatlik kanlı agar plağından izole edilmiş koloniler kullanılarak her bir izolat, her iki teknik (BAP) kullanılarak eş zamanlı olarak incelenmiştir. Her testin aşılanmasının ardından, aşı süspansiyonunun bir bölümünün bir kan agar plakasına alt kültürlenmesi ve 18 ile 24 saat inkübe edilmesiyle saflık plakaları oluşturuldu.

3.3 Moleküler Tanı

Bu bölüm dört başlık altında incelenmiştir.

3.3.1 İncelenen bakterilerden DNA ekstraksiyonu

- Çalışmanın bakteri örneklerinden alınan DNA, Geneaid Co. tarafından oluşturulan analiz kiti kullanılarak ekstrakt edildi.
- Gram-negatif bakteri numunesi hazırlarken, Bakteri 5 mililitrelik uygun kültür besiyerine aşılandı ve kültür sonra bir spektrofotometre üzerinde 0,8 ila 1,0 OD600 değeri elde edilene kadar uygun sıcaklıkta inkübe edildi.
- Daha sonra, 1 ile 2 mL içeren kültive edilmiş bir bakteri hücresi 2 mL'lik bir tüpe yerleştirildi.
- Bakterileri 1 dakika süreyle 13,000 rpm'de peletler halinde santrifüjlendi, ardından süpernatantın 50 mikrolitresi hariç hepsini atıldı. Geriye kalan 50 mikrolitre süpernatan, hafifçe vurarak veya pipetleyerek yeniden süspansiyon için kullanıldı.
- Bakteri peleti hafifçe sarsılarak veya şiddetli bir şekilde vorteksleyerek tamamen kalan süpernatan içinde yeniden süspanse edildi.
- Numune tüpüne 300 µL Buffer MG, 20 µL Proteinaz K ve 5 mikrolitre RNaz A Solüsyonu eklendi ve vorteksle kuvvetlice yeniden süspanse edildi. Daha sonra lizat, 65°C 15 dakika inkübe edildi.
- Parçalama tamamen tamamlandıktan sonra, lizata 250 µL Buffer MB ilave edildi ve 5-6 kez pipetleme veya hafifçe ters çevirme yoluyla karıştırıldı.
- Lizata 250 µL %80 etanol eklendi ve pipetleme yaparak veya 5-6 kez hafifçe ters çevirerek karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra, kapağın içindeki damlaları çıkarmak için aşağı doğru döndürüldü.
- Adım 8'deki karışımdan 750 µL'yi 2,0 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş döndürme kolonuna pipetlendi. 13,000 rpm'de (RT) 1 dakika santrifüjlendi ve akış ve toplama tüpü tamamen atıldı.
- Bakteri peleti hafifçe vurularak veya kuvvetlice vorteksleyerek tamamen kalan süpernatan içinde yeniden süspanse edildi.
- Numune tüpüne 300 µL Buffer MG, 20 µL Proteinase K ve 5 µL RNase A Solution eklendi ve vorteksle kuvvetlice yeniden süspanse edildi. Daha sonra lizat, 65°C'de 15 dakika süreyle inkübe edildi.
- Parçalama tamamen tamamlandıktan sonra, lizata 250 µL Buffer MB ilave edildi ve 5-6 kez pipetleme veya hafifçe ters çevirme yoluyla karıştırıldı.

- Lizata 250 µL %80 etanol eklendi ve pipetleme yaparak veya 5-6 kez hafifçe ters çevirerek karıştırıldı. Karıştırdıktan sonra, kapağın içindeki damlaları çıkarmak için aşağı doğru döndürüldü.
- Döndürme kolonuna 2,0 mL'lik bir toplama tüpü yerleştirildi ve 8. adımdaki sıvıdan 750 litre pipetlendi. Numuneyi 13,000 rpm'de (RT) bir dakika santrifüjlendikten sonra akış ve toplama tüpleri tamamen atıldı.
- Bakteri peleti, kalan süpernatanda tamamen yeniden süspanse etmek için agresif bir şekilde hafifçe vuruldu veya vortekslendi.
- Numune tüpüne 300 µL Tampon MG, 20 µl Proteinaz K ve 5 µL RNaz A Solüsyonu eklendi ve yeniden süspanse etmek için hızla vortekslendi. Lizat daha sonra 65°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Tam parçalanmanın ardından, lizata 250 µL Buffer MB eklendi ve karışımı karıştırmak için 5-6 kez hafifçe ters çevrildi vepipetlendi.
- Lizata 250 µL %80 etanol eklendi ve yavaşça ters çevrildi veya karıştırılması için 5-6 kez pipetlendi. Birleştirdikten sonra, kapaktan son damlamaları almak için aşağı doğru döndürüldü.
- Döndürme kolonuna 2,0 mL'lik bir toplama tüpü yerleştirin ve 8. adımdaki karışımdan 750 µL pipetlendi. Numuneyi 13,000 rpm'de (RT) bir dakika santrifüjlendi, ardından akış ve toplama tüpleri tamamen atıldı.
- Döndürme kolonuna 700 µL MW Tamponu eklendikten sonra, döndürme kolonu yeni bir 2,0 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 13,000 rpm'de bir dakika santrifüjlendi. Akışı atıldıktan sonra kurutmak için bir dakika daha santrifüjleme yapıldı.
- Spin kolonu yeni bir 1,5 mL'lik tüpe (verilmemiştir) yerleştirildikten sonra, 50-100 µL Buffer ME ile ıslatıldı. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra süzmek için 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

3.3.1.1 Agaroz jel hazırlama ve DNA'nın elektroforezi

Ekstraksiyondan sonra DNA fragmanlarını belirlemek, agaroz jel üzerindeki PCR etkileşim sonucunun ışın boyutunu ayırt etmek veya standart DNA'nın varlığında PCR etkileşim sonucunu tespit etmek için elektroforez kullanıldı (Şekil 3.1).

3.3.1.2 Agaroz jelin hazırlanması

Sambrook *et al.* (1989) yapımış oldukları çalışmada, %1,5 yoğuşmalı agaroz jel oluşturmak için önceden hazırlanmış 100 mililitre TBE tamponunda 1,5 gram agarozun eritilmesi gerektiğini belirtmiştir. Agaroz kaynama durumuna getirldikten sonra 45-50°C'de soğutuldu. Numuneler için delikler açmak üzere tarak sabitledikten sonra, agaroz destek plakası ve içine jelin döküleceği dökme plakası hazırlandı. Hava kabarcıkları oluşmasını önlemek için dikkatlice döküldükten sonra jelin soğuması için 30 dakika bekletildi. Katı agaroz tarağı dikkatlice çıkarıldı. Plaka, elektroforez tankının yatay elektroforez ünitesindeki standına sabitlendi ve jelin yüzeyini kaplayan tanka TBE tamponu eklendi.

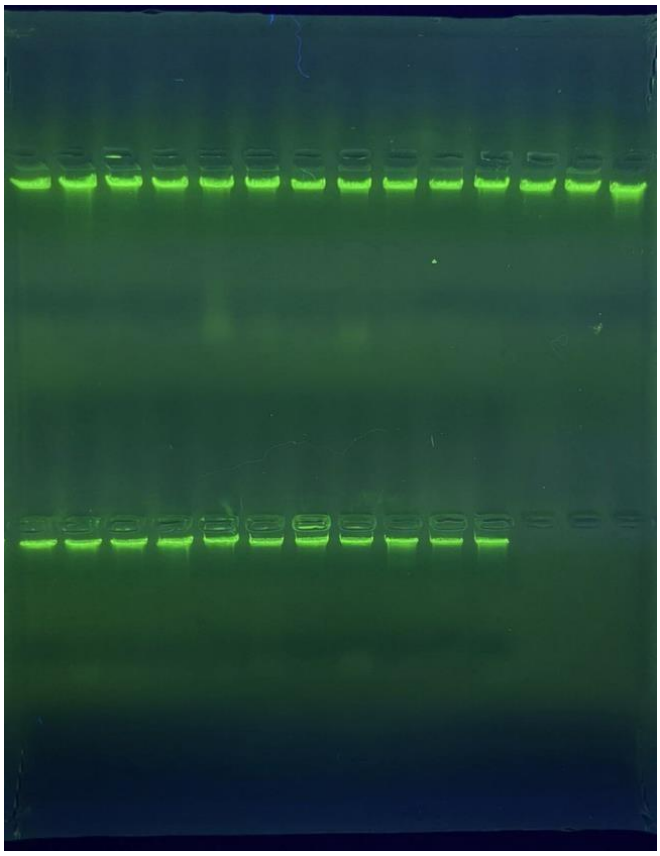
3.3.1.3 Numunenin hazırlanması

3 µL yükleme tamponu (İntron/Kore) ile 5 µL DNA birleştirildikten sonra elektroforezdeki jelin deliklerine uygulandı. 1-2 saat boyunca, tentür jel diğer tarafa ulaşana kadar 70 v/cm^2'lik bir elektrik akımı uygulandı. 500 mL damıtılmış su ve 30 µL Kırmızı Güvenli Nükleik Asit Boyama Solüsyonu içeren bir havuza yerleştirildikten sonra jel, 336 nm dalga boyuna sahip bir UV kaynağı kullanılarak test edildi.

3.3.1.4 RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu

Yeni ve güvenli bir nükleik asit boyası olan RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), agaroz jellerinde nükleik asidi tespit etmek için kullanılan etidyum bromür (EtBr) boyasına bir alternatiftir. DNA veya RNA'ya bağlandığında yeşil floresan verir. Nükleik aside bağlandığında, bu yeni boya, biri 309 nm'de ve diğeri 419 nm'de ortalanmış iki floresan uyarma maksimumu sergiler. Ayrıca, 514 nm'de tek bir görünür uyarım sergiler, DNA'ya bağlı Figure Red Safe, 537 nm kütle merkezi ile floresans yayar. RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) EtBr kadar hassastır. EtBr boyama prosedürü, Red Safe Nükleik Asit Boyama Solüsyonunu (20,000x) boyamak için kullanılabilir. RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), Ames testinde iyi

bilinen güçlü bir mutajen olan EtBr'den çok daha az mutasyona neden olur. Ek olarak, fare spermatosit kromozomal aberasyon testi ve fare iliği kromofil eritrosit mikronükleus testi, RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) için negatif sonuçlar verir. Bu nedenle agaroz jellerdeki nükleik asidi saptamak için EtBr yerine RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) kullanmak daha faydalı olmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi

3.3.2 Jelden DNA ekstraksiyonu

Geneaid tarafından oluşturulan çeşitli analizleri kullanarak ve adımlara uygun olarak bir nükleotid dizi testi yapmak için, PCR reaksiyonu tarafından üretilen ışınlar jelden çıkarıldı:

- Paket, steril bir bıçak kullanılarak agaroz jelden dilimlenir ve paketin etrafındaki jelin çoğu alınır.

- Eppendorf'a az miktarda (yaklaşık 300 mg) jel uygulandı. Forteke aparatını kullanarak 1,5 mL DF (Deterjansız) ayarlı solüsyon eklendi ve 500 mikrolitresini karıştırıldı.
- Tam bir jöle parçası sağlamak için tüp, ucu her üç dakikada bir döndürülerek 55 ile 60℃ derece sıcaklıkta 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi boyunca tüpün oda sıcaklığında soğumasını beklendi.
- 800 mikrolitre numune kombinasyonu, toplama tüpünde kurulu olan DF kolonuna aktarılır ve 16,000 rpm'lik santrifüj ile 30 saniye çalıştırıldıktan sonra sızıntı suyu atıldı.
- DF sütunu bir kez daha toplama tüpüne takılır ve 600 mikrolitre yıkama solüsyonu eklendikten sonra sistem bir dakika bekletildi.
- Sızıntı suyunu gidermek için aynı kuvvette 16,000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenerek önceki prosedür tekrarlandı.
- Ardından, DF sütununun kuru olduğundan emin olmak için 3 dakikalık bir santrifüjleme yapıldı.
- DF kolonu 1,5 mL'lik yeni bir tüpe aktarılarak toplama tüpü atıldı.
- Kolonun ortasına 20–50 mikrolitre Elüsyon tampon çözeltisi eklendikten sonra çözünen solüsyonun emildiğinden emin olmak için iki dakika bekletildi.
- Çözünmüş DNA elde etmek için 16,000 rpm'de iki dakika santrifüjlendi.

3.3.3 PCR

- PCR reaksiyonları için gereken konsantrasyonu elde etmek için, her çalışma örneğindeki DNA konsantrasyonu, TE (Tris-EDTA) çözeltisi seyreltmesi ile 50 g/mikrolitre'ye ayarlandı.
- DNA örneği ve genlere uygun olan başlatıcı, ingiliz şirketi tarafından tedarik edilen 0,2 mL Eppendorf tüpünün içindeki ana karışım bileşenleriyle birleştirdikten sonra, her bir PCR reaksiyonunun ana reaksiyon karışımı oluşturuldu. Reaksiyon hacmi DW ile 20 mikrolitreye sabitlendi. Karışım, reaksiyon bileşenlerinin karıştırıldığından emin olmak için Mikrofuge cihazında 3-5 saniyelik bir süre boyunca karıştırıldı.

- Daha sonra elde edilen reaksiyon, Thermo cycler cihazına yerleştirilerek uygun program seçildikten sonra işleme tabi tutuldu.
- Hacimsel manuel Ladder DNA eklendikten sonra, numune önceden hazırlanmış agaroz jel tankına %2 konsantrasyonda yerleştirildi.
- Biolaps'ta bulunan numuneler 60-70 dakika boyunca bir elektroforez cihazı kullanılarak taşındı ve Jel daha sonra bir UV trans-lüminasyon cihazı kullanılarak fotoğraflandı.

3.3.4 AlgU ve PelF genlerinin tespiti

Primerler liyofilize edildi, serbest ddH2O içinde çözülerek stok solüsyonu olarak 100 pmol/L'lik bir nihai konsantrasyon elde edildi ve -20°C'de muhafaza edildi. Primer süspansiyonu olarak 10 pmol/L konsantrasyonda, 90 L serbest ddH_2O suda 10 L stok solüsyonu hazırlandı (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 AlgU ve PelF genlerininin spesifik primerleri

Hedef genler	**Primer dizilimi (5'-3')**	**Amplikon boyutu(bp)**
AlgU	F-CGATGTGACCGCAGAGGATG	292
	R-TCAGGCTTCTCGCAACAAAGG	
PelF	F-GAGGTCAGCTACATCCGTCG	789
	R-TCATGCAATCTCCGTGGCTT	

3.3.4.1 Maxime PCR preMix kiti (i-Taq) 20µLrxn

Prensip: Intron'un Maxime PCR Premiks Kiti, deneyime ve amaca dayalı diğer Premiks Kiti türlerine ek olarak 2X Master mix çözümü içerir. Maxime PCR Premiks Kiti (i-Taq), Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, reaksiyon tamponu ve daha fazlası dahil olmak üzere bir rxn PCR için gerekli tüm bileşenleri içeren bir kittir. Bu ürün en pratik sistemle en iyi sonuçları sunar. Bunlardan birincisi, PCR için gerekli tüm bileşenlere sahip olması nedeniyle, tek yapılması gereken bir şablon DNA, primer seti ve D.W. eklemektir. İkincisi, Elektroforez için jel yüklemesi için herhangi bir ön işlem yapmaya gerek

kalmadan jel yükleme tamponunun varlığıdır. Hızlı ve kolay kullanım süreci sayesinde çeşitli örnek deneyleri için uygundur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Maxime PCR preMix kitinin bileşenleri (i-Taq)

Materyal	**Hacim**
I-Taq DNA polimeraz	5 U/µL
DNTP'ler	2,5 mm
Reaksiyon tamponu (10X)	1 X
Jel yükleme tamponu	1 X

Gen teşhisi: Teşhis geni için spesifik etkileşim karışımı Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

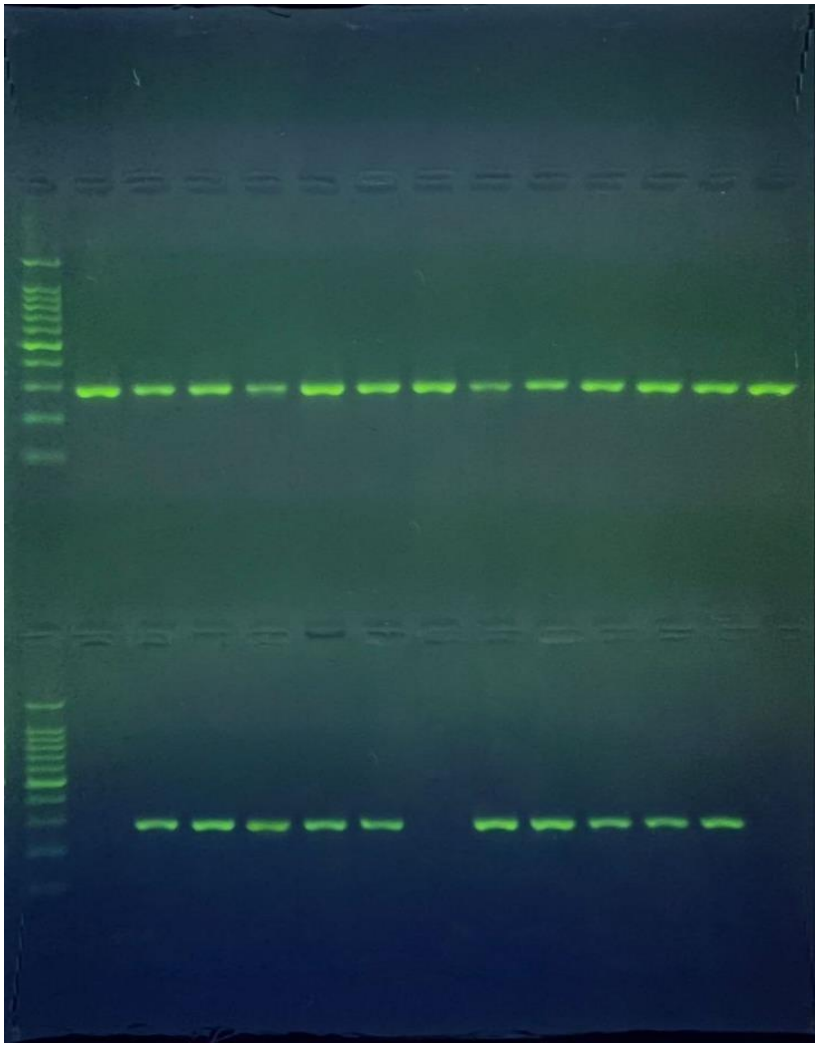
Çizelge 3.8 Teşhis geni için spesifik etkileşim karışımı

Bileşenler	**Konsantrasyon**
Taq PCR Ön Karışım	5 µL
İleri primer	10 pikomol/µL (1 uL)
Ters primer	10 pikomol/µL (1 uL)
DNA	1,5 µL
Damıtılmış su	16,5 µL
Hacim	25 µL

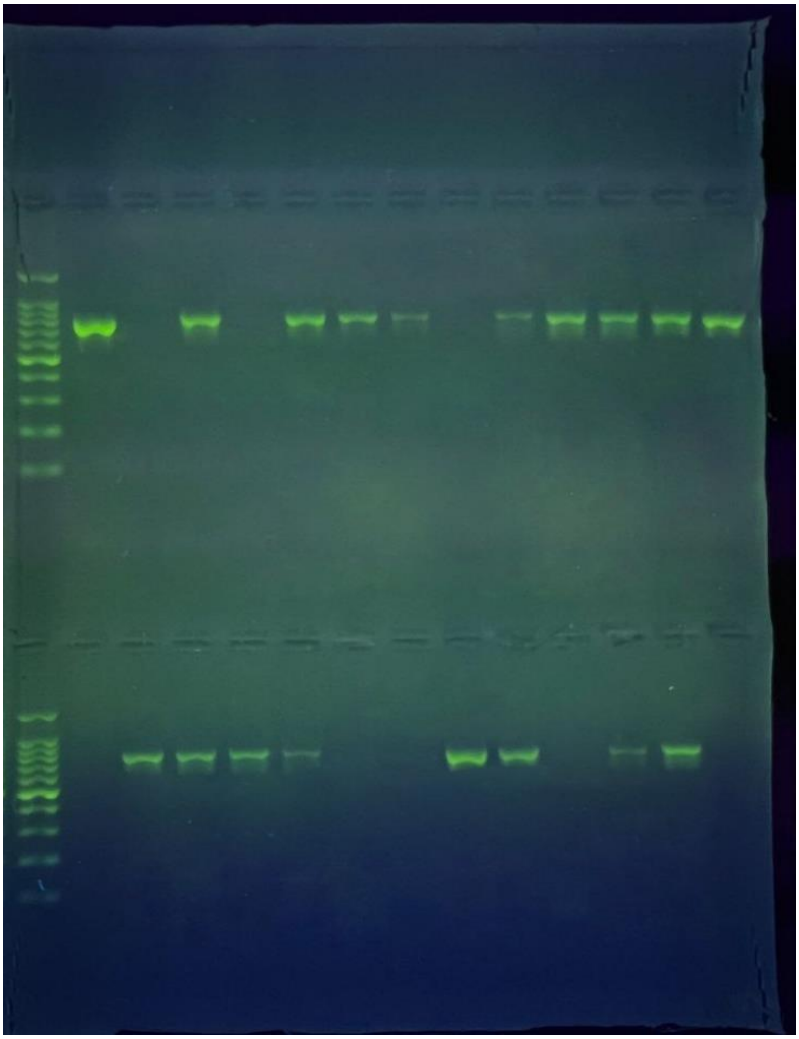
Çok sayıda deney gerçekleştirdikten sonra, ilk denatürasyon ve tavlama için en iyi koşullar bulunduktan sonra en iyi koşulları seçmek için, sıcaklık gradyan PCR kullanılarak tüm numuneler için DNA şablonunun konsantrasyonu 1,5-2 µL arasında olacak şekilde değiştirildi (Çizelge 3.9) (Şekil 3.2) (Şekil 3.3).

Çizelge 3.9 Optimum PCR koşulları

No	**Adım**	**Sıcaklık (ºC)**	**Süre**	**Döngü**
1	İlk denatürasyon	95°C	5 dakika.	1 döngü
2	Denatürasyon	94°C	1 dakika	35 Döngü
3	Tavlama	60°C	45 saniye	
4	Uzantı-1	72°C	45 saniye	
5	Eklenti -2	72°C	5 dakika	1 döngü



Şekil 3.2 PCR ürünü bant boyutu 292 bp



Şekil 3.3 PCR ürünü bant boyutu 789 bp

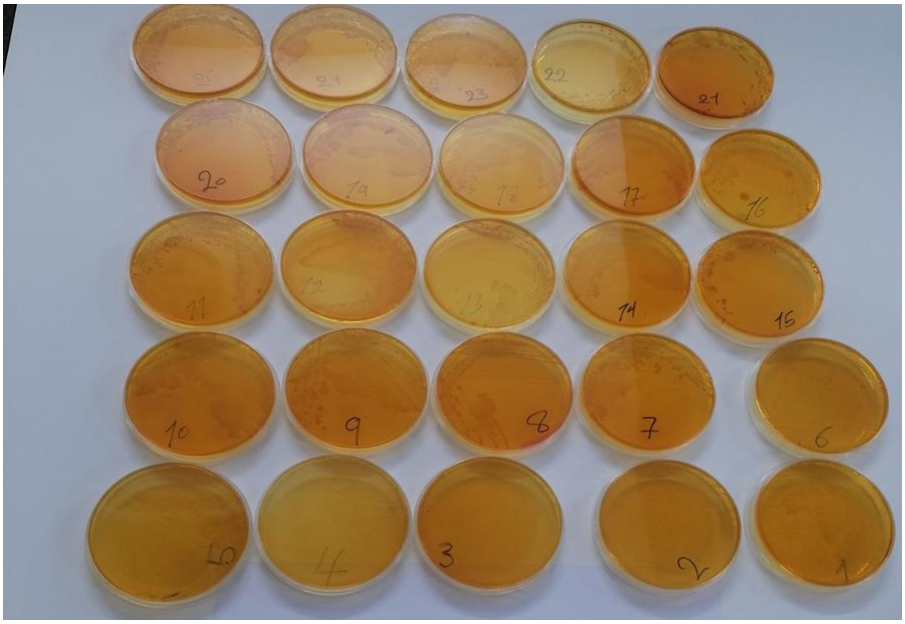
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Numune Toplama

Bu çalışmada idrar yolu enfeksiyonu olan 150 hasta grubu ve 50 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere toplamda 200 kişi katılmıştır. Bu kişilerin yaşları 10 ile 50 arasında değişmektedir. Her katılımcıdan daha önce geçirmiş olduğu hastalıklar (Diyabetik durum, böbrek yetmezliği vb.) hakkında bilgiler içeren anket formunu doldurması istenmiştir.

4.2 Bakteriyel İzolasyon ve Tanı Sonuçları

Tüm izolatlar Macconkey agar üzerinde kültürlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın MacConkey Agar ortamı üzerinde kolonilerinde laktoz fermantasyonunun olmaması, onları renksiz hale getirir, bu da onları numunedeki diğer bakteri türlerinden, özellikle MacConkey agar ortamında pembe renkli koloniler üreten *Escherichia coli, Klebsiella* türleri gibi Gram pozitif bakterilerden ayırmak için çok önemlidir.



Şekil 4.1 MacConkey agarında *P. aeruginosa*'nın büyümesi

Çalışmamızda kullanılan toplam 150 örneğin %60'ı bakteriyel enfeksiyon açısından pozitif çıkmıştır. *P. aeruginosa* izolatları, pozitif kültürlü klinik örneklerin yaklaşık %5,5'inde keşfedildi; bu durum, pozitif kültürlü idrar örneklerinin yalnızca %4,5'inde *P. aeruginosa* tespit eden çalışmaların bulgularıyla çelişmektedir. Motbaynor *et al.* (2020) yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa*'nın hastane-klinik izolatları arasında %4,60 oranında yaygın olduğunu bulmuştur.

4.3 Örneklerin Cinsiyete ve Yaş Grubuna göre Dağılımı

Örneklerin cinsiyete göre dağılımı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bu tablo incelendiğinde, *P. aeruginosa*'ya ait örneklerin kadınlarda %67, erkeklerde ise %52 oranında olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1 Örneklerin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	**Pozitif**	**Negatif**
Erkek	37 (%52)	34 (%48)
Kadın	53 (%67)	26 (%33)
Ki-kare	3,494	
P değeri	0,061	

Bu çalışmanın sonuçları kadınlarda erkeklere göre daha yüksek enfeksiyon oranı göstermiştir. Buna göre, *P. aeroginosa* enfeksiyonları öncelikle yaşlı erkek hastaları etkilemektedir. Vakaların çoğu hastane kaynaklıdır ve özellikle yoğun bakım ünitelerine başvuranlar olmak üzere tüm hastalar üzerinde ciddi etkilere neden olmaktadır (Al Samawi *et al.* 2016).

Mougous *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmada, çalışılan örneklerde tespit edilen enfeksiyon oranı 16 erkek (%84) ve 3 kadın (%16) olarak tespit edilmiştir. Örneklemdekilerin yaş ortalaması ise %72,6 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, *P. aeroginosa* ile bir akut pnömoni fare modeli kullanarak dişi farelerin enfeksiyona karşı daha savunmasız olduğunu bulmuştur (Pires *et al.* 2021).

Örneklerin yaş gruplarına göre dağılımı Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Sonuçlar, orta yaşlı deneklerin daha fazla sayıda pozitif örnek gösterdiğini belirtmektedir. 20 yaşaltı, 21-30, 31-40 ve 41-50 yaş gruplarındaki örnekler incelendiğinde pozitif örnek sayısının Kadınlarda daha yüksek olduğunu görülmektedir. Sadece >50 erkeklerde pozitif örnek sayısı kadınlardan daha fazladır.

Çizelge 4.2 Örneklerin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

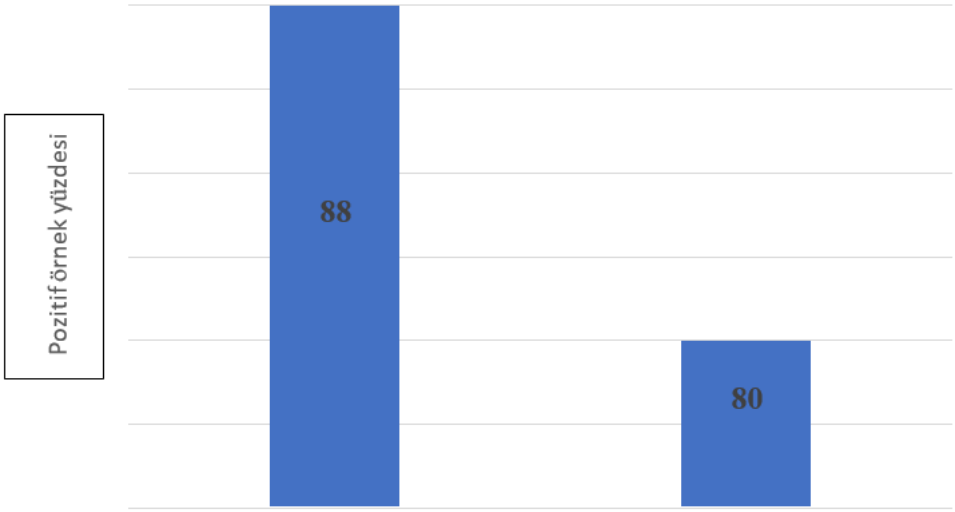
Yaş Grupları	**Erkek**	**Kadın**
<20	4	7
21-30	9	14
31-40	11	17
41-50	5	9
>50	8	6
Ki-kare	1,832	
P değeri	0,766	

Bu çalışmada, orta yaş grubunda diğer yaş gruplarına oranla daha fazla sayıda hastanın olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç Irak'ta hizmet veren askeri birlikler üzerinde yapılan ve ortalama yaşın 30 olduğunu gösteren çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Ancak bu sonuç, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastaların yaş ortalamasının 49±19 yıl olduğunu gösteren başka bir çalışmada elde edilen sonuçlar ile farklılık göstermiştir (Al Samawi *et al.* 2016). Yaşlılarda yaşa bağlı bağışıklık düzensizliğinin enfeksiyon riskini artırdığı bilinmektedir, ancak yaşlanmanın *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını nasıl etkilediği hala belirsizdir. Farelerde *P. aeruginosa* enfeksiyonunu tespit etmek için oluşturdukları fare modelinde, yaşlı farelerin *P. aeruginosa* enfeksiyonuna daha duyarlı olduğu ve *P. aeruginosa* ile intratrakeal enfeksiyonu takiben daha yüksek ölüm oranlarına, daha yüksek bakteri yüklerine ve daha ciddi akciğer hasarına sahip olduğunu belirlemiştir.

4.4 Enfeksiyon Alanına göre Pozitif Örneklerin Sayısı ve Yüzdesi

PCR çalışmasının tamamlanmasından sonra hem AlgU hem de PelF genlerinin amplifiye edilmiş ürünleri elektroforeze tabi tutuldu ve sonuçlar her gen için farklı pozitif numune

frekansları gösterdi (Şekil 4.2). Örneklerin %88'inde AlgU pozitifken, örneklerin %80'inde PelF geni pozitif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 AlgU ve PelF genleri arasındaki pozitiflik yüzdesinin karşılaştırılması

AlgU geni, O-asetillenmiş 1,4'e bağlı β-D-mannuronik asit ve onun C-5 epimeri L-guluronik asitten oluşan bir ekzopolisakkarit olan aljinat üretimini kontrol eden önemli genlerden biri olarak kabul edilir (Gheorghita *et al.* 2022). Belirli koşullar altında aljinat salgılanır ve bakteri kümelerinin ve biyofilmlerin bir bileşeni olan hücre dışı matrise katkıda bulunur. Aljinat, ısı, kurutma, reaktif oksijen türleri (ROS) ve antimikrobiyaller gibi çeşitli dış streslere karşı koruma sağlar (Yin *et al.* 2022). Bu çalışmada AlgU gen frekansının sonuçları, AlgU'nun havuzlanmış frekanslarının %89,3 olduğunu göstermiştir. Zaranza *et al.* (2013) çalışmasında Brezilya'da AlgU geninin prevalansının yüzde 39 olduğunu bildirmiştir. Stehling *et al.* (2008) tarafından yapılan bir başka çalışma, Brezilya'da AlgD ve AlgU genlerinin prevalansını sırasıyla %100 ve %25 olarak belirtmiştir.

Biyofilm üretimi birçok gen tarafından kontrol edilir ve PelF geni, *Pseodomanas* patogenezinin temel taşı olan biyofilm sentezi yolundaki temel genlerden biridir. Bu çalışmada PelF geninin sıklığı %80 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç PCR amplifikasyon sonuçlarına dayanarak PelF geninin *P. aeruginosa* izolatlarının %70,5'inde mevcut olduğunu gösteren önceki bir çalışma benzerlik göstermiştir (Rajabi *et al.* 2022).

Banar *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada bu genin 57 *P. aeruginosa* suşu arasındaki periyodikliği %93 olarak belirtilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen antibiyotik direnç sonuçları Çizelge 4.3'te özetlenmiştir. Bu sonuçlar izole edilen *P. aeruginosa*'nın hem Gentamisin hem de Tigesikline (%92,22) oranında, Sefazolin (%91,11), Amikasin (%88,89), Siprofloksasin (%86,67), Levofloksasin (%81,11) ve İmipenem (%78,89) oranında dirençli olduğunu göstermektedir. Diğer yandan izolatların çoğu bazı antibiyotiklere karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. En yüksek duyarlı izolat Sefepim (%94,44), Piperasilin/Tazobaktam (%93,33) ve Seftazidim (%87,78) olarak belirlenmiştir.

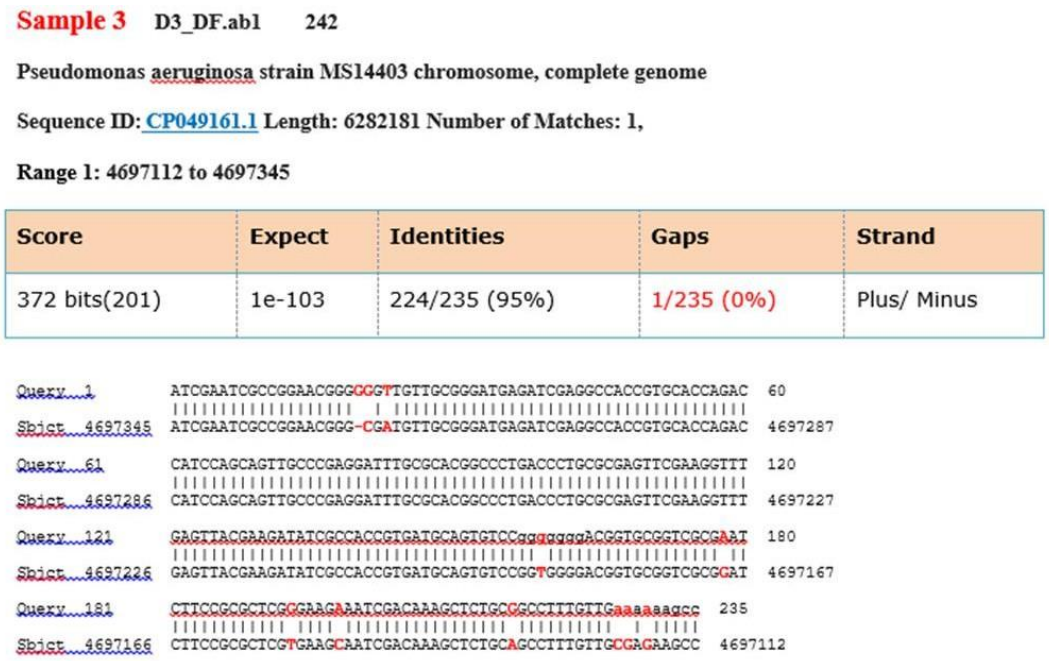
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* bakterilerinin antibiyotiklere yanıt yüzdeleri

Antibiyotik Adı	**Direnç/Duyarlılık**	***P. aeriginosa* sayısı (90)**	**Yüzde**
Piperasilin/Tazobaktam	R	6	%6,67
	S	84	%93,33
Sefazolin	R	82	%91,11
	S	8	%8,89
Seftazidim	R	11	%12,22
	S	79	%87,78
Sefepim	R	5	%5,56
	S	85	%94,44
Levofloksasin	R	73	%81,11
	S	17	%18,89
Penicilin	R	83	%92,22
	S	7	%7,78
Siprofloksasin	R	78	%86,67
	S	12	%13,33
Amikasin	R	80	%88,89
	S	10	%11,11
Tigesiklin	R	83	%92,22
	S	7	%7,78
İmipenem	R	71	%78,89
	S	19	%21,11

P. aeruginosa, karbapenemler, geniş spektrumlu penisilinler, aminoglikozitler, florokinolonlar, monobaktamlar ve üçüncü kuşak sefalosporinler dahil olmak üzere farklı antimikrobiyal ajanlara karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirerek onu zaman içinde en güçlü nozokomiyal patojenlerden biri haline getirmiştir. Düşük hücre duvarı geçirgenliği, indüklenebilir sefalosporin sentezi, aktif bir akış ve zayıf hedef aktivite,

antibiyotik direncinin gelişmesindeki faktörlerdir (Sionov and Steinberg 2022). Çalışmamızda amikasine karşı direnç %88,89 olarak bulunmuştur. Mısır'da yapılan benzer bir araştırma, amikasine direnç oranını %44 olarak tespit etmiştir (Gad *et al.* 2008). Buna karşılık Japonya, 692 izolattan 652'sinin duyarlı olduğu bir çalışmada %94 ile en yüksek duyarlılık oranı tespit etmiştir (Fujimura *et al.* 2009). Son olarak Irak'ta yapılan bir çalışmada %18'lik düşük bir duyarlılık oranı bildirmiştir (Al-Marzoqi *et al.* 2013).

AlgU'nun güçlendirilmiş bölge dizisinden elde edilen diziler, hedeflenen diziler içindeki mutasyonu/varyasyonları ortaya çıkarmak için NCBI'den elde edilen ID; CP049161,1 dizisine hizalandı. Hizalama sonuçları Şekil 4.3'te gösterilmiştir**.**



Şekil 4.3 Sekans hizalama (%98) CP049161,1

AlgU geninin ID: CP049161,1 dizisi ile hizalanmasıyla elde edilen bilgiler Çizelge 4.4'te özetlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek mutasyon sıklığı, 11 varyasyon ve %95 benzerlik gösteren örnek 3'te bulunmuştur. Bunu %95 benzerlik ile örnek 4 ve 5 takip etmektedir. En az sayıda mutasyondan kaynaklanan en yüksek benzerlik (%98) örnek 1 ve 2'de tespit edilmiştir.

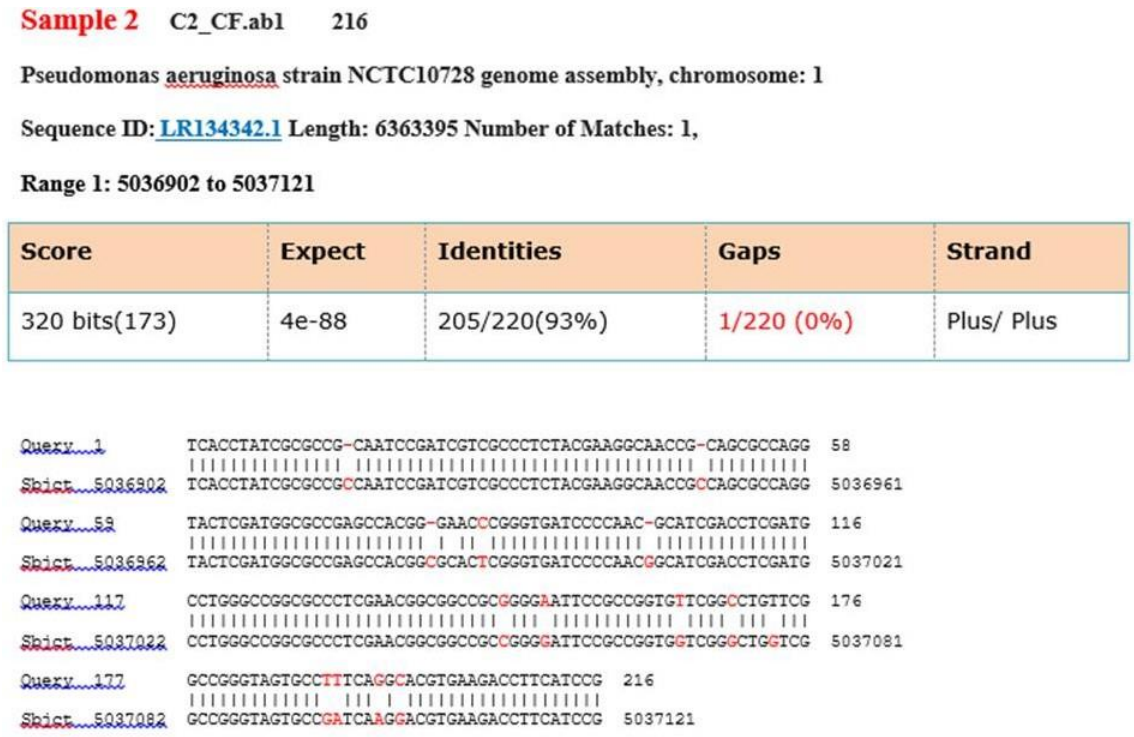
Çizelge 4.4 *Pseudomonas aeruginosa*'nın AlgU geni için sekans hizalaması

Pseudomonas aeruginosa						
Benzerlik	**Kaynak**	**Sekans ID**	**Nükleotid**	**Lokasyon**	**Yer Değiştirme**	**No.**
%98	***P. aeruginosa* suşu NCTC10728 Genom Birliği**	ID: CP049161,1	G/T	4697188	Dönüşüm	1
			G/T	4697154	Dönüşüm	
			G/A	4697131	Geçiş	
			G/C	4697120	Dönüşüm	
			A/G	4697117	Geçiş	
%98	***P. aeruginosa* suşu NCTC10728 Genom Birliği**	ID: CP049161,1	G/T	4697188	Dönüşüm	2
			G/T	4697179	Dönüşüm	
			G/T	4697154	Dönüşüm	
			G/A	4697151	Geçiş	
			G/A	4697131	Geçiş	
%95	***P. aeruginosa* suşu NCTC10728 Genom Birliği**	ID: CP049161,1	G	4697327	Açıklık	3
			G/C	4697326	Dönüşüm	
			T/A	4697324	Dönüşüm	
			G/T	4697188	Dönüşüm	
			A/G	4697169	Geçiş	
			G/T	4697154	Dönüşüm	
			A/C	4697149	Dönüşüm	
			G/A	4697131	Geçiş	
			A/C	4697120	Dönüşüm	
			A/G	4697119	Geçiş	
			A/G	4697117	Geçiş	
%97	***P. aeruginosa* suşu NCTC10728 Genom Birliği**	ID: CP049161,1	G/C	4697326	Dönüşüm	4
			T/G	4697325	Dönüşüm	
			T/A	4697324	Dönüşüm	
			G/T	4697188	Dönüşüm	
			G/T	4697154	Dönüşüm	
			A/C	4697149	Dönüşüm	
			G/A	4697131	Geçiş	
%97	***P. aeruginosa* suşu NCTC10728 Genom Birliği**	ID: CP049161,1	G/A	4697197	Geçiş	5
			G/T	4697188	Dönüşüm	
			G/T	4697179	Dönüşüm	
			A/G	4697169	Geçiş	
			C/T	4697164	Geçiş	
			A/C	4697149	Dönüşüm	
			G/A	4697131	Geçiş	

Yorgey *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmaya göre, AlgU mutantlarının akut enfeksiyonun fare modelinde virülansı artırdığını ve yapısal olarak aktif AlgU içeren mukoid olmayan mutant suşların virülansı azalttığını gösteren veriler, AlgU fonksiyonunun sürdürülmesi, cAMP/Vfr'ye bağlı sinyallemenin ve akut virülans fenotiplerinin sürekli inhibisyonuna neden olacaktır. Ayrıca bu veriler AlgU yolunun akut ve kronik enfeksiyonların kontrolünde zıt roller oynayabileceğini doğru bir şekilde tahmin etmiştir (Yu *et al.* 1996).

Çalışmanın bulgularına göre AlgU geninde az sayıda mutasyon vardı. Bu bulgular, AlgU mutasyonlarının, ortologlarda korunmak üzere evrimleşen belirli dizi motifleri veya konumları tercih edilmeden, gen boyunca eşit olarak dağıldığını bulan başka bir çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (Fischer *et al.* 2021).

PelF geninin elde edilen dizisi, hedeflenen diziler içindeki mutasyonu ortaya çıkarmak için ID; LR134342,1 ile hizalanmıştır. Hizalama sonuçları (%93) Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Sekans hizalama (%93) LR134342,1

İzole edilen numunelerden PelF gen dizisi hizalamasının, dizi kimliği: LR134342,1'e kıyasla sonuçları Çizelge 4.5'de özetlenmiştir. Sonuçlar, iki dizi arasında yüksek sayıda varyasyon göstermiştir. En yüksek mutasyon sayısı, örnek 2 ve 4'te 15 mutasyon görülmektedir ve örnek 2'de 4 Boşluk mutasyonu vardır. Bunu 12 mutasyonla örnek 1 izlemektedir ve bunlardan 1 Boşluk mutasyonudur. En az sayıda mutasyon, 9 mutasyon gösteren örnek 5'tir ve bunlardan 2'si boşluk mutasyonudur.

Çizelge 4.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın PelF geni için sekans hizalaması

Pseudomonas aeruginosa						
Benzerlik	**Kaynak**	**Sekans ID**	**Nükleotid**	**Lokasyon**	**Yer Değiştirme**	**No.**
%95	***P. aeruginosa* Suşu NCTC1 0728 Genom**	ID: LR134342,1	C	5036917	Aralık	1
			T/C	5036936	Geçiş	
			C/G	5036973	Dönüşüm	
			T/C	5036989	Geçiş	
			G/C	5037045	Dönüşüm	
			A/G	5037056	Geçiş	
			T/G	5037069	Dönüşüm	
			T/G	5037074	Dönüşüm	
			T/G	5037078	Dönüşüm	
			C/T	5037079	Geçiş	
			G/A	5037100	Geçiş	
			T/C	5037113	Geçiş	
			C	5036917	Aralık	
			C	5036951	Aralık	
%93	***P. aeruginosa* suşu NCTC1 0728 Genom**	ID: LR134342,1	C	5036984	Aralık	2
			A/C	5036986	Dönüşüm	
			C/T	5036989	Geçiş	
			G	5037052	Aralık	
			G/C	5037005	Dönüşüm	
			A/G	5037056	Geçiş	
			T/G	5037069	Dönüşüm	
			C/G	5037074	Dönüşüm	
			T/G	5037078	Geçiş	
			T/G	5037095	Dönüşüm	
			T/A	5037096	Geçiş	
			G/A	5037100	Dönüşüm	
			C/G	5037102	Dönüşüm	
		ID: LR134342,1	Hata			3
%95	***P. aeruginosa* suşu NCTC1 0728 Genom**	ID: LR134342,1	T/A	5036920	Dönüşüm	4
			T/C	5036934	Geçiş	
			A/G	5036940	Geçiş	
			G/A	5036959	Geçiş	
			C/G	5036973	Dönüşüm	
			C/G	5036986	Dönüşüm	
			G/T	5037024	Dönüşüm	
			A/G	5037039	Geçiş	
			G/C	5037045	Dönüşüm	
			A/G	5037056	Geçiş	
			C/G	5037062	Dönüşüm	
			A/G	5037095	Geçiş	
			G/A	5037100	Geçiş	
			T/C	5037113	Geçiş	
			C/G	5037217	Dönüşüm	
%95	***P. aeruginosa* suşu NCTC1 0728 Genom**	ID: LR134342,1	T	5036893	Aralık	5
			T/G	5036896	Dönüşüm	
			A/C	5036898	Dönüşüm	
			T/C	5036900	Geçiş	
			G	5036915	Aralık	
			A/G	5036940	Geçiş	
			C/G	5036973	Dönüşüm	
			A/C	5036987	Dönüşüm	

Biyofilm üretimi karmaşık, sistematik bir süreçtir. Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa'*daki PelF geni, amino şeker polimerinin üretimini kolaylaştıran bir proteini kodlar (Jennings *et al.* 2015). Sonuçlar, genin güçlendirilmiş hedef dizisi içinde çeşitli sayıda mutasyon göstermiştir. Bu sonuç, PelF'nin amplikon diziliminin 55 kodonda 116 eş anlamlı yer değiştirme ve 62 yanlış anlam mutasyonu tanımladığını gösteren çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Yanlış anlam varyasyonları tercihen evrimsel korunuma uğramamış bölgelerde bulunur (P=3105) ve buralarda çekirdek dizi boyunca eşit olarak dağılmaz (P=0,02). Amino asit sübstitüsyonlarının büyük çoğunluğunun, yüksek ortalama Dayhoff indeksi 38 olarak tespit edilmiştir ve bu durum Pseudomonas protejenlerinin en yakın ortolog PelF geninin kanonik amino asitle sık sık yer değiştirmesiyle açıklanabilir. Ayrıca, protein fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur (Fischer *et al.* 2021). Elde ettiğimiz sonuçlar, *P. aeruginosa* izolatlarının oldukça büyük bir fraksiyonunda (%87,5) aynı anda yüksek oranda PelF gen prevalansının bulunduğunu ve çalışmaya dahil edilen önemli sayıda izolatta biyofilm varlığı ile bağlantılı olduğunu gösteren yakın tarihli bir çalışmayla da desteklenmiştir (%83,75) (Kamali *et al.* 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, idrar yolu enfeksiyonlarının giderilmesinde en aktif rolün Piperasilin/Tazobaktam, Sefepim ve Seftazidim antibiyotikleri olduğu tespit edilmiştir. Bakterileri genetik düzeyde tespit etmek için moleküler çalışmalar çok önemlidir. Çalışmamızda bakterilerin AlgU ve PelF genlerinde en yüksek dirence sahip olduğu bulunmuştur. Örneklerin %88'inde AlgU geni pozitifken, örneklerin %80'inde PelF geni pozitif olarak ortaya çıkmıştır. Sekanslar arasında yüksek varyasyona sahip olanlar karşılaştırdıktan sonra, incelenen bakterilerin direnç genlerinin belirlenmesinde moleküler çalışmanın önemli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen suşlar Ulusal Veri Bankası'na (NCBI) tescil edilerek PelF geni için OP353999 ve AlgU geni için OP345000 tescilli koduyla seri numarası alınmıştır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, İYE vakalarının azalmasında uygun önlemlerin alınması, Farklı bulaşıcı organizmaların gözlenen etkilerinin temelini anlamak için daha fazla çalışmanın yapılması, Antimikrobiyal ajanların kullanımının gelecekte gözden geçirilmesi için İYE'ye neden olan bakterilerin direnç modellerindeki eğilimlerin sürekli izlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Al Samawi, M. S., Khan, F. Y., Eldeeb, Y., Almaslamani, M., Alkhal, A., Alsoub, H. and Hashim, S. 2016. Acinetobacter infections among adult patients in Qatar: a 2-year hospital-based study. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 20(16).

Alatraktchi, F. A. A., Svendsen, W. E. and Molin, S. 2020. Electrochemical detection of pyocyanin as a biomarker for Pseudomonas aeruginosa: A focused review. Sensors, 20(18): 5218.

Al-Marzoqi, A. H., Al-Janabi, H. S. O., Hussein, H. J., Al Taee, Z. M. and Yheea, S. K. 2013. Otitis media; etiology and antibiotics susceptibility among children under ten years old in Hillah city, Iraq. Journal of Natural Sciences Research, 3(3): 2224-3186.

Babu, K. V. Y., Visweswaraiah, D. S. and Kumar, A. 2014. The influence of Imipenem resistant metallo-beta-lactamase positive and negative Pseudomonas aeruginosa nosocomial infections on mortality and morbidity. Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 5(2): 345.

Banar, M., Emaneini, M., Satarzadeh, M., Abdellahi, N., Beigverdi, R., Leeuwen, W. B. V. and Jabalameli, F. 2016. Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infections. PloS One, 11(10): e0164622.

Barrasa-Villar, J. I., Aibar-Remón, C., Prieto-Andrés, P., Mareca-Doñate, R. and Moliner-Lahoz, J. 2017. Impact on morbidity, mortality, and length of stay of hospital-acquired infections by resistant microorganisms. Clinical Infectious Diseases, 65(4): 644-652.

Belyy, A., Raoux-Barbot, D., Saveanu, C., Namane, A., Ogryzko, V., Worpenberg, L. and Mechold, U. 2016. Actin activates Pseudomonas aeruginosa ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. Nature Communications, 7(1): 13582.

Bertrand, J. J., West, J. T. and Engel, J. N. 2010. Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology, 192(4): 994-1010.

Bonnington, K. E. and Kuehn, M. J. 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1843(8): 1612-1619.

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. 2001. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews, 14(4): 933-951.

Buchan, B. W. and Ledeboer, N. A. 2014. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. Clinical Microbiology Reviews, 27(4): 783-822.

Burgener, E. B. and Moss, R. B. 2018. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: precision medicine in cystic fibrosis. Current Opinion in Pediatrics, 30(3): 372.

Byrd, M. S., Pang, B., Mishra, M., Swords, W. E. and Wozniak, D. J. 2010. The Pseudomonas aeruginosa exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-κB activation in A549 cells. MBio, 1(3): e00140-10.

Chadha, J., Harjai, K. and Chhibber, S. 2022. Revisiting the virulence hallmarks of Pseudomonas aeruginosa: a chronicle through the perspective of quorum sensing. Environmental Microbiology, 24(6): 2630-2656.

Cholley, P., Stojanov, M., Hocquet, D., Thouverez, M., Bertrand, X. and Blanc, D. S. 2015. Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of Pseudomonas aeruginosa populations. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 82(4): 274-277.

Choy, M. H., Stapleton, F., Willcox, M. D. and Zhu, H. 2008. Comparison of virulence factors in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from contact lens-and non-contact lens-related keratitis. Journal of Medical Microbiology, 57(12): 1539-1546.

Coulon, C., Vinogradov, E., Filloux, A. and Sadovskaya, I. 2010. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain Pseudomonas aeruginosa PA14. PLoS One, 5(12): e14220.

Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiology Reviews, 36(2): 380-407.

DalBen, M. F., Basso, M., Garcia, C. P., Figueiredo Costa, S., Maria Toscano, C., Robert Jarvis, W. and Levin, A. S. 2013. Colonization pressure as a risk factor for colonization by multiresistant Acinetobacter spp and carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit. Clinics, 68: 1128-1133.

De Boeck, K., Zolin, A., Cuppens, H., Olesen, H. V. and Viviani, L. 2014. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis, 13(4): 403-409.

Djordjevic, Z., Folic, M. M., Zivic, Z., Markovic, V. and Jankovic, S. M. 2013. Nosocomial urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species: sensitivity to antibiotics and risk factors. American Journal of Infection Control, 41(12): 1182-1187.

Doi, Y. and Arakawa, Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clinical Infectious Diseases, 45(1): 88-94.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Communication toolkit on immunisation: How to increase immunisation uptake. European Centre for Disease Prevention and Control, 2016.

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

Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N. and Sosnay, P. R. 2017. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. The Journal of Pediatrics, 181: 4-15.

Fernández, L., Álvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Kocíncová, D., Lam, J. S. and Hancock, R. E. 2013. Characterization of the polymyxin B resistome of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(1): 110-119.

Fischer, S., Klockgether, J., Sorribes, M. G., Dorda, M., Wiehlmann, L. and Tümmler, B. 2021. Sequence diversity of the Pseudomonas aeruginosa population in loci that undergo microevolution in cystic fibrosis airways. Access Microbiology, 3(12).

Fujii, A., Seki, M., Higashiguchi, M., Tachibana, I., Kumanogoh, A. and Tomono, K. 2014. Community-acquired, hospital-acquired, and healthcare-associated pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa. Respiratory Medicine Case Reports, 12: 30-33.

Fujimura, T., Anan, N., Sugimori, G., Watanabe, T., Jinushi, Y., Yoshida, I. and Yamano, Y. 2009. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Japan to doripenem and other antipseudomonal agents. International Journal of Antimicrobial Agents, 34(6): 523-528.

Funke, G., Monnet, D., deBernardis, C., von Graevenitz, A. and Freney, J. 1998. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. Journal of Clinical Microbiology, 36(7): 1948-1952.

Gad, G. F., El-Domany, R. A. and Ashour, H. M. 2008. Antimicrobial susceptibility profile of Pseudomonas aeruginosa isolates in Egypt. The Journal of Urology, 180(1): 176-181.

Gessard, C. 1882. De la pyocyanine et de son microbe. These Pour le Doctoraten Medecine, 1882.

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

Gheorghita, A. A., Li, Y. E., Kitova, E. N., Bui, D. T., Pfoh, R., Low, K. E. and Howell, P. L. 2022. Structure of the AlgKX modification and secretion complex required for alginate production and biofilm attachment in Pseudomonas aeruginosa. Nature Communications, 13(1): 7631.

Girlich, D., Naas, T. and Nordmann, P. 2004. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(6): 2043-2048.

Green, M. R. and Sambrook, J. 2019. Nested polymerase chain reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols, 2019(2): 95182.

Hilliam, Y., Kaye, S. and Winstanley, C. 2020. Pseudomonas aeruginosa and microbial keratitis. Journal of Medical Microbiology, 69(1): 3-13.

Horcajada, J. P., Shaw, E., Padilla, B., Pintado, V., Calbo, E., Benito, N. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2013. Healthcare-associated, community-acquired and hospital-acquired bacteraemic urinary tract infections in hospitalized patients: a prospective multicentre cohort study in the era of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology and Infection, 19(10): 962-968.

Horino, T., Chiba, A., Kawano, S., Kato, T., Sato, F., Maruyama, Y. and Hori, S. 2012. Clinical characteristics and risk factors for mortality in patients with bacteremia caused by Pseudomonas aeruginosa. Internal Medicine, 51(1): 59-64.

Ince, D., Sutterwala, F. S. and Yahr, T. L. 2015. Secretion of flagellar proteins by the Pseudomonas aeruginosa type III secretion-injectisome system. Journal of Bacteriology, 197(12): 2003-2011.

Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T. and Parsek, M. R. 2010. Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. Molecular Microbiology, 78(1): 158-172.

Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I. and Parsek, M. R. 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(36): 11353-11358.

Jeong, S. J., Yoon, S. S., Bae, I. K., Jeong, S. H., Kim, J. M. and Lee, K. 2014. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 80(2): 130-135.

Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F. and Mohebbi, A. 2020. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. BMC Research Notes, 13: 1-6.

Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J. R. and De La Fuente Aguado, J. 2017.

Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. PloS One, 12(5): e0178178.

Lambert, P. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Journal of the Royal Society of Medicine, 95(41): 22.

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R. and Kiguchi, K. 2003. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, Bombyx mori, by acridine orange and propidium iodide staining. Histochemistry and Cell Biology, 120: 505-511.

Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical Microbiology Reviews, 22(4): 582-610.

Liu, Q., Li, X., Li, W., Du, X., He, J. Q., Tao, C. and Feng, Y. 2015. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with Pseudomonas aeruginosa infection: a meta-analysis. Scientific Reports, 5(1): 11715.

Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?. Clinical infectious diseases, 34(5): 634-640.

Lucena, A., Dalla Costa, L. M., Nogueira, K. S., Matos, A. P., Gales, A. C., Paganini, M. C. and Raboni, S. M. 2014. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. Journal of Hospital Infection, 87(4): 234-240.

Lund-Palau, H., Turnbull, A. R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O. and Davies, J. C. 2016. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. Expert Review of Respiratory Medicine, 10(6): 685-697.

Maldonado, R. F., Sá-Correia, I. and Valvano, M. A. 2016. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. FEMS Microbiology Reviews, 40(4): 480-493.

Masuda, N. and Ohya, S. 1992. Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36(9): 1847-1851.

Matos, E. C. O. D., Matos, H. J. D., Conceição, M. L., Rodrigues, Y. C., Carneiro, I. C. D. R. S. and Lima, K. V. B. 2016. Clinical and microbiological features of

infections caused by Pseudomonas aeruginosa in patients hospitalized in intensive care units. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 49: 305-311.

McMullen, A. R., Yarbrough, M. L., Wallace, M. A., Shupe, A. and Burnham, C. A. D. 2017. Evaluation of genotypic and phenotypic methods to detect carbapenemase production in Gram-negative bacilli. Clinical Chemistry, 63(3): 723-730.

Memar, M. Y., Pormehrali, R., Alizadeh, N., Ghotaslou, R. and Bannazadeh, B. H. 2016. Colistin, an option for treatment of multiple drug resistant Pseudomonas aeruginosa. Physiology and Pharmacology, 131-136.

Mendes, R. E., Toleman, M. A., Ribeiro, J., Sader, H. S., Jones, R. N. and Walsh, T. R. 2004. Integron carrying a novel metallo-β-lactamase gene, bla IMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac (6′)-30/aac (6′)-Ib′: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(12): 4693-4702.

Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y. and Van Bambeke, F. 2007. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clinical Microbiology and Infection, 13(6): 560-578.

Micek, S. T., Wunderink, R. G., Kollef, M. H., Chen, C., Rello, J., Chastre, J. and Menon, V. 2015. An international multicenter retrospective study of Pseudomonas aeruginosa nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. Critical Care, 19: 1-8.

Mittal, R., Lisi, C. V., Gerring, R., Mittal, J., Mathee, K., Narasimhan, G. and Liu, X. Z. 2015. Current concepts in the pathogenesis and treatment of chronic suppurative otitis media. Journal of Medical Microbiology, 64(10): 1103-1116.

Morand, A. and Morand, J. J. 2017. Pseudomonas aeruginosa en dermatologie. In Annales de Dermatologie et de Vénéréologie. Elsevier Masson, 144(11): 666-675.

Morata, L., Cobos-Trigueros, N., Martínez, J. A., Soriano, Á., Almela, M., Marco, F. and Mensa, J. 2012. Influence of multidrug resistance and appropriate empirical therapy on the 30-day mortality rate of Pseudomonas aeruginosa bacteremia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(9): 4833-4837.

Motbaynor, B., Tesfa, T., Mitiku, H., Sisay, M., Weldegebreal, F., Ataro, Z. and Teklemariam, Z. 2020. Bacterial otitis media in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases, 20: 1-12.

Motos, A., Yang, H., Li Bassi, G., Yang, M., Meli, A., Battaglini, D. and Torres, A. 2023. Inhaled amikacin for pneumonia treatment and dissemination prevention: an experimental model of severe monolateral Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Critical Care, 27(1): 1-11.

Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A. and Mekalanos, J. J. 2006. A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus. Science, 312(5779): 1526-1530.

Oie, S., Fukui, Y., Yamamoto, M., Masuda, Y. and Kamiya, A. 2009. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa. BMC Infectious Diseases, 9(1): 1-5.

Ozer, E., Yaniv, K., Chetrit, E., Boyarski, A., Meijler, M. M., Berkovich, R. and Alfonta, L. 2021. An inside look at a biofilm: Pseudomonas aeruginosa flagella biotracking. Science Advances, 7(24): eabg8581.

Öncül, O., Öksüz, S., Acar, A., Ülkür, E., Turhan, V., Uygur, F. and Görenek, L. 2014. Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: analysis of an eleven-year active surveillance. Burns, 40(5): 835-841.

Park, W. S., Lee, J., Na, G., Park, S., Seo, S. K., Choi, J. S. and Choi, I. W. 2022. Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammasome Activation in Pseudomonas aeruginosa LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF-κB Pathway. International Journal of Molecular Sciences, 23(3): 1228.

Pena, C., Suarez, C., Tubau, F., Dominguez, A., Sora, M., Pujol, M. and Ariza, J. 2009. Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: factors influencing multidrug-resistant acquisition in non-critically ill patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 28: 519-522.

Peng, Y., Bi, J., Shi, J., Li, Y., Ye, X., Chen, X. and Yao, Z. 2014. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections pose growing threat to health care–associated infection control in the hospitals of Southern China: A case-control surveillance study. American Journal of Infection Control, 42(12): 1308-1311.

Picão, R. C., Poirel, L., Gales, A. C. and Nordmann, P. 2009. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(5): 2225.

Pires, D. P., Monteiro, R., Mil-Homens, D., Fialho, A., Lu, T. K. and Azeredo, J. 2021. Designing P. aeruginosa synthetic phages with reduced genomes. Scientific Reports, 11(1): 2164.

Poole, K. 2005a. Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(2): 479-487.

Poole, K. 2005b. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(1): 20-51.

Potron, A., Poirel, L. and Nordmann, P. 2015. Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. International Journal of Antimicrobial Agents, 45(6): 568-585.

Rajabi, H., Salimizand, H., Khodabandehloo, M., Fayyazi, A. and Ramazanzadeh, R. 2022. Prevalence of algD, pslD, pelF, Ppgl, and PAPI-1 genes involved in biofilm formation in clinical Pseudomonas aeruginosa strains. BioMed Research International, 2022(2).

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

Righi, E., Peri, A. M., Harris, P. N., Wailan, A. M., Liborio, M., Lane, S. W. and Paterson, D. L. 2017. Global prevalence of carbapenem resistance in neutropenic patients and association with mortality and carbapenem use: systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(3): 668-677.

Riu, M., Chiarello, P., Terradas, R., Sala, M., Garcia-Alzorriz, E., Castells, X. and Cots, F. 2016. Cost attributable to nosocomial bacteremia. Analysis according to microorganism and antimicrobial sensitivity in a university hospital in Barcelona. PLoS One, 11(4): e0153076.

Rosen, B. H., Evans, T. I. A., Moll, S. R., Gray, J. S., Liang, B., Sun, X. and Engelhardt, J. F. 2018. Infection is not required for mucoinflammatory lung disease in CFTR-knockout ferrets. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 197(10): 1308-1318.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1546 page, New York.

Santajit, S. and Indrawattana, N. 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. BioMed Research International, 2016(2): 9-13.

Schmidt, J. M. and Bleichert, F. 2020. Structural mechanism for replication origin binding and remodeling by a metazoan origin recognition complex and its co-loader Cdc6. Nature Communications, 11(1): 4263.

Sionov, R. V. and Steinberg, D. 2022. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. Microorganisms, 10(6): 1239.

Sligl, W. I., Dragan, T. and Smith, S. W. 2015. Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. International Journal of Infectious Diseases, 37: 129-134.

Spernovasilis, N., Psichogiou, M. and Poulakou, G. 2021. Skin manifestations of Pseudomonas aeruginosa infections. Current Opinion in Infectious Diseases, 34(2): 72-79.

Stehling, E. G., Silveira, W. D. D. and Leite, D. D. S. 2008. Study of biological characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12: 86-88.

Strateva, T. and Yordanov, D. 2009. Pseudomonas aeruginosa–a phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Microbiology, 58(9): 1133-1148.

Sun, J. and Sun, J. 2014. Intracranial complications of chronic otitis media. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 271: 2923-2926.

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

Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A. and Quinn, J. P. 2007. First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type

carbapenem-hydrolyzing β-lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(4): 1553-1555.

Wallis, S., Atkinson, H. and Coatesworth, A. P. 2015. Chronic otitis media. Postgraduate Medicine, 127(4): 391-395.

Willmann, M., Klimek, A. M., Vogel, W., Liese, J., Marschal, M., Autenrieth, I. B. and Buhl, M. 2014. Clinical and treatment-related risk factors for nosocomial colonisation with extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in a haematological patient population: a matched case control study. BMC Infectious Diseases, 14: 1-8.

Winstanley, C., O'Brien, S. and Brockhurst, M. A. 2016. Pseudomonas aeruginosa evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. Trends in Microbiology, 24(5): 327-337.

Yamane, K., Doi, Y., Yokoyama, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N. and Arakawa, Y. 2004. Genetic environments of the rmtA gene in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(6): 2069-2074.

Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P. and Lin, J. 2022. Treatment of Pseudomonas aeruginosa infectious biofilms: challenges and strategies. Frontiers in Microbiology, 3325.

Yorgey, P., Rahme, L. G., Tan, M. W. and Ausubel, F. M. 2001. The roles of mucD and alginate in the virulence of Pseudomonas aeruginosa in plants, nematodes and mice. Molecular Microbiology, 41(5): 1063-1076.

Yu, H., Boucher, J. C., Hibler, N. S. and Deretic, V. 1996. Virulence properties of Pseudomonas aeruginosa lacking the extreme-stress sigma factor AlgU (sigmaE). Infection and Immunity, 64(7): 2774-2781.

Zaranza, A. V., Morais, F. C., Do Carmo, M. S., De Mendonça Marques, A., Andrade-Monteiro, C., Ferro, T. F. and Figueiredo, P. D. M. S. 2013. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 4(1): 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Zahraa Ali Saeed AL-KHAFAJI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011-2015