ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KLİNİK VAKALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGİNOSA*'DAKİ BİYOFİLM GENLERİNİN GEN EKSPRESYON ÇALIŞMASI

Tara Fouad Raouf RAOUF

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Tara Fouad Raouf RAOUF tarafından hazırlanan **"Farklı Klinik Vakalardan İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa*'daki Biyofilm Genlerinin Gen Ekspresyon 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 : Prof. Dr. Rana Mujahid Abdullah Laily AL-SHWAIKH

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 "**Farklı Klinik Vakalardan İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa*'daki Biyofilm Genlerinin Gen Ekspresyon 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).

Tara Fouad Raouf RAOUF

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KLİNİK VAKALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGİNOSA*'DAKİ BİYOFİLM GENLERİNİN GEN EKSPRESYON ÇALIŞMASI

Tara Fouad Raouf RAOUF

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Prof. Dr. Rana Mujahid Abdullah Laily AL-SHWAIKH

Çalışmada, yanık, yara, idrar yolu enfeksiyonu ve orta kulak iltihabı dahil olmak üzere çeşitli klinik kaynaklardan 100 örnek toplandı. Her iki cinsiyetten ve farklı yaşlardan alınan örnekler Mayıs-Eylül 2022 tarihleri arasında, Bağdat Eğitim Hastanesi ve Şehit Gazi Hariri Hastanesinden alınmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda *Pseudomonas aeruginosa'*ya ait 19 izolat tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa'*nın 11 antibiyotiğe duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ile test edildi ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlendi. Tüm izolatların Penisilin, Sefuroksim, Sodyum, Amoksisilin/klavulanik asit, Eritromisin ve Oksasilin %98, Sefotaksim %76, Ofloksasin %58, Sefipime %22, Seftazidime %16, İmipeneme %16 dirençli olduğu tespit edilmiştir. En düşük direnç %8 oranı ile Amikasin'e karşı izlenmiştir. Bakterilerin biyofilm üretme yeteneği, CV tahlil yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmamızdaki 19 izolatın %100 oranında biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu (15 izolat (%84) Güçlü Biyofilm, 2 izolat (%8) Orta Biyofilm, 2 izolat (%8) Zayıf Biyofilm) belirlenmiştir. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*'nın tüm izolatlarının biyofilm genlerine (pslA, PslD, PA-SS) %100 oranında sahip olduğunu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, PslD geninin Sefotaksim 2 µL konsantrasyonunda gen ekspresyonu 19,32 ve 8 µL konsantrasyonunda ise 22,56 olarak bulunmuştur.

2023, 56 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa*, Biyofilm, Gen, Antibiyotik

ABSTRACT

Master of Science Thesis

STUDY THE GENE EXPRESSION OF BIOFILM GENES IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL CASES

Tara Fouad Raouf RAOUF

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Prof. Dr. Rana Mujahid Abdullah Laily AL-SHWAIKH

The study collected 100 samples from a variety of clinical sources, including burns, wounds, urinary tract infections, and otitis media. Samples taken from both genders and different ages were taken from Baghdad Training Hospital and Martyr Gazi Hariri Hospital between May-September 2022. As a result of the examinations, 19 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to 11 antibiotics was tested by disk diffusion method and it was determined that *Pseudomonas aeruginosa* had multi-antibiotic resistance. It was determined that all isolates were resistant to Penicillin, Cefuroxime, Sodium, Amoxicillin/clavulanic acid, Erythromycin and Oxacillin 98%, Cefotaxime 76%, Ofloxacin 58%, Cefipime 22%, Ceftazidime 16%, Imipenem 16%. The lowest resistance was observed against Amikacin with a rate of 8%. The ability of bacteria to produce biofilm was examined using the CV assay method. It was determined that 19 isolates in our study were capable of producing 100% biofilm (15 isolates (84%) Strong Biofilm, 2 isolates (8%) Medium Biofilm, 2 isolates (8%) Weak Biofilm). In addition, it was determined that all isolates of *Pseudomonas aeruginosa* had 100% biofilm genes (pslA, PslD, PA-SS). In addition, gene expression of the PslD gene was found to be 19.32 at Cefotaxime 2 µL concentrations and 22.56 at 8 µL concentrations.

2023, 56 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Gene, Antibiotic

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN' a bana ayırdığı zaman, çaba, rehberlik ve cesaretlendirme için en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.
Eş danışmanım Prof. Dr. Rana Mujahid Abdullah Laily AL-SHWAIKH'a teşekkürlerimi sunarım.
Ayrıca değerli hocalarıma ve eğitimimde emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.
Ayrıca tüm aileme, eşime ve çocuklarıma teşekkürlerimi sunarım.
Ayrıca bana bir kelime bile olsa yardımcı olan herkese teşekkür ederim.
Bu araştırmayı rahmetli babama ithaf ediyorum.

Tara Fouad Raouf RAOUF
Çankırı, Şubat 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 Aeruginosa* **3**
2.2 Mikrobiyoloji **4**
2.3 Patogenez **4**
2.4 Antimikrobiyal Direnç **7**
2.5 Virulans Faktörleri **8**
2.6 Pigment Üretimi **8**
2.7 *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Enfeksiyonları **9**
2.8 *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmleri **10**
2.8.1 Biyofilm başlatma **11**
2.8.2 Biyofilm oluşumu **11**
2.9 Antibiyotik Toleransı **14**
2.9.1 *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin antimikrobiyal toleransı **14**
2.9.2 Biyofilm direnci ve toleransı **15**
2.10 Bakteriyel Biyofilmlerde Antibiyotiğe Direnç **16**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**
3.1 Materyal **17**
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları **17**
3.1.2 Hazır kültür ortamı **17**
3.1.3 Kitler **18**
3.1.4 Kimyasal malzemeler **18**

3.1.5 Primerler 18
3.2 Yöntem 19
3.2.1 Sterilizasyon 19
3.2.2 Kültür medyasının hazırlanması 19
3.2.3 Örnek toplama 19
3.2.4 Bakteriyel izolatların tanımlanması 20
3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi 21
3.2.6 Biyofilm oluşumu 22
3.2.7 Genomik DNA ekstraksiyonu 23
3.2.8 PCR programı 25
3.2.9 Agaroz jel elektroforezi 27
3.2.10 Gen ifadesi çalışması 28
3.2.11 Antibiyotik konsantrasyonları 30
3.2.12 cDNA protokolü 30
3.2.13 qPCR protokolü 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
4.1 *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu ve Teşhisi 33
4.2 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi 34
4.3 CV Tahlili ile Biyofilm Ölçümü 35
4.4 DNA Ekstraksiyonu 36
4.5 DNA Konsantrasyonunun Ölçümü 36
4.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kullanılarak Biyofilm Genlerinin Tespiti 37
4.7 RNA Ekstraksiyonu 38
4.8 Gen İfade Çalışması 38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 40
KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
ÇİD	Çoklu ilaç direnci
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
İYE	İdrar yolu enfeksiyon
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi (Jakobsen *et al.* 2013) 12
Şekil 2.2 Biyofilm antimikrobiyal toleransına katkıda bulunan mekanizmalar (Penesyan *et al.* 2015) 16
Şekil 4.1 *P. aeruginosa* izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara karşı direnç yüzdesi 35
Şekil 4.2 CV testi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşum derecesi 36
Şekil 4.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın psLD geninin amplifikasyon sonuçları (295bp) 37
Şekil 4.4 *Pseudomonas aeruginosa*'nın PA-SS geninin amplifikasyon sonuçları (956bp) 38
Şekil 4.5 Sefotaksim antibiyotiğinin 2, 4 ve 8 µL konsantrasyonları ile psID gen ekspresyonunun eğrisi 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Laboratuvar ekipmanları 17
Çizelge 3.2 Kültür besiyeri 17
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler 18
Çizelge 3.4 Kimyasal malzemeler 18
Çizelge 3.5 Primerler 19
Çizelge 3.6 Primer hazırlama konsantrasyonları 24
Çizelge 3.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için bileşenler, boyutlar ve karışımlar 25
Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için optimum koşullar 25
Çizelge 3.9 *Pseudomonas aeruginosa*'da pslA geninin saptanması için PCR optimum koşulları 26
Çizelge 3.10 *Pseudomonas aeruginosa*'da PslD geninin saptanması için PCR optimum koşulları 26
Çizelge 3.11 *Pseudomonas aeruginosa*'da PA-SS geninin saptanması için PCR optimum koşulları 27
Çizelge 3.12 cDNA amplifikasyon için PCR reaksiyon karışımının içeriği 31
Çizelge 3.13 PslD geni için cDNA programı 31
Çizelge 3.14 qPCR programı 31
Çizelge 4.1 *P. aeruginosa'*nın biyokimyasal reaksiyonları 34
Çizelge 4.2 *P. aeruginosa'*nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranı 34
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara direnç durumu 35
Çizelge 4.4 CV tahlili kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşum derecesi 36
Çizelge 4.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın sahip olduğu biyofilm genlerinin sayısı ve yüzdesi 37
Çizelge 4.6 psID geninin qPCR analiz verileri 38

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa tipik bir Gram negatif bakteridir. Bu bakteri; kanser hastaları, yakın zamanda ameliyat olmuş kişiler, ciddi yanıklar geçirmiş kişiler veya HIV pozitif kişiler gibi bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde hastane enfeksiyonlarının yanı sıra ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir (Gomila *et al.* 2018). Dünya Sağlık Örgütü, *Pseudomonas aeruginosa*'yı 2016'daki en yaygın enfeksiyonlardan biri olarak belirledi ve 2017'de araştırma ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için öncelikli bir enfeksiyon olarak etiketlemiştir (WHO 2017). *Pseudomonas aeruginosa*'nın esnekliği ve içsel katı ilaç direnci nedeniyle, antibiyotikler gibi yaygın antimikrobiyal tedaviler tipik olarak yetersiz etkinlik göstererek mortaliteyi artırır (Pang *et al.* 2019). *Pseudomonas aeruginosa*'nın çevresel streslerden koruyan ve fagositozu engelleyen biyofilmler oluşturma yeteneği, onlara kolonizasyon ve uzun süreli hayatta kalma yeteneği sağlar ve bu nedenle ciddi enfeksiyonların yönetimini daha da karmaşık hale getirir (Moradali *et al.* 2017). *Pseudomonas aeruginosa* tarafından kullanılan bağlantılı sinyal iletim yollarının bir ağı olan çekirdek algılama (QS), bakterilerin tek tek hücrelerle etkileşime girmesini ve nihayetinde tüm popülasyonların hayatta kalması ve uyum sağlaması için çok önemli olan kolektif davranışı yönlendirmesini sağlar (Mukherjee and Bassler 2019). Biyofilmler, zayıf yara iyileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunan kronik yara enfeksiyonlarının %90'ından fazlasından sorumludur. Yapılan çalışmalarda, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde 6,5 milyon kronik yara enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bunun sağlık hizmetlerine maliyeti yıllık 25 milyar ABD dolarının üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Sen *et al.* 2009). Sonuç olarak, *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarını mümkün olan en kısa sürede bakterilerin antibiyotiklere duyarlılığını artırmadan önce biyofilm oluşumu belirlemek çok önemlidir. Bu nedenle Gram-negatif olan bu bakteriyi etkisiz hale getirmek ve ortadan kaldırmak için, dünya çapında artan akut ve kalıcı enfeksiyon sıklığı ile vurgulanan geleneksel antibiyotiklere alternatif olarak tedavi tekniklerinin geliştirilmesi gerektiği öngörülmektedir.

Doğada görülen bakterilerin çoğu, çeşitli yüzeylere yapışarak biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bir biyofilm, hücre dışı bir polimerik matris içine alınmış çok sayıda

bakteriden oluşan bir bakteri matıdır, türlerin yaşam koşulları beklenmedik bir şekilde değiştiğinde (EPS) hayatta kalmak için kullandıkları bir yöntemdir. Sıcaklıktaki değişiklikler veya beslenme eksikliği bu koşullara iki örnektir (Moradali and Rehm 2020). Planktonik muadillerine kıyasla, biyofilmlerdeki bakteriler bağışıklık tepkilerini barındırmaktan kaçabilir ve bin kata kadar daha fazla ilaç direncine sahip olabilir. İyi bilinen bir biyofilm üreten bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm oluşumu üzerine çalışmalar için ideal bir model sağlar (Crespo *et al.* 2018). *Pseudomonas aeruginosa*, hayatta kalmak, gelişmek ve yönetmek için kistik fibroz akciğerinin karmaşık mikrobiyomunda sağlam bir biyofilm oluşturmalıdır (Oluyombo *et al.* 2019).

Bu çalışmada, farklı klinik vakalardan elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında bazı inhibitörlerin biyofilm genlerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle, çeşitli klinik vakalardan *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve tanımlanması, farklı antibiyotik sınıflarına karşı antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi, Biyofilm geminin fenotipik ve genotipik tespiti gerekmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Pseudomonas Aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa olarak bilinen gram-negatif, aerobik bir çubuk spor yapmaz. Bağışıklığı yeterli olduğu kadar bağışıklığı baskılanmış konakçıları da enfekte edebilir ve bir dizi hastalığa neden olabilir. Bağışıklığı baskılanmış konakçıları enfekte etme eğilimi, aşırı esnekliği, çok sayıda dinamik savunması ve antibiyotik direnci nedeniyle modern tıpta tedavisi çok zor bir organizmadır (Mulcahy *et al.* 2014). Çünkü yapışma, kolonizasyon ve biyofilm oluşumu yoluyla, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık yanıtlarından kaçarken dokuya önemli ölçüde zarar veren bir dizi virülans faktörü geliştirebilir (Turkina and Vikström 2019).

Toprak, bitkiler, hayvanlar ve insanlar dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda bulunabilen yaygın bir bakteridir (Bel Hadj Ahmed *et al.* 2020).

Polar flagella ile hareket edebilen ve 42°C'ye kadar büyüyebilen *Pseudomonas aeruginosa*'yı bir kapsül çevrelemektedir, ancak ideal büyüme ortamları 37°C'dir (Carroll *et al.* 2015).

Antibiyotiklere karşı doğal direnci nedeniyle *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle kistik fibroz, yumuşak doku, idrar yolu, deri, cerrahi ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında olmak üzere insanlarda ciddi enfeksiyonların önemli bir patojenik faktörüdür. Patojenin uyarlanabilirliği ve esnekliği nedeniyle, bu patojenle enfeksiyon büyük tedavi sorunlarına yol açabilir. Bunun nedeni, patojenin geniş virülans faktörleri dizisi, biyofilm oluşturma ve genetik materyali diğer bakteri türleriyle değiştirme kapasitesine bağlıdır (Hall *et al.* 2018, Mielko *et al.* 2019). Oksidaz için pozitif testler yaparlar ve katalaz enzimleri ve *Enterobacteriaceae* familyasına benzerler, ancak gıdalarını glikoz üretmek için fermente etmek yerine enerji için oksitleyen aerobik aeroblar olmaları nedeniyle onlardan farklıdırlar. Bu nedenle fermente etmeyenler olarak bilinirler (Levinson 2014).

Pseudomonas aeruginosa'nın dış zarı, geçirgenlik bariyeri görevi gören bir lipopolisakarit dış tabakası ve bir fosfolipid iç yüzü ile asimetriktir. Sitoplazmik zarı, simetrik bir fosfolipid çift tabakasından oluşur. *Pseudomonas aeruginosa*'nın dış zarında kanallar ve lipoproteinler dahil çok sayıda protein bulunabilir (Remans *et al.* 2010).

İnsanlarda en sık görülen fırsatçı patojen, *Pseudomonas aeruginosa*'dır ve dünya çapında nozokomiyal enfeksiyonlara önemli bir katkıda bulunur. Antimikrobiyal direnç ve biyofilm gelişimi, bu patojenin temel virülans özelliklerinden ikisidir ve uzun süreli enfeksiyonların devam etmesine izin veren şeyler bunlardır (Kamali *et al.* 2020). Antibiyotiğe dirençli biyofilmler oluşturma eğilimi, klinik ortamlarda son derece iyi bilinen kalıcılığının sorumlusudur (Thi *et al.* 2020).

2.2 Mikrobiyoloji

Gessard ilk kez 1882 yılında yeşil irinden *Pseudomonas aeruginosa* izole etmiş, Migula ise ilk kez 1894 yılında *Pseudomonas* cinsini tanımlamıştır (Palleroni 2010). *Pseudomonaceae* familyası doğanın her yerinde bulunur (toprakta, bitkilerde ve su ortamlarında; kuşlar gibi daha küçük hayvanlara da rezervuar denir) (Klockgether and Tümmler 2017). Mastitis, sığırlarda endometrit ve hayvanlarda idrar yolu enfeksiyonları gibi insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda enfeksiyonlara en sık *Pseudomonas aeruginosa* (hem cins içinde hem de NFGNB içinde) neden olur (Haenni *et al.* 2017). Cinsin farklı bir çeşidi, hemorajik septisemi ve ülseratif sendroma neden olabilen bir balık patojeni olarak bilinmektedir (Algammal *et al.* 2020).

2.3 Patogenez

P. aeruginosa geniş ölçüde dağılmıştır ve toprak ve su dahil olmak üzere çok çeşitli ortamlarda, doğal hallerinde bitkilerde ve insan ve diğer hayvanların derisinde bir parazit olarak doğal olarak bulunur (Bhasin *et al.* 2015) ve bu farklı ortamlarda bulunmaları, karbonhidratlar ve nitrojen bileşikleri dahil olmak üzere birçok bileşikten enerji kaynağı

olarak yararlanabilmelerine bağlıdır. Ayrıca, karmaşık büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar (Blanc *et al.* 2007).

Pseudomonas aeruginosa, enfeksiyona duyarlı insanlara karşı daha duyarlı olduklarından, özellikle bağışıklık sistemi zayıf olanlarda enfeksiyonlara neden olma konusunda sürekli gelişme halindedir (Salimi *et al.* 2009). Ayrıca, solunum yolu enfeksiyonları yoluyla enfeksiyon, *Pseudomonas aeruginosa*'nın bir kişiden diğerine yayılmasında rol oynar. Hastaların dokularına ve ellerine bulaşır ve daha sonra hastaların derisi ve giysileriyle doğrudan temas yoluyla ve ayrıca patojen taşıyıcıları tarafından su ve gıda kontamine olduğunda sindirim sistemi enfeksiyonları ile bulaşır (Martínez-Solano *et al.* 2008). Antibiyotikler, deterjanlar ve dezenfektanlar gibi bir dizi kimyasal maddeye karşı direnci, patojenitesini geliştirmiştir (Mitiku *et al.* 2014) ve bu bakterinin dezenfektanlarda ve sıvı ilaçlarda kalmasına izin verilmiştir. Bu, özellikle kritik bakım ünitesinde, hastanede yatan hastalarda bu bakteriyel enfeksiyonun sıklığının artmasına yardımcı olmuştur (Ochoa *et al.* 2013). Birçok çalışma, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde bakteriyeminin birincil nedenlerinden birinin *Pseudomonas aeruginosa* pnömonisi ve menenjit olduğunu bulmuştur (Crivaro *et al.* 2009).

Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* kulak enfeksiyonları, endokardit, kemik ve eklem yaralanmaları, idrar yolu enfeksiyonları, mide ve bağırsak enfeksiyonlarına neden olduğu gibi özellikle yanık merkezlerinde hastane kaynaklı enfeksiyonların ana etkenidir (Salimi *et al.* 2010).

Pseudomonas aeruginosa'nın sağlık hizmetlerine bağlı tüm enfeksiyonların %7,1-%7,3'ünde bulunduğuna inanılmaktadır (Magill *et al.* 2014, Weiner *et al.* 2016). Bağırsaklarda ve solunum sisteminde doğal olarak bulunması, konakçının savunmasında bir kusur meydana geldiğinde başka yerlere taşınarak enfeksiyona neden olabilir. Enfeksiyonun oluşabileceği dış kaynaklar da vardır ve bu kaynaklar cerrahi aletler, solunum tüpleri, su ve yiyecekler olarak sıralanabilir.

Pseudomonas aeruginosa pnömonisi en tipik *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonudur ve nozokomiyal pnömoni ile bağlantılı en tipik Gram negatif bakteridir (Williams *et al.* 2010, Parker *et al.* 2008).

Pseudomonas aeruginosa, kistik fibrozlu (KF) kişilerde kalıcı akciğer enfeksiyonlarına katkıda bulunan önemli bir neden olabilir, ayrıca bir biyofilm geliştirebilir ve insan alt solunum yolu mukusuna yapışabilir (Finnan *et al.* 2004). Başlangıçta KF hastalarının akciğerlerini 5 ile 9 yaşları arasında kolonize eder; 18 yaşın üzerindekilerin %80'inin balgam kültürü yapılabilir (Fibrosis 2009).

Pseudomonas aeruginosa temelli enfeksiyonlar, yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastalar arasında oransal olarak yüksektir. *Pseudomonas aeruginosa* tüm yoğun bakım kaynaklı enfeksiyonların %23'üne ve hasta enfeksiyonlarının %16,2'sine neden olmuştur. Kritik bakım ünitelerindeki hastalarda enfeksiyonların sebep olduğu en yaygın hastalıklar solunum yolu enfeksiyonlarıdır (Vincent *et al.* 2017).

Spesifik olarak, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarına (İYE) sıklıkla *Pseudomonas aeruginosa* neden olur. YBÜ hastalarında İYE'lerin %16'ya varan oranlarda ve ÜYE'lerin %10'a varan oranlarda nedeni *Pseudomonas aeruginosa*'dır (Rosenthal *et al.* 2016).

Yanık hastalarının nemli ortamı nedeniyle, önemli bir patojen olan ve yanık mağdurlarında iyi bilinen yan etkisi olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın yanık hastalarına fayda sağladığı düşünülmektedir (Norbury *et al.* 2016). *Pseudomonas aeruginosa*, yanık hastalarında enfeksiyonlara neden olan, sepsis ve ölümle bağlantılı en yaygın Gram negatif bakteridir (Azzopardi *et al.* 2014). Pediatrik yanık yoğun bakım ünitelerinde, sepsis ölümlerinin %86'sından sorumludur (Schaarup *et al.* 2018).

Orta kulağı etkileyen herhangi bir inflamatuar veya enfeksiyöz hastalık otitis media olarak adlandırılır ve *Pseudomonas aeruginosa* bu durumun yaygın bir nedenidir (Sheets *et al.* 2016). Kronik süpüratif OM (CSOM) olarak bilinen orta kulak durumu, delikli kulak zarı yoluyla altı haftadan uzun süre devam eden orta kulak drenajı ile tanımlanır

(Atkinson *et al.* 2016). CSOM'un en yaygın nedeni bakteriyel bir enfeksiyondur. *Pseudomonas aeruginosa*, CSOM'nin en ciddi küresel halk sağlığı sorunlarının birincil nedenlerinden biridir (Mittal *et al.* 2015), CSOM, işitme yeteneğinde azalmaya ve menenjit ve beyin apseleri gibi potansiyel olarak ölümcül merkezi sinir sistemi sonuçlarına neden olur (Lipsky *et al.* 2010). Bu durumu tedavi etmek ve sonuçlarının önlenmesine yardımcı olmak için acilen yeni ilaçlar oluşturulmalıdır.

Ortalama olarak, biyomateryaller nozokomiyal enfeksiyonların %60-70'i ile ilişkilidir (Yasir *et al.* 2018). Tıbbi ekipmanla ilişkili biyofilm enfeksiyonlarının en yaygın nedeni, özellikle kalıcı tıbbi cihazlar olmak üzere abiyotik yüzeylerde bakteri kolonizasyonudur. Kalp pilleri, yapay eklemler, hemodiyalizörler, merkezi venöz kateterler, idrar sondaları, endotrakeal entübasyon, yapay göğüsler, kontakt lensler ve ortodontik protezler dahil olmak üzere implante edilen tüm tıbbi cihazlar, biyofilmle ilişkili enfeksiyon riski taşır. Yaşam beklentisi, bazıları ölümcül olabilen birkaç hastalık nedeniyle kısalır (Mulcahy *et al.* 2014).

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonları, kistik fibroz, kanser, nötropeni, bronşektazi, yanıklar, AIDS, organ nakli, kontrolsüz şeker hastalığı ve yoğun bakım yatışları gibi bağışıklığı baskılanmış hastalıkları olan kişilerde önemli ölçüde daha yaygındır. Kalıcı kateterler veya endotrakeal tüpler gibi genişleyen ekipman kullananlar, organizmanın tespit edilmesi zor olan biyofilmler oluşturma konusundaki şaşırtıcı eğilimi nedeniyle özellikle risk altındadır (Williams *et al.* 2009).

2.4 Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotiklerin bakteri üremesini öldürmesinin veya durdurmasının çeşitli yolları vardır. Bunlar penisilinleri (penisilinler, Amoksisilin/klavulanik asit), (Imipenem) içeren karbapenemleri ve sefalosporinleri içeren β-laktam grubudur.

Artan antibiyotik direnci, önemli bir halk sağlığı sorunudur (Cassini *et al.* 2019). Geleneksel antibiyotiklerin kullanımı, artan direnç nedeniyle engellenir ve bu da verimsiz

ampirik antimikrobiyal tedavinin kullanımında artışa neden olur. Enfeksiyonlar, uygun şekilde tedavi edilmezlerse ağrıya, sakatlığa ve ölüme neden olabilir ve sağlık sistemleri ve genel olarak toplum üzerinde muazzam bir mali yük oluşturur (Fair and Tor 2014). Son 20 yılda FDA, artan tıbbi ihtiyaçlara rağmen daha az sayıda yeni antibakteriyel ilacı onayladı (Kinch *et al.* 2014). Çoklu ilaca dirençli Gram-negatif bakterilerin neden olduğu hastalıklar için klinik ortamlarda araştırılan çok az ilaç olması endişe vericidir (Bush and Page 2017).

2.5 Virulans Faktörleri

Çeşitli virülans faktörlerini salgılayarak, *Pseudomonas aeruginosa,* konakçılardaki elverişsiz ortama transkripsiyon yapabilir ve enfeksiyon ve hastalığa yol açabilir (Vidaillac and Chotirmall 2021). Lipopolisakarit (LPS) içindeki Lipid A endotoksik olduğundan, doku hasarına neden olabilir, adezyonu teşvik edebilir ve konakçı reseptörün tanımlanmasına yardımcı olabilir. Dış broşürü koruyan ve konakçı hücreleri yok eden yüzey yapısı LPS içermelidir (Park *et al.* 2022). LPS, biyofilm gelişimi ve antibiyotik duyarlılığı ile bağlantılı olabilir (Chambers *et al.* 2017). Ek olarak, OMP'lerin beslenme transferi, adezyon ve antibiyotik direncinde rolü vardır (Sabnis *et al.* 2021). Ek olarak, flagellum, pili ve diğer adezinler, biyofilmlerin gelişmesiyle ortaya çıkan ilaç direnci ile ilgilidir (Ozer *et al.* 2021). Dördüncüsü, salgı sistemleri altı ana gruba ayrılabilir. Kemotaktik sinyallere yanıt olarak, konakçının kolonizasyonu, ona bağlanması, yüzmesi ve kaynaması için kullanılan flagella (T6SS ile ilişkili), pili (T4SS ile ilişkili) ve çok toksinli bileşenler tip 3 salgılama sisteminden (T3SS) oluşurlar. Aljinat, Psl ve Pel, biyofilmlerin gelişimini teşvik ederken bakteri klirensini engelleyebilecek ekzopolisakkarit örnekleridir (Ozer *et al.* 2021).

2.6 Pigment Üretimi

Pseudomonas aeruginosa bakterileri tanısal özelliklere sahip birçok pigment üretir ve bu pigmentler arasında mavi-yeşil renkli piyosiyanin hücre dışı bir virülans faktörüdür (Parsons *et al.* 2007). Bu Pigmentleri içeren kültür ortamında büyüdüklerinde Gram pozitif bakterilerin gelişimini engeller (El-Shouny *et al.* 2011). Piyosiyanin pigmentleri

(Fenozinyum-5-metil-hidroksi) türevlerinden biridir ve bu bileşiklerin aynı habitatta bulunan bazı bakteri türlerinin inhibe edilmesi sürecinde etkisi vardır (Pierson and Pierson 2010). İnsan hücrelerini hücrelerdeki solunum sürecini etkileyecek şekilde de etkileyebilir (Lau *et al.* 2004).

Piruvin pigmenti, bu pigment ultraviyole ışınları altında flüoresandır ve gen (PvdA) tarafından kodlanır ve bakteri hücresindeki demir eksikliği koşullarında eksprese edilen üretimini kodlayan başka genler de vardır (Creanga *et al.* 2011). *Pseudomonas aeruginosa*, iki tipten biri pirofin olan demir taşıma sistemine sahiptir. Piruvat pigmentleri büyük önem taşır çünkü demir eksikliği veya kaybı hücre bölünmesi sürecini etkiler ve DNA sentezi sürecini durdurur (Imperi *et al.* 2009).

2.7 *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Enfeksiyonları

Sıcaklık ve beslenme mevcudiyeti gibi yaşam koşullarındaki beklenmedik değişikliklere rağmen türlerin hayatta kalması için en önemli mekanizmalardan biri, kendiliğinden oluşan hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matrisi (Moradali and Rehm 2020) içine alınmış birçok bakterinin bir kombinasyonu olan biyofilmdir. Biyofilmlerin çevrede ekolojik bir role sahip olduğu ve sağlık hizmetleriyle yakından ilgili hastalıklar yaratarak tıpta önemli bir etkiye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), bakteriyel biyofilmlerin kronik enfeksiyonların %80'inden ve mikrobiyolojik hastalıkların %65'inden sorumlu olduğunu tahmin etmektedir (Jamal *et al.* 2018).

Planktonik muadilleriyle karşılaştırıldığında, biyofilmlerdeki bakteriler antimikrobiyal tedavilere 1000 kata kadar daha dirençlidir ve ayrıca konakçının bağışıklık yanıtlarından da kaçabilirler (Lewis 2001). Tanınmış bir biyofilm üreticisi olan *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm gelişimini araştırmak için harika bir modeldir (Crespo *et al.* 2018). Ghafoor *et al.* (2011)'e göre, *Pseudomonas aeruginosa*, gıda endüstrisinde ve karıştırma tankları, fıçılar ve borular dahil olmak üzere tıbbi ekipmanlarda kullanılanlar dahil olmak üzere çeşitli yüzeyleri etkili bir şekilde kolonize etme yeteneğine sahiptir (Coughlan *et al.* 2016). Biyofilmle ilişkili hastalıkların etkili tedavisi, önlenmesi ve en önemlisi yok edilmesi için, biyofilmin yapısını ve içeriğini ve ayrıca bir biyofilm içinde yaşayan

bakterilerin antimikrobiyal toleransının arkasındaki moleküler süreçleri anlamak çok önemlidir.

2.8 *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmleri

Pseudomonas aeruginosa önce serbest yüzen bir bakteriyi şartlandırılmış bir yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlar. Yüzey adezinleri daha sonra yapışan bakterileri kalıcı olarak birbirine bağlar ve daha sonra tamamen yerleşik bir biyofilm oluşturmak için hücre dışı bir matris üretilir. Son olarak, bakteriler daha fazla yüzeyi kolonize etmeye ve matriksin dışına yayılmaya başlar (Jamal *et al.* 2018).

Aljinat, pel ve PSL, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm yapısının kararlılığını etkileyen birkaç polisakkarittir. D-mannuronik asit ve L-glukuronik asit, aljinat olarak bilinen dallanmamış polimer zincirinin iki bileşenidir. İmplante edilmiş bakteriler için bir beslenme kaynağı sunduğu varsayılan ve hücreden hücreye iletişim için kritik olan E DNA, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin bir başka temel bileşenidir (Strateva and Mitov 2011).

Konsantre hücre koleksiyonları olan biyofilmler tarafından üretilen hücre dışı matris bileşenleri, topluluğu bir arada tutar. Biyofilm geliştirme modu, genetik materyal alışverişini geliştirir, hücreleri kaynaklara yakın tutar ve hücreleri fagosit yutulması gibi çeşitli kimyasal ve çevresel zorluklardan korur (Davey and O'toole 2000). Bir biyofilm oluşturan kendi kendine salgılanan matris, Polisakkaritler (%1-2), RNA (%1), DNA (%1), proteinler (%2) ve sudan (%97) oluşur. Üç ekzopolisakarit Pel, Psl ve aljinat, biyofilm matrisinin bileşen parçalarının çoğunu oluşturur. İnsan bağışıklık sisteminde yer alanlar ve bakteri hücresinin antibiyotiklere karşı korunması gibi bir dizi biyolojik işlemi gerçekleştirirler (Al-Wrafy *et al.* 2017). Planktonik kültürde yetiştirilen özdeş bakteri türleri ile karşılaştırıldığında, biyofilmlerde gelişen bakteriler sıklıkla bir dizi fenotipik varyasyon gösterir. Bu varyasyonlar, değişen hareketliliği, belki de hücre dışı polisakkaritlerin artan sentezini ve yüksek antibiyotik direncini içerir (Sauer and Camper 2001). Beş gün boyunca bir biyofilmin oluşturulmasını takiben, DNA mikroarray analizini kullanan çalışmalar, 70'ten fazla *Pseudomonas aeruginosa* geninin

ekspresyonunda farklılıklar bulmuştur (Whiteley *et al.* 2001). *Pseudomonas aeruginosa*, bir biyofilm geliştirmeden önce inorganik bir yüzeye bağlandığında, proteomik profilleme, protein profillerinde %50'den fazla değişiklik gösterir (Sauer *et al.* 2002).

2.8.1 Biyofilm başlatma

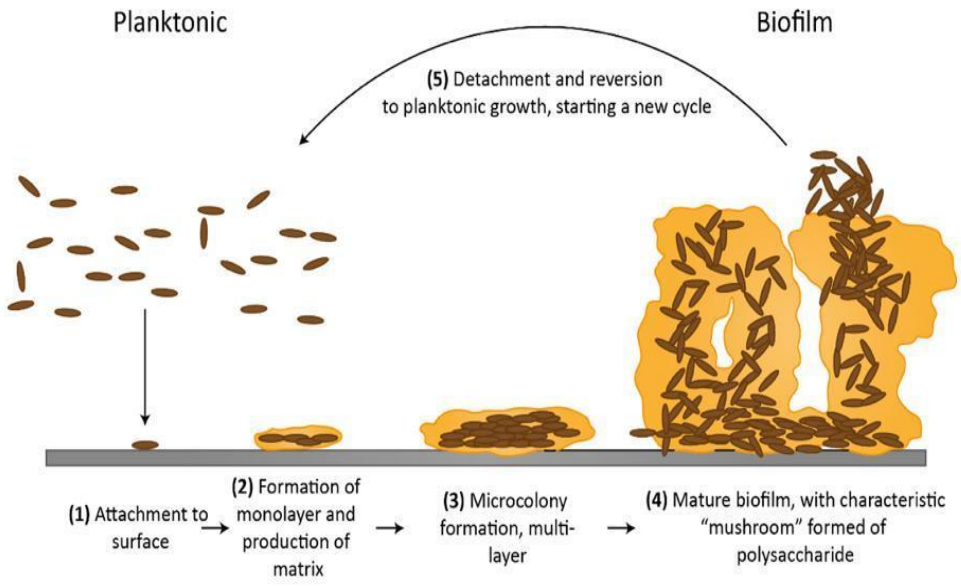
Geleneksel teoriler, tek hücrelerin in vitro biyofilmlerin üretimine başlamak için rastgele yüzeylere yapıştığını savunmuştur. Bu tek hücreler bölünerek olgun, üç boyutlu biyofilmler haline gelir (Dufour *et al.* 2010). Ancak, As hücreleri ya büyük hücre yığınlarının dökülmesiyle ya da yalnız hareketli hücrelerin yayılmasıyla yeni biyofilmler oluşturmak için yayılır (Vasudevan 2014). Bundan sonra hem tek hücreler hem de çok hücreli kümelenme, yeni biyofilmleri başlatabilir. Su biyofilmlerinde, planktonik çok hücreli agregaların artan yapışkanlığının ve yüzey şartlandırmanın, biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında bakterilerin yüzeylere yapışmasını arttırdığı gösterilmiştir (Fernández-Barat and Torres 2016). Organik polimerlerin ve kolloidlerin daha yüksek konsantrasyonları, yarı fenotipik bir fizyolojik özellik olarak düşünülebilecek daha yüksek yapışkanlık ve yüzey koşullandırmasına neden olabilir. Buna benzer şekilde, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm üretimi de muhtemelen daha yüksek yapışkanlık için bir vekil olan, kümeleşmeye yönelik gelişmiş bir eğilimle ilişkilendirilmiştir (Häussler and Parsek 2009).

2.8.2 Biyofilm oluşumu

Kitle taşıma, yapışma, çoğunluk algılama, ayrışma, hücre ölümü ve dağılma dahil olmak üzere çok sayıda süreç biyofilm gelişiminin döngüsel ve karmaşık sürecini kontrol eder. Bu mekanizmalar arasında difüzyon, kimyasal reaksiyon, ekolojik mekanizmalar, taşıma, yapışma ve çekirdek algılama yer alır (Harmsen *et al.* 2010). Biyofilmler, sürekli olarak çevrelerine uyum sağlayan mikropların yapısal mimari grupları olarak düşünülür (Schwartz *et al.* 2009) ve birkaç saat içinde bakteriyel biyofilmler tamamen yerleşmiş olabilir (Lee *et al.* 2014).

Biyofilm gelişimi dört temel aşamada gerçekleşir:

- Fiziksel kuvvetler, önce planktonik bakterileri yüzeyle temas edecekleri bir yüzeye çekmek için kullanılır.
- Adherent hücreler, hücre dışı bir polimerik kompozit matris oluşturur ve geri dönüşümsüz bir şekilde yüzeye yapışır, bu da hücrelerin kümelenmesine yol açar.
- Biyofilm olgunlaştıkça üç boyutlu bir mimari üretmek için mikro koloniler gelişirç
- Olgun biyofilmdeki hücrelerden oluşan mikro koloniler, yeni bağlanma bölgelerini kolonize etmek ve enfeksiyonu yaymak için boşaltılır (Wolcott *et al.* 2013) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun şematik gösterimi (Jakobsen *et al.* 2013)

2.8.2.1 Biyofilm oluşumunda hücre dışı matris bileşenlerinin rolü

Bir yüzeye tutturulmuş ve hücre dışı bir polimerik malzeme matrisi içine alınmış organize bir mikroorganizma topluluğu, bir "biyofilm" (EPS) olarak adlandırılır. EPS, ekzopolisakkaritler, proteinler, eDNA, eRNA, lipitler ve diğer maddelerden oluşur (Caiazza *et al.* 2005).

Biyofilm yaşam biçimi için gereken çeşitli kimyasal mikro ortamlar ve mekanik stabilite EPS matrisi tarafından sağlanır. EPS, yapısal stabilite ve faydalı bir ortam sağlamanın yanı sıra antimikrobiyallere ve bağışıklık hücrelerine karşı biyofilm direncini geliştirir (Caiazza and O'Toole 2004).

2.8.2.2 Biyofilm oluşumunda bakteriyel hücreden hücreye sinyalleşmenin rolü

Bakterilerin çoğu, genellikle yüzeylerde bulunan ve biyofilm adı verilen yapılarda bulunur. Biyofilm üyeleri, yırtıcılık, kuruma, antibiyotikler ve konakçı bağışıklık tepkisi gibi bir dizi çevresel zorluğa karşı dayanıklılıklarını artıran temel fizyolojik değişiklikler sergilerler (Flemming *et al.* 2016).

Nükleer tespit, yayılabilir bir maddenin salındığı ve bir grup bakteri tarafından tespit edildiği bir mekanizmadır. Virülans faktörlerinin üretimi, mikrobiyal türlerin çekirdek algılamanın bir sonucu olarak aniden değiştirebileceği bir aktivitedir. Hücrelerin birlikte çalışması, iletişim kurması ve birbirlerine sinyal göndermesi çok önemlidir. Membran keseciklerinin, bir süredir biyofilm matrisinin önemli ancak yeterince kullanılmayan bir bileşeni olduğu ileri sürülmüştür (Koo *et al.* 2017) ve son zamanlarda, membran veziküllerinin hücreler arası DNA transferi için çok önemli olabileceği öne sürülmüştür (Fuqua and Greenberg 2002). Biyofilm büyümesinin başlatılması ve kontrolü ile ilişkili benzersiz bir çoğunluk algılama sinyalinin, membran veziküllerinin kullanımıyla doğrudan hücreden hücreye aktarılabileceği düşünülmektedir (Schooling and Beveridge 2006).

2.8.2.3 Biyofilm oluşumunda bakteriyel alt popülasyon etkileşimlerinin rolü

Antibiyotik direnci, kalıcılık ve virülans faktörlerinin oluşumu gibi olası tehlikeler nedeniyle bakteriyel patojenler, özellikle tıbbi ve gıda işleme alanlarında çok fazla ilgi çekmiştir (Schooling *et al.* 2009).

Doğada görülen biyofilmlerin çoğu çoklu türdür ve bu türler arasındaki etkileşimler bu toplulukların nasıl büyüdüğünü, yapılandırıldığını ve çalıştığını etkileyebilir. Bu nedenle, çok türlü biyofilmlerin karmaşıklığı ve etkileşimleri, son birkaç yılda devam eden çalışmaların odak noktası olmuştur. Yüksek verim ve yüksek çözünürlüklü teknoloji, genetik değişim, metabolit değişimi ve biyofilm topluluklarındaki bakteriler arasındaki iletişim dahil olmak üzere karmaşık mikrobiyal etkileşimler hakkındaki bilgimizde bu gelişmeyi sağlamıştır. Bu etkileşimler, biyofilmlerin nasıl geliştiğinin yanı sıra, bu formların genel olarak ne kadar zararlı olduğu üzerinde bir etkisi olabilecek potansiyel virülans özellikleri üzerinde bir etkiye sahip olabilir (Mashburn and Whiteley 2005).

2.9 Antibiyotik Toleransı

Direnç kazanmadan antibiyotik maruziyetini tolere edebilen mikroorganizmaların tolere edilebilir olduğu söylenir. Ek olarak, toleransın her zaman antibiyotik direncinden önce geldiği tespit edilmiştir, bu da toleransın önlenmesinin antibiyotik direncinin nasıl azaltılacağı konusunda yeni bilgiler sağlayabileceğini düşündürmektedir (Trastoy *et al.* 2018). Antibiyotik toleransı, genetik olarak mutasyonlar veya yatay gen transferi ile üretilen antibiyotik direncinin aksine, gizli kalıcı hücreler ve biyofilmler olarak bilinen fenotipik durumlar yoluyla bakteriyel kalıcılığı içerir (Levin-Reisman *et al.* 2017). Metabolize olmayan (biyofilmle ilişkili) bakteri popülasyonları mevcut olduğunda, hücre duvarı yapımında yer alanlar gibi aktif olarak metabolize olan hücreleri hedefleyen antibiyotikler tipik olarak başarısız olur ve bu tolerans mekanizması tekrarlayan, kronik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Bryers 2018).

2.9.1 *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin antimikrobiyal toleransı

Mikrobiyal biyofilmlerin en sık karşılaşılan özelliklerinden biri, bakterilerin yüksek doz antibiyotik tedavisine direnç gösterme kapasitesidir. Biyofilm bozulursa, bakteriler antibiyotiğe duyarlı hale gelir ve düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerine sahip olur. Yükseltilmiş MIC'ler ve biyofilmden dağılan bakterilerin dirençli bir fenotipi ile gösterilen "direnç"in aksine, bu tür antibiyotik tedavisi direnci biyofilmlerle ilişkilidir ve "tolerans" olarak adlandırılır. Edinilmiş mutasyonlar, akış

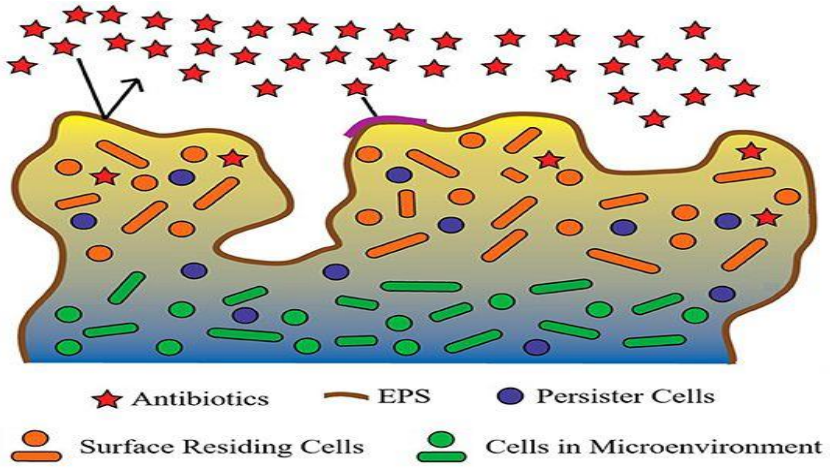
pompaları veya antibiyotik modüle edici enzimler sıklıkla ilacın moleküler hedefini ortadan kaldırdığından, bakteriler bir biyofilme gömülmemiş olsalar bile sıklıkla antibiyotik tedavisine direnç gösterebilirler. Antibiyotiğe toleranslı hücreler, yalnızca biyofilmlerle kaplandığında yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına dayanabilir. Biyofilmlerin antibiyotik tedavisine direnci hem toleransın hem de direncin bir sonucudur (Kaplan 2010).

Planktonik bakteri popülasyonlarını karakterize etmek için kullanıldığında, "antibiyotik toleransı" ifadesi, bakterisidal antibiyotik tedavisine dirençli olan ancak henüz antibiyotik direncinin belirleyicilerini geliştirmemiş bakteri hücrelerini ifade eder. Büyük ölçüde, hücresel stres tepkileri ve ilgili sistemler tarafından düzenlenen çevresel stresin getirdiği değişen fizyolojik durum, planktonik bakterilerde antibiyotik toleransını belirler. Bakteriler, yüzeylere yapışık olsun veya olmasın, planktonik hücrelerin karşılaşmadığı yapılandırılmış bir ortam oluşturmak için biyofilmlerde toplanır. Biyofilmin önemli bir kısmı, biyofilmin benzersiz ortamına yanıt olarak gelişen toleranslı alt popülasyonlardan oluşur. Hücre dışı matris veya anaerobik koşullar, bu alt popülasyonlar ve tolerans mekanizmaları ile ilişkili olabilir (Trastoy *et al.* 2018).

2.9.2 Biyofilm direnci ve toleransı

Bakterisidal veya bakteriyostatik antimikrobiyal ilaçlar mevcutken, normalde büyümeyi inhibe edici konsantrasyonlarda dirençli bakteriler gelişebilir. Bir antimikrobiyal ilacın bakteriyel büyümeyi durdurmak için gerekli olan minimum konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak bilinir ve kültürlerdeki direnci değerlendirmek için sıklıkla kullanılır. Direnç bazen doğuştan gelse ve bu nedenle vahşi tipteki genlere ve hücresel özelliklere bağlı olsa da direncin mutasyonlar veya antibiyotiklere dirençli genetik bileşenlerin değişimi (kazanılmış direnç) tarafından indüklendiği yönündedir (Yan and Bassler 2019). Örneğin, gram-negatif dış zarın geçirimsizliğinin artması nedeniyle Gram-negatif bakteriler, vankomisin gibi ilaçlara Gram-pozitif hücrelere göre doğal olarak daha dirençlidir. Bir antimikrobiyal ilacın amaçlanan hedefle temas etmesini önlemeye yönelik bir teknik, direnç mekanizmalarıyla tanımlanır (Blair *et al.* 2015). Bu hipotez, değerlendirmenin antibiyotik akış pompaları, antibiyotikleri tutan maddeler

(eDNA ve NdvB'den türetilmiş periplazmik glukanlar gibi) ve matris beta-laktamazlar gibi biyofilm direnç mekanizmaları örneklerini dikkate alacağını önermektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biyofilm antimikrobiyal toleransına katkıda bulunan mekanizmalar (Penesyan *et al.* 2015)

2.10 Bakteriyel Biyofilmlerde Antibiyotiğe Direnç

Antibiyotik biyofilm direnç mekanizmaları hala tartışılmaktadır, ancak birkaçı ortaya konmuştur, örneğin:

- Zayıf antibiyotik penetrasyonu ve biyofilmde değişen bakteriyel büyüme, dirence yol açar (Lewis 2008).
- Yatay gen transferi yoluyla, *Pseudomonas aeruginosa* dahil bazı bakteriler direnç geliştirebilir (Hall and Mah 2017).
- Nadir durumlarda bakteriler, antibiyotikleri gelişmekte olan biyofilmlerden uzaklaştırmak için çoklu ilaç akış pompaları yoluyla hücre dışı matrise pompalayabilir. Bu, dirence yol açabilir (Gupta *et al.* 2016).
- Polimikrobiyal biyofilmlerin ayrıca bakteri ve mantar arasındaki etkileşimleri önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. *S. epidermidis* ve *C. albicans*'ın biyofilminde, vankomisin direncinin artması, mantar matrisinin bir antibiyotik bariyeri olarak işlev gören bir bileşeninden kaynaklanmıştır (Adam *et al.* 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmamızda kullanılan materyaller beş başlık altında incelenmiştir.

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Çalışmada kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Laboratuvar ekipmanları

Makine	**Şirket/Menşei**
Santrifüj	Fisher Scientific, ABD
Jel Görüntüleme Sistemi	Major Science, Tayvan
Mikro Döndürmeli Santrifüj	My Fugene, Çin
Mikropipet	Human, Almanya
Mikrodalga fırın	GOSONIC, Çin
OWL Elektroforez Sistemi	Thermo, ABD
Kuantus Florometresi	Promega, ABD
Buzdolabı	TEKA, İspanya
Termal ısıl döngüleyici	Thermo Fisher Scientific, ABD
Vorteks	Quality Lab System, İngiltere
Mikrotitre plakaları 96 kuyu	AFMA, Ürdün

3.1.2 Hazır kültür ortamı

Çalışmada kullanılan kültür ortamları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Kültür besiyeri

Kültür ortamı	**Üretici**
MacConkey Agar	Hollanda
Simmon Sitrat Agar	Himadia (Hindistan)
Muller-Hinton Agar	Oksoid (İngiltere)
Besin Agarı	Oksoid (İngiltere)
Setrimid agar	Himedia (Hindistan)
Üçlü şeker demir agar	Oksoid (İngiltere)
Tripton Soy Agar	Oksoid (İngiltere)

3.1.3 Kitler

Çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler

Kitler	**Şirket/Menşei**
ABIOpure™ Toplam DNA	ABIOpure, ABD
GENEZol™	Geneaid, Çin
AccuPower ® RocketScript™ RT PreMIX	Bioneer, Kore
Agaroz, $C_{21}H_{20}BrN_3$ Solüsyon (10mg/mL), GoTag Green Master Mix, Nükleazsız Su, TAE 40X, Quantifluor dsDNA Sistemi	Promega, ABD
Primerler	Macrogen, Kore

3.1.4 Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.4'te gösterilmiştir

Çizelge 3.4 Kimyasal malzemeler

Malzeme	**Üretici Firma**
Agaroz	Bio Basic INC (Kanada)
Mutlak etanol (%99)	ROMIL saf kimya (İngiltere)
Etanol (%70)	BHD (İngiltere)
Kristal menekşe lekesi	Promega (ABD)
Gram boyama Kristal menekşe, iyot, aseton ve safranin	Sera ve aşı enstitüsü (Irak)
DNA Markörü (100-2000 baz)	Bioneer (Kore)
Tris- Asetat EDTA tamponu 10X (TAE)	Bio Basic INC (Kanada)
Yükleme Boyası 6X DNA	Geneaid (Tayland)
(NNNN-tetra-metil-p-fenilen-diamin dihidro klorür)	Difco (İngiltere)
Etidyum bromür boya	Bio Basic INC (Kanada)
Normal salin solüsyonu	Schuchard (Almanca)
Deiyonize steril su	Bioneer (Kore)
PCR ana karışımı	Bioneer (Kore)
Fosfat- tamponlu salin (PBS)	Kimyasal Nokta (Almanya)

3.1.5 Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Primerler

Primer	Sıra 5'-3'	Sıcaklık (°C)	Ürün boyutu (bp)	Referanslar
pslA-F	TGGGTCTTCAAGTTCCGCTC	55	119	Abdulhaq *et al.* 2019
pslA-R	ATGCTGGTCTTGCGGATGAA			
PslD-F	CTCATGAAACGCACCCTCCT	52	295	Kamali *et al.* 2020
pslDR-R	TGCGACCGATGAACGGATAG			
PA-SSF	GGGGATCTTCGGACCTCCA	56	956	Oluborode *et al.* 2018
PA-SSR	TCCTTAGAGTGCCCACCCG			

3.2 Yöntem

Çalışmamızda aşağıda anlatıldığı gibi farklı yöntemler kullanılmıştır.

3.2.1 Sterilizasyon

Otoklav, tüm kültür materyallerini 121°C'de ve 15 pound/rpm'de 15 dakika sterilize etmek için kullanıldı. Cam eşyalara gelince, fırında 180°C sıcaklıkta iki saat sterilize edildi.

3.2.2 Kültür medyasının hazırlanması

Hazır kültür ortam hazırlığı: Üreticinin talimatlarına göre hazırlanan kültür ortamı (MacConkey Agar, Simmon Sitrat Agar, Muller-Hinton Agar, Nutrient Agar, Cetrimide agar) sterilizasyon için 121°C'de ve 15 pound/rpm'de otoklavlandı, ardından steril tüplere ve petri plakalarına konuldu, 24 saat 37°C'de inkübasyonun ardından soğumaya bırakıldı.

3.2.3 Örnek toplama

Mayıs 2022'den Eylül 2022'ye kadar, Şehit Gazi Hariri Hastanesi ve Bağdat Eğitim Hastanesi'nden her iki cinsiyetten ve farklı yaşlardan 100 örnek toplandı.

3.2.4 Bakteriyel izolatların tanımlanması

Morfolojik inceleme: *Pseudomonas aeruginosa'*nın fenotipik özellikleri, koloni şekli, rengi, boyutu ve kokusu açısından özellikleri teşhis etmek için Setrimid-agar, MacConkey agar üzerindeki büyümesi ve ayarlanmış özel agar üzerinde renk üretimi yoluyla incelenmiştir (Wanger *et al.* 2017).

Mikroskop muayenesi: Bakteriyel izolatlar, hücrelerin şeklini, agregasyonunu ve Gram boyaya tepkilerini belirlemek amacıyla Gram boyama ile mikroskobik incelemeye tabi tutuldu (Levinson 2014).

Biyokimyasal testler

- Oksidaz testi: Önceden üretilmiş oksidaz reaktifinden birkaç damla daha sonra filtre kağıdına aktarılmış olan MacConkey agar kolonilerinden birine uygulandı. Mor bir renk tonu göründüğünde, test başarılı olmuştur olarak değerlendirilir (Hemraj *et al.* 2013).
- Katalaz testi: Temiz, kuru bir cam lam üzerine, bir damla katalaz reaktifi (%3 hidrojen peroksit) ile muamele edilmeden önce bir MacConkey agar kolonisi aktarıldı. Kabarcıkların varlığı katalaz oluşumunun olduğunun göstergesidir (Hemraj *et al.* 2013).
- Sitrat kullanım testi: Çizim yaklaşımı, Simmons Citrate Agar besiyerinde MacConkey agar üzerinde bir bakteri kolonisi geliştirmek için kullanıldı. Ortamın yeşilden maviye kayması ve bakteri üremesinin varlığı testin başarılı olduğunun işaretleridir (Brown and Smith 2014).
- Üçlü şeker-demir agar testi (TSI): Öncelikle besiyerinin ortasından tüpün dibine bir iğne sokulduktan sonra deliğin üzerine eğimli bir agar yüzeyi çizildi, TSI besiyerine MacConkey agardan bir koloni enjekte edildi. Meydana gelen gaz üretimi ve kırmızıdan sarıya pH renk değişimi, karbonhidratların fermente edildiğinin yani testin pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edilir (Tille 2015).

- Jelatinaz testi: Bir MacConkey agar kolonisi, içinde besleyici jelatin bulunan kültür plakalarına aşılandı. 14 gün içinde, enfekte tüpün 4°C'de kısmen veya tamamen sıvılaşması (kontrol tüpü tamamen katılaşmış olmalıdır) beklendi. Jelatinaz aktivitesine sahip plakalar üzerindeki kolonilerin etrafındaki şeffaf bölgelerde jelatin hidrolizi gözlemlendiğinde test pozitif olarak değerlendirldi (Tille 2015).
- Hareketlilik testi: SIM besiyeri (Sulphide Indole Motility besiyeri) kullanılarak, MacConkey agar üzerinde gelişen bir koloni inoküle edildi, 35°C–37°C'de inkübe edildi ve 7 güne kadar her gün gözlendi. Ortama yayılan dağınık, puslu büyümeler nedeniyle oluşan opak görüntü testin doğruluğunu belirtmektedir (Tille 2015).
- Ornitin dekarboksilasyon testi: Bir MacConkey agar kolonisi aseptik olarak bir ornitin dekarboksilaz sıvı besiyeri tüpüne aktarıldı. pH'ı düşürmek için mikroorganizmanın önce mevcut glikozu kullanması gerekir. Mordan sarıya geçiş bunu gösterir. Ortam asidik hale geldikten sonra ornitin dekarboksilaz tetiklenir. Son bulguları elde etmek için tüp 48 saat sonra gözlemlenir. Renk ilk 24 saat içinde mordan sarıya döner ve sonraki 24 saat içinde tekrar mora döner. Bu durum ornitin dekarboksilaz testinin başarılı olduğunu göstermektedir (Tille 2015).

3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi

Kirby-Bauer tekniği, bakteri izolatları için antibiyotik duyarlılık testi yapmak için kullanıldı:

- Bir grup büyüyen koloni, Normal tuzlu su çözeltisine aktarıldı ve 37°C'lik bir sıcaklıkta bir çalkalayıcıya yerleştirildi ve yoğunlu 1,5×108 hücre/mL olan McFarland çözeltisi ile karşılaştırıldı.
- Plakalar, steril sürüntü çizgi kültürüne daldırılarak ve steril koşullar altında plakanın her tarafına sürülerek aşılandı.
- Antimikrobiyal plakalar birbirlerinden ayrı olarak yerleştirildi ve ortamın yüzeyi ile temas edecek şekilde hafifçe bastırıldı. Bu agar plakaları, gece boyunca 37°C'de tutuldu.
- Daha sonra her bölge arasındaki mesafe milimetre cinsinden ölçüldü ve kaydedildi ve sonuçlar CLSI ile karşılaştırıldı.

3.2.6 Biyofilm oluşumu

İzolatların biyofilm dizilişinin ölçümü için mikrotiter plaka ölçüsü kullanıldı. Testler, önceden sterilize edilmiş polistiren, 96 oyuklu mikro titre plakalarında yapıldı (Stepanović *et al.* 2007). Her bir oyuk, Tripton Soy Agar (Oxoid) (yaklaşık 1,0x106 CFU/mL) üzerine 200 µL (bir gece boyunca bekletilerek iki kat zayıflatılmış) bakteri kültürü ile dolduruldu. Negatif kontrol oyuklarına 200 µL Tripton Soy Agar döküldü. Kaplandıktan sonra, 37°C'de plakalar, 24 saatlik kuvvetli bir kuluçka sürecinden geçti. Kuluçkadan sonra, her plakanın oyukları, 200 µL fosfat tamponlu tuzlu su ile üç kez temizlendi ve içerikler daha sonra tek kullanımlık bir kaba (PBS) boşaltıldı. Her yıkama döngüsünden sonra, kuyuları temizlemek için plakalara hafifçe vuruldu.

Ayrıkların (kafes, ölü ve makul hücrelerin sayılması) biyofilm düzeninin CV testi kullanılarak ölçülmesi, halihazırda tasvir edilen stratejiye dayanmaktadır. Önceden yıkanmış bağlı biyofilm, 60°C'de 15 dakika boyunca sıcak kullanılarak çöktürüldü, bu sırada 150 µL %1 CV eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Fazla renklendirme emilerek giderildi ve salınana kadar akan su ile yıkandı. Hücrelere yapışan rengin yeniden çözülmesi için ortam sıcaklığında havayla kurumaya bırakılan mikrotiter plakaların her bir oyuğuna 150 µL %95 etanol döküldü. Oda sıcaklığında en az 30 dakika hareket ettirmeden bekletildi. Son olarak, her oyuktan 125 µL boş bir plakaya aktarıldı ve optik yoğunlukları (OD), bir mikrotiter plaka okuyucusu kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Deney üç ayrı tekerrürde gerçekleştirildi ve her biri için ortalama OD ve standart sapma (SD) hesaplandı. OD değerlerine göre elde edilen sonuçlar yüzeye yapışan ve bir biyofilm oluşturan küçük organizmaların bir koleksiyonu olarak yorumlandı (Stepanović *et al.* 2000).

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının biyofilm üretimi üzerindeki etkinliği, yoğunluk okumaları aşağıdaki denklemlere göre karşılaştırılarak hesaplanmıştır:

- Kontrolün ortalama ışık yoğunluğunun, izolatın ortalama ışık yoğunluğundan (ODc≥OD) büyük veya ona eşit olması durumunda, izolatın bir biyofilm oluşturmadığı kabul edilir.

- İzolatın ortalama optik yoğunluğu kontrol ışık yoğunluğunun ortalamasından büyükse ve kontrolün ışık yoğunluğunun iki katından azsa (ODc<OD≤2xODc), izolatın biyofilm oluşumunun iki katı olduğu kabul edilir.
- İzolatın ortalama optik yoğunluğu, kontrolün ışık yoğunluğunun iki katından fazla ve kontrolün dört katına eşit veya bundan küçükse (2xODc<OD≤4xODc), izolat, biyofilmin ortalama bileşimi olarak kabul edilir.
- İzolatın ışık yoğunluğu oranı, kontrol oranının (OD>4xODc) dört katından fazlaysa, izolatın yüksek oranda biyofilm oluşturduğu kabul edilir.

3.2.7 Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA elde etmek için özel presto ™ Mini g DNA bakteri kiti kullanıldı. ABIO saf özütleme metodolojisini takiben, bakteriyel büyümeden genomik DNA özümlendi ve DNA konsantrasyonu aşağıdaki şekilde belirlendi:

- Pelet hücreleri elde etmek için 1 mL gecelik kültürü 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Tüm hücrepeleti 200 µL Buffer CL içinde yeniden damıtıldı.
- Protein sindirimi ve hücre parçalanması için 200 µL Buffer CL, hücre peleti ve 20 µL Proteinaz K solüsyonu (20 miligram/mililitre) karıştırıldı. Tüp daha sonra 30 dakika boyunca 56°C'ye ve ardından daha fazla parçalanma için 70°C'ye ısıtılmadan önce bir vorteks ile şiddetli bir şekilde çalkalandı.
- Numune inkübe edildikten sonra 200 µL Buffer BL eklendi ve tüp kuvvetlice vortekslendi. Bunu 70°C'de 30 dakikalık inkübasyon süresi izledi.
- Numuneye 200 µL mutlak etanol eklendi ve puls-vorteks makinesi kullanılarak iyice karıştırıldı.
- Her karışım dikkatli bir şekilde mini kolona aktarıldı, 6,000 xg'nin üzerinde (8,000 rpm'den fazla) bir dakika santrifüjlendi ve ardından yeni bir toplama tüpü kullanıldı.
- Mini kolona 600 µL BW tamponu eklendikten sonra 6,000 xg'nin üzerinde (8,000 rpm'den fazla) bir dakika süreyle santrifüj etmek için yeni bir toplama tüpü kullanıldı.

- Tampon, TW 700 µL uygulamak için kullanıldı. 6,000 xg veya daha yüksek (8,000 rpm'den büyük) hızda 1 dakika santrifüjlendi. Geçiş atıldı ve mini kolon, toplama tüpüne yeniden yerleştirildi.
- Mini kolon en yüksek hızda (>13,000 xg) 1 dakika süreyle santrifüj edilerek kalan yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Daha sonra, mini kolonu içermek için yeni bir 1,5 mL'lik tüp kullanıldı.
- 100 µL Buffer AE eklendikten sonra karışım 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

3.2.7.1 DNA kantitasyonu

Numunelerin gelecekte kullanıma uygun olup olmadığını belirlemek için, ekstrakte edilen DNA miktarı bir Quantus Fluorometer kullanılarak ölçüldü. 200 litre seyreltilmiş Quantifluor Dye, 1 litre DNA ile birleştirildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra DNA konsantrasyon ölçümleri yapıldı.

3.2.7.2 Primer hazırlama

Bu primerler, Macrogen Company tarafından liyofilize formda sağlandı. Liyofilize primerler, bir stok solüsyonu oluşturmak için nükleaz içermeyen su içinde 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyona kadar çözündürüldü. 10 mL primer stok solüsyonu (-20°C'de dondurucuda bekletildi) 90 mL nükleaz içermeyen su ile birleştirilerek bu primerlerden 10 pmol/µL içeren pratik bir primer solüsyonu oluşturuldu (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Primer hazırlama konsantrasyonları

Primer Adı	Hacim (µL)	Konsantrasyon (pmol/µL)
pslA-F	300	100
pslA-R	300	100
PslD-F	300	100
pslDR-R	300	100
PA-SSF	300	100
PA-SSR	300	100

3.2.8 PCR programı

Reaksiyon karışımı, aşağıdaki şekilde ve üreticinin talimatlarına uygun olarak hazırlandı:

Polimeraz zincir reaksiyonu karışımını (PCR) tüplerinde kit ve polimeraz zincir reaksiyonunun bileşen parçaları ile Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi diğer reaksiyon karışımının bileşen parçalarını ekleyerek hazırlandı. Tüpler daha sonra kapatıldı ve 5 saniye karıştırıldı. Daha sonra tüpler, polimeraz zincir reaksiyonu için bir ısı döngüleyiciye taşındı, böylece DNA amplifikasyon prosedürü, döngüler için en uygun termal koşullarda gerçekleştirildi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için bileşenler, boyutlar ve karışımlar

Ana karışım bileşenleri	**Stok**	**Birim**	**Karışım**	**Birim**	**Hacim**
					1 Örnek
Ana karışım	2	X	1	X	10
İleri primer	10	µM	0,5	µM	1
Ters primer	10	µM	0,5	µM	1
Saf su					6
DNA		ng/µL		ng/µL	2
Toplam hacim					20
Tek rxn başına kısım	Tüp başına 18 µL Master karışımı ve 2 µL Template ekleyin				

Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için optimum koşullar

Adımlar	**Sıcaklık (ºC)**		**Süre**	**Döngü**
İlk Denatürasyon	95		05:00	1
Denatürasyon	95		00:30	30
Tavlama	**Primer**	**°C**	00:30	
	pslA	55		
	PSID	52		
	PA-SS	56		
Eklenti	72		00:30	
Son uzatma	72		07:00	1
Tutmak	10		10:00	

3.2.8.1 *Pseudomonas aeruginosa* genlerinin PCR kullanılarak saptanması

PCR karışımı, 10 µL ana karışımdan oluşur; ekstrakte ettiğimiz izolatların DNA'sından 2 µL, 1 µL Primer-F, 1 µL Primer-R ve 6 µL Deiyonize Steril Distile Su. PCR içerikleri daha sonra Vortekste ve daha sonra Mikro Santrifüjde karıştırıldı ve bir saat boyunca PCR makinesine kondu (Çizelge 3.9 (Çizelge 3.10) (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.9 *Pseudomonas aeruginosa*'da pslA geninin saptanması için PCR optimum koşulları

Adım	**Program**	
1	Mutant öncesi DNA şablonu için 95°C'de yalnızca 5 dakikalık bir döngü	
2	**30 döngü dahil:**	
	A	Şablon DNA'yı denatüre etmek için 95°C'de 30 saniye
	B	Primerlerin şablon DNA'ya bağlanması için 55°C sıcaklıkta 30 saniye
	C	Bağlı primerlerin uzaması için 72°C'de 45 saniye
3	DNA sarmalının son uzaması için 72°C'de yalnızca bir 5 dakikalık döngü	

Gen duplikasyon ürününden 5 µL hazırlanan %2 agaroz jel üzerinde 100 V'ta 45 dakika elektroforez cihazına aktarılır.

Çizelge 3.10 *Pseudomonas aeruginosa*'da PslD geninin saptanması için PCR optimum koşulları

Adım	**Program**	
1	Mutant öncesi DNA şablonu için 95°C'de yalnızca 5 dakikalık bir döngü	
2	**30 döngü dahil:**	
	A	Şablon DNA'yı denatüre etmek için 95°C'de 30 saniye
	B	Primerlerin şablon DNA'ya bağlanması için 55°C sıcaklıkta 30 saniye
	C	Bağlı primerlerin uzaması için 72°C'de 45 saniye
3	DNA sarmalının son uzaması için 72°C'de yalnızca bir 5 dakikalık döngü	

Gen duplikasyon ürününden 5 µL hazırlanan %2 agaroz jel üzerinde 100 V'ta 45 dakika elektroforez cihazına aktarılır.

Çizelge 3.11 *Pseudomonas aeruginosa*'da PA-SS geninin saptanması için PCR optimum koşulları

Adım	**Program**	
1	Mutant öncesi DNA şablonu için 95°C'de yalnızca 5 dakikalık bir döngü	
2	**30 döngü dahil:**	
	A	Şablon DNA'yı denatüre etmek için 95°C'de 30 saniye
	B	Primerlerin şablon DNA'ya bağlanması için 55°C sıcaklıkta 30 saniye
	C	Bağlı primerlerin uzaması için 72°C'de 45 saniye
3	DNA sarmalının son uzaması için 72°C'de yalnızca bir 5 dakikalık döngü	

Gen duplikasyon ürününden 5 µL hazırlanan %2 agaroz jel üzerinde 100 V'ta 45 dakika elektroforez cihazına aktarıyoruz.

3.2.9 Agaroz jel elektroforezi

PCR amplifikasyonunu takiben amplifikasyonu saptamak için agaroz jel elektroforezi kullanılır. PCR prosedürü için, sadece geri kazanılan DNA için belirlenen standartlar kullanıldı.

Çözücüler

DNA merdiven işaretleyici, yükleme boyası, $C_{21}H_20BrN_3$ (etidyum bromür) (10 mg/mL) ve 1X TAE tamponu.

Agaroz jelin hazırlanması

- 100 mL 1X TAE
- 1,5 gm (%1,5 agaroz içeriği için) tampona eklendi.
- Tüm jel partiküllerini çözmek için solüsyon bir mikrodalga kullanılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
- Agaroza 1 µL C21H20BrN3 (etidyum bromür) (10 mg/mL) eklendi. Agaroz, birleştirmek ve kabarcıkları önlemek için karıştırıldı.
- Çözeltinin 50–60°C'de soğumaya bırakıldı.

Yatay agaroz jelin dökümü

Agaroz çözeltisi ilave edildi, jel tepsisinin kenarları selofan ile bantlandı ve agarozun donması için oda sıcaklığında 30 dakika beklendi. Jel, taraktan uygun şekilde çekildi ve jel tepsisine kondu. Tepsideki jelin yüzeyi 3-5 mm 1X TAE-elektroforez tamponu ile kaplandı.

DNA yükleme

PCR ürünü, 5 µL 'lik bir hacimde kuyuya doğrudan ilave edildi. 100 v/mAmp ile 60 dakika elektrik verildi. DNA katottan pozitif anot kutuplarına doğru hareket eder. Ethidium bromide ile boyanmış jel bantları jel görüntüleme ekipmanı kullanılarak görüldü.

3.2.10 Gen ifadesi çalışması

Gen ifadesi çalışması dört farklı şekilde yapılmıştır.

3.2.10.1 RNA ekstraksiyonu

- 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne (RNaz içermeyen) 1x109'a kadar bakteri hücresi konuldu.
- 16,000 rpm'de 2 dakikalık santrifüjlemeden sonra süpernatantı tamamen çıkarıldı.
- 10 mg lizozim tozunu tartıldı ve yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne (RNaz içermeyen) aktarıldı.
- 10 mg lizozim içeren mikrosantrifüj tüpü 1 mL bakteri lizis tamponu ile dolduruldu.
- Tüm lizozim tozu eriyene kadar tüp vorteksle karıştırıldı.
- Bakteri hücresi peletine 100 µL lizozim içeren bakteri lizis tamponu eklendi.
- Canlandırmak için hücre peletini pipetlendi veya vortekslendi.
- Numune oda sıcaklığında beş dakika bekletildi.

- 700 µL GENEzol^{TM} reaktifi eklendi, bir pipetle karıştırldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3.2.10.2 RNA bağlama

Pseudomonas aeurginosa izolatının RNA'sı, GENEzol^{TM} Reagent yöntemi kullanılarak aşağıdaki şekilde ekstrakte edildi:

1,5 mL hücre kültürü 16,000 rpm hızında bir dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Pelete daha sonra süpernatant çıkarıldıktan sonra 700 µL GENEzol^{TM} reaktifi eklendi. Lizat, yukarı ve aşağı pipetleme hareketleri tekrarlanarak homojenleştirildi. 15 dakika boyunca bir vorteksle karıştırıldı. Ardından 30 saniye santrifüjlendi. GENEzol^{TM} reaktifi daha sonra hemen 1 hacim numune kombinasyonu ve 1 hacim mutlak etanol (1:1) ile seyreltildi. Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra RB kolonunu 2 mL'lik toplama tüpüne konuldu.

Numune kombinasyonu, 700 µL'lik bir hacimde RB Kolonuna eklendi. 16,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve akışı atıldı. Ardından RB kolonunu 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

3.2.10.3 RNA yıkama

- 400 mL ön yıkama tamponunu yavaşça RB kolonuna dökülerek 16,000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi.
- Akışı atıldı ve RB kolonunu 2 mL toplama tüpü içinde yeniden yerleştirildi.
- RB kolonuna 600 µL yıkama tamponu eklemeden önce etanol içinde dikkatlice karıştırıldı.
- 16,000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi, ardından akışı atın. RB kolonu, 2 mL toplama tüpünde bir kez daha yerleştirildi.
- RB kolonuna 600 µL yıkama tamponu eklemeden önce etanol ile dikkatlice karıştırıldı.
- 16,000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi ve ardından akışı atıldı.

- 2 mL toplama tüpünü RB kolonunda yeniden konumlandırıldı ve RB kolonu 600 µL yıkama tamponu ile bir kez daha yıkandı.
- Son olarak sütun matrisini kurutmak için, 16,000 rpm'de 3 dakika santrifüjleme yapıldı.

3.2.10.4 RNA elüsyonu

- Temiz bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü (RNaz içermeyen) içine kuru bir RB Kolonu yerleştirildi.
- 25 ila 50 µL RNaz içermeyen su, matrisin kolonun ortasına döküldü.
- Matrisin tamamını emdiğinden emin olmak için RNaz İçermeyen Suyu en az 3 dakika dinlendirildi.
- Saf RNA'yı ayrıştırmak için, 16,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

3.2.11 Antibiyotik konsantrasyonları

PslD geninin gen ekspresyonu çalışmasında, antibiyotik Sefotaksim üç farklı konsantrasyonda (2, 4 ve 8 µL) kullanıldı.

3.2.12 cDNA protokolü

RNA'nın Bioneer protokolüne göre cDNA'ya dönüştürülmesi:

OLIGO DT PRIMER ve RNA şablonları RT Master Mix tüpüne eklendi ana karışımı içeren, reaksiyon karışımının bileşenleri Çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Daha sonra eksispin ile karıştırıp tüp PCR cihazına konuldu (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12 cDNA amplifikasyon için PCR reaksiyon karışımının içeriği

Reaksiyon Karışımının İçeriği	**Hacim (µL)**
Nükleazsız su	17
Primer (Rastgele Oligo Heksamer)	2
Ana karışım	liyofilize
RNA	1
Toplam	20

Çizelge 3.13 PslD geni için cDNA programı

Adım	**Sıcaklık**	**Süre**
Tavlama	37°C	5 dakika
Uzama	42°C	1 saat
Devre dışı bırakma	95°C	5 dakika

3.2.13 qPCR protokolü

Bioneer protokolüne göre AccuPower ® RocketScript™ RT PreMIX karışımı:

- İleri ve geri PslD primerleri, her biri 1 µL ile birleştirilmelidir.
- Siber yeşil içeren qPCR plakasına 5 µL cDNA eklenir.
- Exispin ile karıştırılır ve ardından Çizelge 3.14'te gösterildiği gibi qPCR cihazına konulur.

Çizelge 3.14 qPCR programı

Adım	**Sıcaklık**	**ZAMAN**
Tutmak	95°C	5 dakika
Denatürasyon	95°C	5 saniye
Uzatma ve tavlama	55°C	5 saniye

Aşağıdaki denklemlerde gösterildiği gibi gen ekspresyon seviyesindeki değişikliği hesaplandı:

- Katlama=$2^{-\Delta\Delta CT}$

- ΔΔCT=ΔCT İşlenmiş-ΔCT Kontrolü
- ΔCT=CT geni-CT House Keeping geni (16SrRNA)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu ve Teşhisi

Çalışmada, yanık, yara, idrar yolu enfeksiyonu ve otitis media dahil olmak üzere çeşitli klinik kaynaklardan 100 örnek toplandı.

Her iki cinsiyetten ve farklı yaşlardan alınan örnekler Mayıs-Eylül 2022 tarihleri arasında, Bağdat Eğitim Hastanesi ve Şehit Gazi Hariri Hastanesinden alınmıştır. Kesin teşhisin ardından *Pseudomonas aeruginosa'*ya ait 19 izolat tespit edildi.

Mikroskobik tanı konuldu ve Gram boyama ile incelemeler yapıldı. Tüm ayrılıklar gram negatif olarak ortaya çıktı ve tüm ayrılıkların kolonilerinin kültürel özelliklerinde belirtildiği gibi, 2-aminoasetofenon adı verilen bir bileşik tarafından üzüm gibi koktuğu karakteristik bir kokuya sahip koloniler izlendi (Sastry and Bhat 2018).

Setrimid agar üzerinde yetiştirilen bakterilerin teşhisini koymak için fenotipik özellikler kullanıldı, tüm sınırların bu ortamda geliştiği ve çeşitli tonlar yarattığı ortaya çıktı; 10 (% 66) piyosiyanin mavi-yeşil; 3 (% 22) sarı-yeşil; 4'ü (% 8) pyorubin kırmızı-kahverengi ve son 2'si (% 4) pigmentsiz koloniler olarak ortaya çıktı (Sudhakar *et al.* 2015). Izolatlar MacConkey agarında laktoz fermente edilmemiş ve solgun görünüyordu (Baron *et al.* 2007).

Biyokimyasal testlerle ilgili olarak, oksidazda tüm izolatlar pozitifti, bu da bakterilerin sitokrom oksidaz enzimi içerdiğini ve hidrojen peroksiti oksijene ve suya ayıran katalaz testlerinin pozitif olduğunu, sitrat testi için pozitif olduğunu, TSI testinde fermentör olmadığını, Motilite testinde tüm sınırların hareketli ve motilite indol ornitin ortamında (MIO) ornitin dekarboksilasyonu için negatif ve jelatinaz etkisinin pozitif olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *P. aeruginosa'*nın biyokimyasal reaksiyonları

Test	**Sonuç**
Oksidaz	Pozitif
Katalaz	Pozitif
Sitrat kullanım testi	Pozitif
Üçlü şeker-demir testi (TSI)	K/K (Alkali/Alkali)
Jelatinaz testi	Pozitif
Hareketlilik testi	Pozitif
Ornitin dekarboksilasyon testi	Negatif

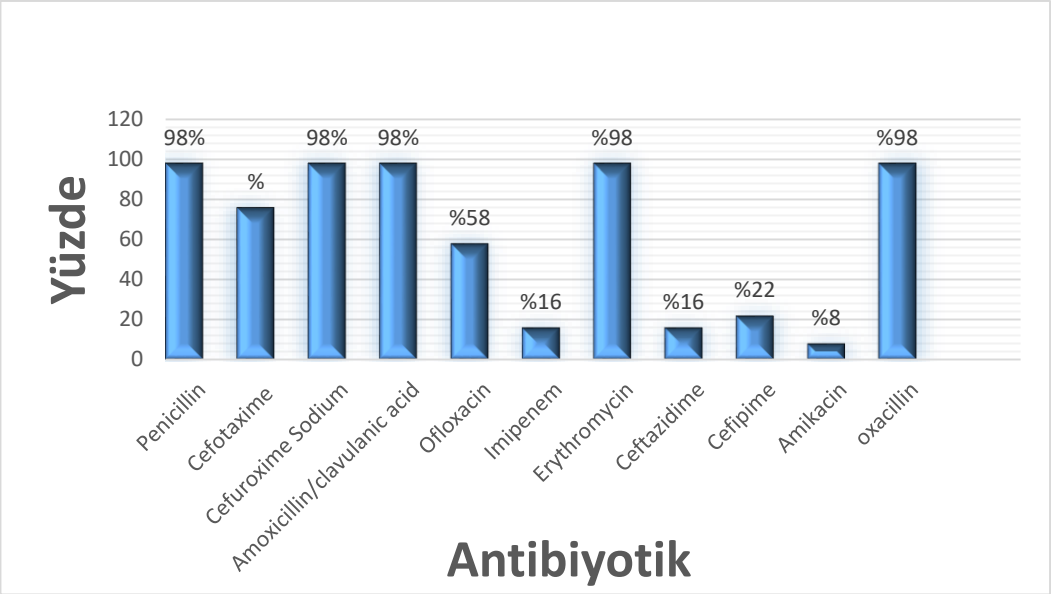
4.2 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Çalışmamızda, tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testi kullanılarak test edilen 11 ilaca (penisilin, oksasilin, eritromisin, sefuroksim sodyum ve amoksisilin/klavulanik) karşı dirençli olduğu göstermiştir.

Pseudomonas aeruginosa; Penisilin (%98), Sefuroksim (%98), Amoksisilin (%98), Oksasilin (%98), Eritromisin (%98), Sefotaksim (%76) ve Ofloksasine (%58) dirençli olarak tespit edilmiştir. Sefepim (%22), seftazidim (%16) ve imipenem (%16) için genel bir direnç olmuştur. Amikasin segregatların (%8) hassas olduğu tüm sınırlara karşı en yüksek güç olarak görünürken (Çizelge 4.2) (Şekil 4.1), MDR, Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi 19 izolatta (%100) belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 *P. aeruginosa'*nın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranı

Antibiyotik adı	**Direnç oranı (%)**
Penisilin	98
Sefotaksim	76
Sefuroksim sodyum	98
Amoksisilin/klavulanik asit	98
Ofloksasin	58
İmipenem	16
Eritromisin	98
Seftazidim	16
Sefipim	22
Amikasin	8
Oksasilin	98



Şekil 4.1 *P. aeruginosa* izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara karşı direnç yüzdesi

Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* izolatlarının farklı antimikrobiyal ajanlara direnç durumu

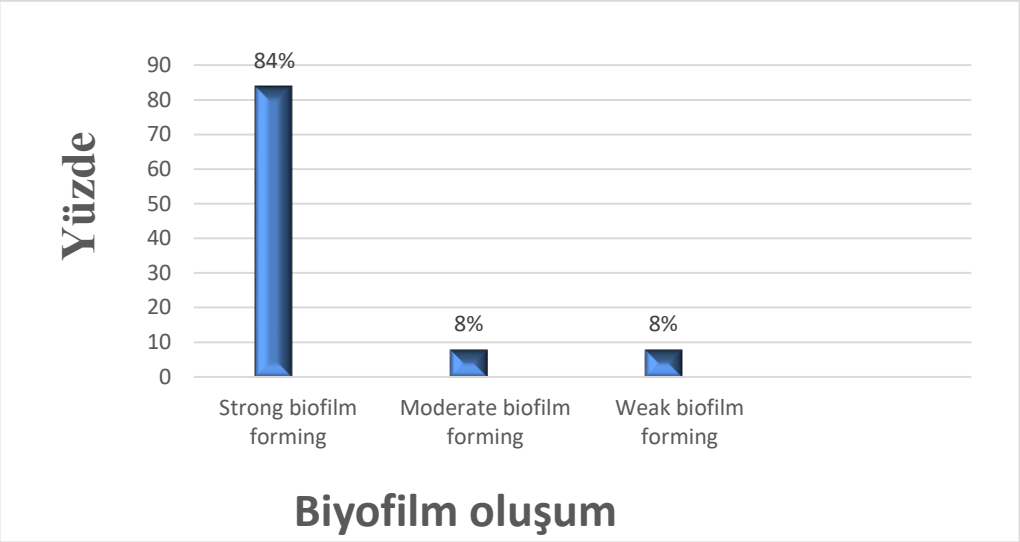
	Dirençli		**Duyarlı**	
Antibiyotik	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
Penisilin	19	100	-	-
Sefotaksim	13	71	6	29
Sefuroksim sodyum	19	100	-	-
Amoksisilin/klavulanik asit	19	100	-	-
Ofloksasin	11	55	8	45
İmipenem	2	10	17	90
Eritromisin	19	100	-	-
Seftazidim	2	10	17	90
Sefipim	4	20	15	80
Amikasin	1	5	18	95
Oksasilin	19	100	-	-

4.3 CV Tahlili ile Biyofilm Ölçümü

Pseudomonas aeruginosa sınırlarının biyofilm şekillendirme kapasitesi, CV stratejisi kullanılarak değerlendirildi. İzolatların biyofilmi, OD değerlerine uygun olarak güçsüz, orta ve katı biyofilm oluşturucular olarak sınıflandırıldı. Tüm izolatlar, değişen oranlarda %100 biyofilm üretiyordu; Güçlü biyofilm üreticileri 15 izolattan (%84); Orta derecede biyofilm üreticileri 2 izolattan (%8); ve zayıf biyofilm üreticileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 2 izolattan (%8) oluşturuyordu.

Çizelge 4.4 CV tahlili kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşum derecesi

Biyofilm oluşturma	İzolat sayısı	Oluşum derecesi (%)
Güçlü Biyofilm oluşumu	15	84
Orta derecede Biyofilm oluşumu	2	8
Zayıf Biyofilm oluşumu	2	8
Toplam	19	100



Şekil 4.2 CV testi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşum derecesi

4.4 DNA Ekstraksiyonu

Promega, ABD DNA kiti kullanılarak bakteri izolatlarının DNA'sı ekstrakte edilmiştir.

4.5 DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

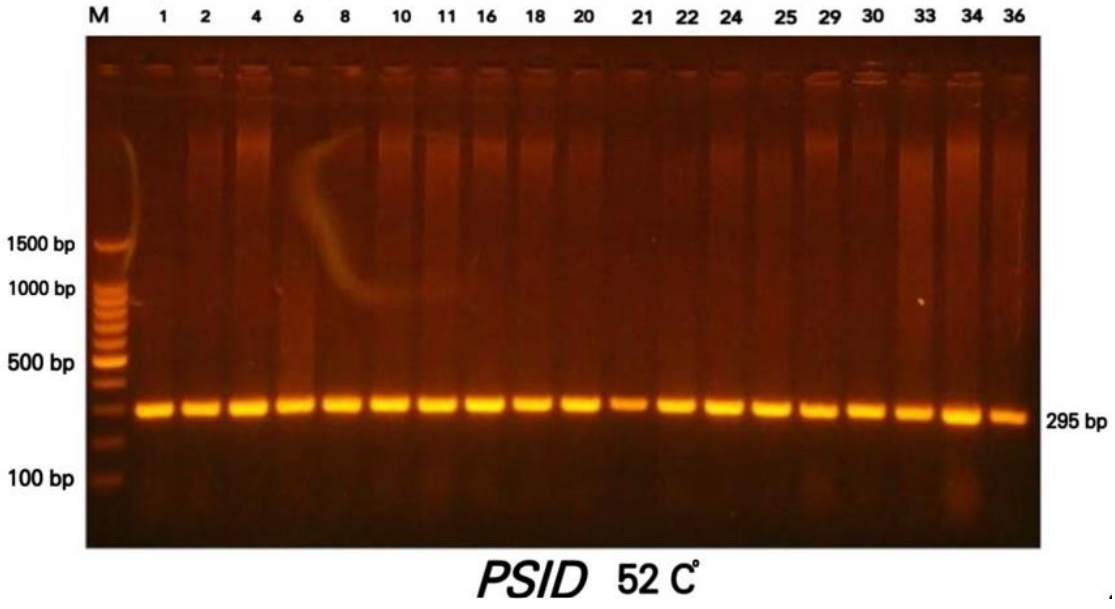
DNA ekstraksiyonundan sonra DNA konsantrasyonları, Quantus Fluorometer kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar, ekstrakte edilen DNA konsantrasyonlarının 20-25 ng/µL arasında değiştiğini göstermiştir.

4.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kullanılarak Biyofilm Genlerinin Tespiti

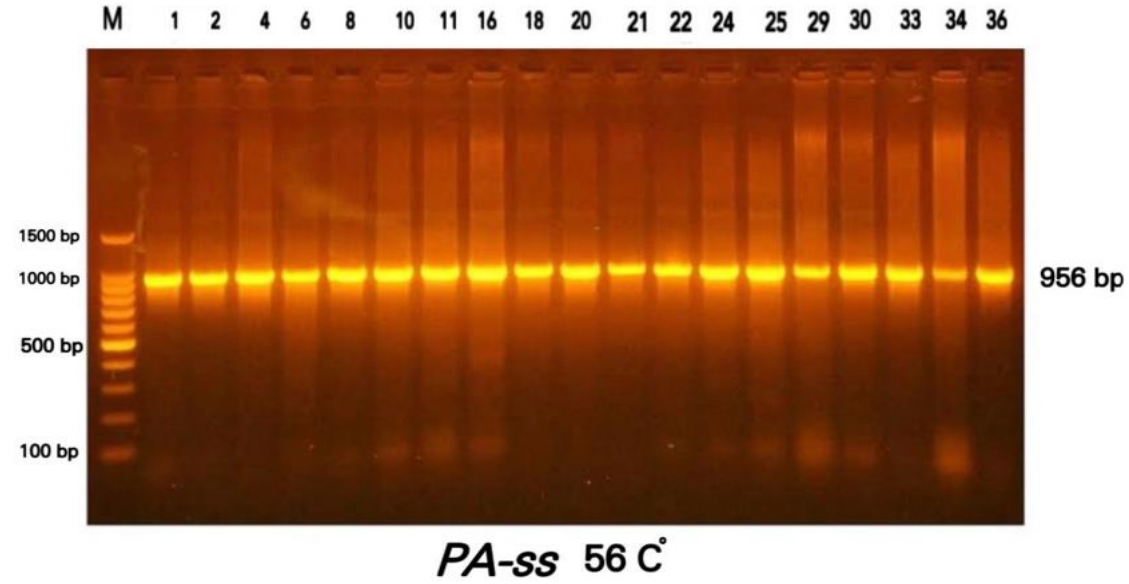
Pseudomonas aeruginosa türlerindeki biyofilm genlerinin tespiti, Thermal Cycler kullanılarak PCR ile yapılmıştır. PCR, Biyofilm genlerinin spesifik primerlerle amplifikasyonuna dayanır. *Pseudomonas aeruginosa* için, bu genleri tespit etmek amacıyla özel primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu genler; pslA, PslD, PA-SS içerir. Elde edilen sonuçlar, *P. aeruginosa* izolatlarının bu genlerin %100'üne sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın sahip olduğu biyofilm genlerinin sayısı ve yüzdesi

Kaynaklar	Genler	Gene sahip izolat sayısı	Gen varlığının yüzdesi (%)
Çeşitli klinik örnekler	PSIA	19	100%
	PSID	19	100%
	PA-SS	19	100%



Şekil 4.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın psLD geninin amplifikasyon sonuçları (295bp)



Şekil 4.4 *Pseudomonas aeruginosa*'nın PA-SS geninin amplifikasyon sonuçları (956bp)

4.7 RNA Ekstraksiyonu

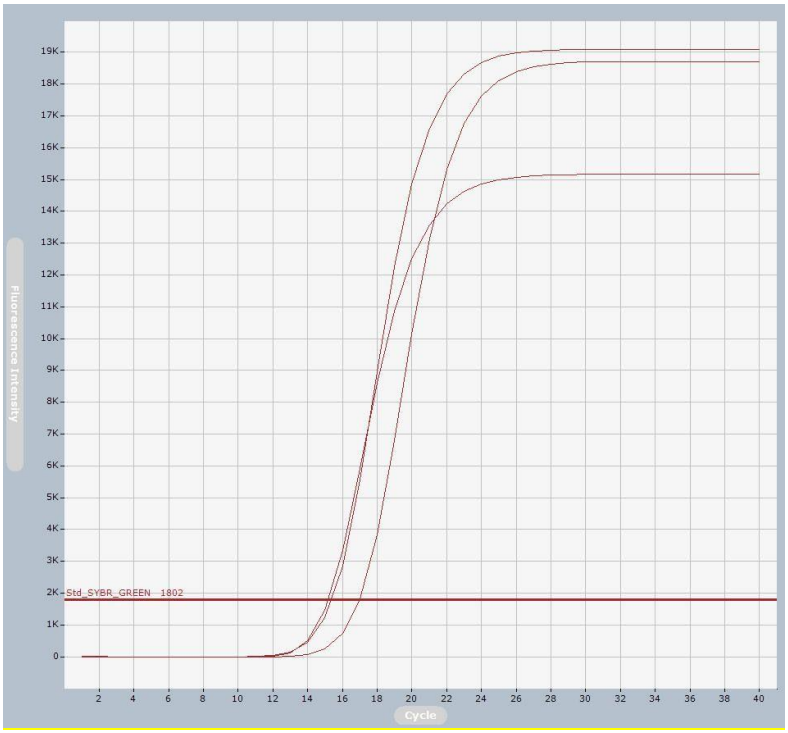
Bakteri izolatlarının RNA'sı, GENEzolTM TriRNA Pure kiti kullanılarak ekstre edildi.

4.8 Gen İfade Çalışması

Bu çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa'*nın bir bakteriyel izolatı ve biyofilm geni psID, qPCR tekniği ile Sefotaksim antibiyotiğinin 2, 4 ve 8 µL konsantrasyonu kullanılarak çalışılmıştır. psID geninin gen ekspresyon seviyelerinin hesaplanması, cDNA'ya dönüştürüldükten sonraki RNA konsantrasyonuna bağlıdır. Elde edilen sonuçlar, Sefotaksim antibiyotiğinin 2 µL konsantrasyonu için biyofilm gen psID'sine Gen ifadesinin 19,32 olduğunu, 8 µL konsantrasyonu için ise 22,56 olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.6 psID geninin qPCR analiz verileri

Sefotaksim	**psID Ct**
28 µL	19,32
8 8 µL	22,56



Şekil 4.5 Sefotaksim antibiyotiğinin 2, 4 ve 8 µL konsantrasyonları ile psID gen ekspresyonunun eğrisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaygın hasar potansiyeli nedeniyle, *P. aeruginosa* en önemli Pseudomonas türüdür. Yoğun bakım ünitesinde görülen önemli bir enfeksiyon kaynağı, fırsatçı bir patojendir (Patil *et al.* 2015). Araştırmalara göre bakteriyemi (%50), VAP (%30) ve *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlu bakteriyeminin tümü diğer enfeksiyonlardan (%20) daha yüksek küresel ölüm oranlarına sahiptir (Ceniceros *et al.* 2016)

Elde edilen sonuçlar (Şekil 4.1) (Çizelge 4.2) *Pseudomonas aeruginosa*'nın birçok farklı antibiyotiğe dirençli olduğunu göstermiştir, Seftazidime direnci, Shariati *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına benzer orandadır (%16). Çalışmamızda Amikasin direnci %8 iken, Roulová *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada %11,7 olarak tespit edilmiştir. Amoksilin direnci %98'dir ve bu oran Al-Shwaikh (2006) çalışması ile benzerlik göstermiştir. Imipenem direnci %16 olup, Idrees (2012) tarafından elde edilen %23,5 oranına yakındır. Çalışmamızda Ofloksasin direnci %58 olup bu durum Hassuna *et al.* (2015) tarafından tespit edilen sonuç ile uyumludur. Asghar and Ahmed (2018) yapmış oldukları çalışmada, Suudi Arabistan'dan *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının Imipenem'e direnç oranının %35,4, Siprofloksasin ve Amikasin'in her biri için %43, Cefepime'e %38,5 ve Ceftazidime %43 olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmanın sonuçları elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu değildir.

Çalışmamızda tüm izolatlarda CV testi kullanılarak biyofilm oluşumları tespit edilmiştir (Çizelge 4.4) (Şekil 4.2). Elde ettiğimiz sonuçlar biyofilm oluşum oranının %98,4 olduğunu belirten Roulová *et al.* (2022) ve biyofilm oluşum oranını %96 olarak bulan Banar *et al.* (2016)'nin çalışması ile uyumluluk göstermiştir. Namuq *et al.* (2019), farklı klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının yüzde 98'inin biyofilm oluşturduğunu tespit etmiştir. Abootaleb *et al.* (2020) İran'da *P. aeruginosa* izolatlarının %24'ünün biyofilm oluşturduğunu belirtmiştir. Bu sonuç elde ettiğimiz sonuçlar ile çelişmektedir. Mısır'da Elmaraghy *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, farklı klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa'*nın %27,7'sinin güçlü biyofilm oluşturduğunu, %21,3'ünün orta derecede biyofilm oluşturduğunu ve %51,1'inin zayıf veya biyofilmsiz olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının (19/19) biyofilm bileşeni psIA geni için %100 pozitif olarak tespit edilmiştir. Daha önce yapılan birçok çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir (Heydari and Eftekhar 2015, Abootaleb *et al.* 2020). Issa *et al.* (2018), *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %90'ının (35/39) pslA genine sahip olduğunu, Motevasel and Haghkhah (2018) ise bakteriyel izolatların %92,1 oranında pslA'ya sahip olduğunu belirtmiştir. Kore'de Cho *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, farklı klinik örneklerden izole edilen bakteri izolatlarının %93,4 oranında pslA'ya sahip olduğu tespit edilmiştir. Mısır'da ise Elmaraghy *et al.* (2019) farklı klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %89,4'ünde pslA varlığı saptanmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçları *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında pslA'nın varlığının biyofilm oluşumu için iyi bir belirteç olduğu ifade etmektedir.

Çalışmamızdaki tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının (19/19) biyofilm bileşeni psID geni için %100 pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, Kamali *et al.* (2020) tarafından yapılan ve biyofilm oluşturan *Pseudomonas aeruginosa*'nın %87,5'inin psID genine sahip olduğunu gösteren çalışmanın sonuçları ile farklılık göstermektedir. Diğer taraftan yapılan farklı bir çalışmada, PASS-F ve PASS-R primerleri için 48 *Pseudomonas aeruginosa* izolatının 40'ında %83,34 oranında biyofilm bileşeni tespit edilirken bu oran bizim çalışmamızda *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının tamamında biyofilm bileşeni olan PA-SS geni için %100 olarak tespit edilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa tarafından biyofilm oluşumu, konağın fagositik hücresinden kendini koruma sağladığı ve bu hücreye antibiyotik erişimini ve enfeksiyonun kalıcılığını engellediği ve aynı zamanda nozokomiyal enfeksiyona neden olmadaki rolü nedeniyle önemli bir virülans faktörüdür.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, farklı klinik kaynaklardan izole edilen tüm *P. aeruginosa* izolatları, Penisilin, Sefuroksim Sodyum, Amoksisilin/klavulanik asit, Eritromisin ve Oksasilin için %98'lik bir yüzde ile yüksek direnç göstermiştir. En düşük direnç %8 ile Amikasin antibiyotiğinde belirlenmiştir. Ayrıca tüm *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %100 biyofilm oluşturma yeteneğine ve PslA, PslD, PA-SS biyofilm genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, PslD geninin

Sefotaksim 2 µL konsantrasyonunda gen ekspresyonu 19,32 ve 8 µL konsantrasyonunda ise 22,56 olarak bulunmuştur.

Bu bilgiler doğrultusunda, biyofilm genleri ve antibiyotik direnci ile ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması, rastgele antibiyotik kullanımının azaltılması, biyofilm oluşumunun diğer Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerinde incelenmesi ve gerçek zamanlı PCR ile biyofilm genlerinin gen ekspresyonunun incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulhaq, N., Nawaz, Z., Zahoor, M. A., & Siddique, A. B. 2020. Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. EXCLI Journal, 19: 201.

Abootaleb, M., Zolfaghari, M. R., Arbab Soleimani, N., Ghorbanmehr, N., & Yazdian, M. R. 2020. Biofilm formation with microtiter plate 96 and pslA detection of Pseudomonas aeruginosa isolates from clinical samples in Iran. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 8: 58-66.

Adam, B., Baillie, G. S., & Douglas, L. J. 2002. Mixed species biofilms of Candida albicans and Staphylococcus epidermidis. Journal of Medical Microbiology, 51(4): 344-349.

Algammal, A. M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F. M., Atwa, M. H., El-Kholy, A. W., & Hozzein, W. N. 2020. Emerging MDR-Pseudomonas aeruginosa in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. Scientific Reports, 10(1): 1-12.

Al-Shwaikh, R. M. 2006. Production and characterization of protease from Pseudomonas aeruginosa isolated from some clinical cases and its relation with some antibiotic agents. PhD. Thesis, Al-Mustansiryia University, 167 page, Baghdad.

Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., & Gamian, A. 2017. Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa–the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. Advances in Hygiene and Experimental Medicine, 71: 78-91.

Asghar, A. H., & Ahmed, O. B. 2018. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from a tertiary care hospital in Makkah, KSA. Clinical Practice, 15(2): 541-547.

Atkinson, H., Wallis, S., & Coatesworth, A. P. 2015. Acute otitis media. Postgraduate Medicine, 127(4): 386-390.

Azzopardi, E. A., Azzopardi, E., Camilleri, L., Villapalos, J., Boyce, D. E., Dziewulski, P., & Whitaker, I. S. 2014. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients-systematic review and metanalysis. PloS One, 9(4): e95042.

Banar, M., Emaneini, M., Satarzadeh, M., Abdellahi, N., Beigverdi, R., Leeuwen, W. B. V., & 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.

Baron, E. J., Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. 2007. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. Mosby Company, 958 page, Missouri.

Bel Hadj Ahmed, A., Salah Abbassi, M., Rojo-Bezares, B., Ruiz-Roldán, L., Dhahri, R., Mehri, I., & Hassen, A. 2020. Characterization of Pseudomonas aeruginosa isolated from various environmental niches: New STs and occurrence of antibiotic susceptible "high-risk clones". International Journal of Environmental Health Research, 30(6): 643-652.

Bhasin, S., Shukla, A. N., & Shrivastava, S. 2015. Observation on Pseudomonas aeruginosa in Kshipra river with relation to anthropogenic activities. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(4): 672-684.

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

Blanc, D. S., Francioli, P., & Zanetti, G. 2007. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in the intensive care units–a review. The Open Microbiology Journal, 1: 8.

Brown, A., & Smith, H. 2014. Benson's microbiological applications, laboratory manual in general microbiology, short version. McGraw-Hill Education, 438 page, New York.

Bryers, J. D. 2018. Modeling biofilm accumulation. Physiological Models in Microbiology, 109-144.

Bush, K., & Page, M. G. 2017. What we may expect from novel antibacterial agents in the pipeline with respect to resistance and pharmacodynamic principles. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, 44(2): 113-132.

Caiazza, N. C., & O'Toole, G. A. 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa PA14. Journal of Bacteriology, 186(14).

Caiazza, N. C., Shanks, R. M., & O'toole, G. A. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology, 187(21): 7351-7361.

Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. 2015. Jawetz Melnick and Adelbergs medical microbiology 27 E. McGraw-Hill Education, 880 page, New York.

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., & Hopkins, S. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. The Lancet Infectious Diseases, 19(1): 56-66.

Ceniceros, A., Pértega, S., Galeiras, R., Mourelo, M., López, E., Broullón, J., & Freire, D. 2016. Predicting mortality in burn patients with bacteraemia. Infection, 44: 215-222.

Chambers, J. R., Cherny, K. E., & Sauer, K. 2017. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(12): e00846-17.

Cho, H. H., Kwon, K. C., Kim, S., Park, Y., & Koo, S. H. 2018. Association between biofilm formation and antimicrobial resistance in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Annals of Clinical & Laboratory Science, 48(3): 363-368.

Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. 2016. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. Frontiers in Microbiology, 7: 1641.

Creanga, D., Poiata, A., Fifere, N., Airinei, A., & Nadejde, C. 2011. Fluorescence of pyoverdine synthesized by Pseudomonas under the effect of iron oxide nanoparticles. Romanian Biotechnological Letters, 16(4): 6337.

Crespo, A., Blanco-Cabra, N., & Torrents, E. 2018. Aerobic vitamin B12 biosynthesis is essential for Pseudomonas aeruginosa class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth. Frontiers in Microbiology, 986.

Crivaro, V., Di Popolo, A., Caprio, A., Lambiase, A., Di Resta, M., Borriello, T., & Zarrilli, R. 2009. Pseudomonas aeruginosa in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. BMC Infectious Diseases, 9: 1-7.

Davey, M. E., & O'toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4): 847-867.

Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. 2010. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endodontic Topics, 22(1): 2-16.

Elmaraghy, N., Abbadi, S., Elhadidi, G., Hashem, A., & Yousef, A. 2019. Virulence genes in Pseudomonas aeruginosa strains isolated at Suez Canal University Hospitals with respect to the site of infection and antimicrobial resistance. International Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology, 2(1): 008-019.

El-Shouny, W. A., Al-Baidani, A. R. H., & Hamza, W. T. 2011. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by Pseudomonas aeruginosa isolated from surgical wound-infections. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine, 1(1): 1-7.

Fair, R. J., & Tor, Y. 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspectives in Medicinal Chemistry, 6: PMC-S14459.

Fernández-Barat, L., & Torres, A. 2016. Biofilms in ventilator-associated pneumonia. Future Microbiology, 11(12): 1599-1610.

Fibrosis, C. 2009. Patient Registry 2008 Annual data report. Betheda, MD: Cytic Fibroi Foundation, 9: 1-3.

Finnan, S., Morrissey, J. P., O'gara, F., & Boyd, E. F. 2004. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. Journal of Clinical Microbiology, 42(12): 5783-5792.

Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14(9): 563-575.

Fuqua, C., & Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nature reviews Molecular Cell Biology, 3(9): 685-695.

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

Gomila, A., Carratalà, J., Badia, J. M., Camprubí, D., Piriz, M., Shaw, E., & Pujol, M. 2018. Preoperative oral antibiotic prophylaxis reduces Pseudomonas aeruginosa

surgical site infections after elective colorectal surgery: a multicenter prospective cohort study. BMC Infectious Diseases, 18(1): 1-9.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Archives of Microbiology, 198: 1-15.

Haenni, M., Bour, M., Châtre, P., Madec, J. Y., Plésiat, P., & Jeannot, K. 2017. Resistance of animal strains of Pseudomonas aeruginosa to carbapenems. Frontiers in Microbiology, 8: 1847.

Hall, C. W., & Mah, T. F. 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 41(3): 276-301.

Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B. P., Zhang, L., Nadeau, J. P., Copeland, S., & Mah, T. F. 2018. Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance gene ndvB expression requires the RpoS stationary-phase sigma factor. Applied and Environmental Microbiology, 84(7): e02762-17.

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

Hassuna, N. A., Mohamed, A. H. I., Abo-Eleuoon, S. M., & Rizk, H. A. W. A. 2015. High prevalence of multidrug resistant Pseudomonas aeru. Archives of Clinical Microbiology, 6(4).

Häussler, S., & Parsek, M. R. 2010. Biofilms 2009: new perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. Journal of Bacteriology, 192(12): 2941-2949.

Hemraj, V., Diksha, S., & Avneet, G. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. Innovare Journal of Life Sciences, 1(1): 1-7.

Heydari, S., & Eftekhar, F. 2015. Biofilm formation and β-lactamase production in burn isolates of Pseudomonas aeruginosa. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(3).

Idrees, E. K. M. 2012. Comparison between different phenotypic and genotypic methods for detection of metallo β–lactamases in Pseudomonas aeruginosa that has multidrug resistance th antibiotics. MSc. Thesis, Abdul Aziz University, 98 page, Jeddah.

Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. 2009. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(48): 20440-20445.

Issa, M. A., Ghaima, K. K., Saleh, M. B., & Nader, M. I. 2018. Antibiogram study and prevalence of pslá gene among biofilm Pseudomonas aeruginosa producers isolated from some clinical specimens in thi_qar province. Pakistan Journal of Biotechnology, 15(3): 681-688.

Jakobsen, T. H., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Givskov, M., & Høiby, N. 2013. Targeting quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms: current and emerging inhibitors. Future Microbiology, 8(7): 901-921.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., & Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1): 7-11.

Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F., & 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.

Kaplan, J. Á. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of Dental Research, 89(3): 205-218.

Kinch, M. S., Patridge, E., Plummer, M., & Hoyer, D. 2014. An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: antibacterial agents. Drug Discovery Today, 19(9): 1283-1287.

Klockgether, J., & Tümmler, B. 2017. Recent advances in understanding Pseudomonas aeruginosa as a pathogen. F1000Research, 6.

Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. Nature Reviews Microbiology, 15(12): 740-755.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. 2004. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. Trends in Molecular Medicine, 10(12): 599-606.

Lee, J. H., Kim, Y. G., Ryu, S. Y., Cho, M. H., & Lee, J. 2014. Ginkgolic acids and Ginkgo biloba extract inhibit Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus biofilm formation. International Journal of Food Microbiology, 174: 47-55.

Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., & Balaban, N. Q. 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science, 355(6327): 826-830.

Levinson, W. 2014. Review of medical microbiology and immunology. McGraw-Hill Education, 821 page, New York.

Lewis, K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Bacterial Biofilms, 107-131.

Lewis, K. I. M. 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(4): 999-1007.

Lipsky, B. A., Byren, I., & Hoey, C. T. 2010. Treatment of bacterial prostatitis. Clinical Infectious Diseases, 50(12): 1641-1652.

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

Martínez-Solano, L., Macia, M. D., Fajardo, A., Oliver, A., & Martinez, J. L. 2008. Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical Infectious Diseases, 47(12): 1526-1533.

Mashburn, L. M., & Whiteley, M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature, 437(7057): 422-425.

Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. 2019. Metabolomic studies of Pseudomonas aeruginosa. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35: 1-11.

Mitiku, M., Ali, S., & Kibru, G. 2014. Antimicrobial drug resistance and disinfectants susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates from clinical and environmental samples in Jimma University specialized hospital, Southwest Ethiopia. American Journal of Biomedical and Life Sciences, 2(2): 40-45.

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

Moradali, M. F., & Rehm, B. H. 2020. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. Nature Reviews Microbiology, 18(4): 195-210.

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. 2017. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7: 39.

Motevasel, M., & Haghkhah, M. 2018. Antimicrobial Resistance Profiles and Virulence Genes of Pseudomonas aeruginosa Isolates Originated from Hospitalized Patients in Shiraz, Iran. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases, 6(2): 72-76.

Mukherjee, S., & Bassler, B. L. 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nature Reviews Microbiology, 17(6): 371-382.

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. 2014. Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease. Microbial Ecology, 68: 1-12.

Namuq, A. O., Ali, K. O. M., & Al-Ani, A. H. 2019. Correlation between biofilm formation, multi-drug resistance and AlgD gene among Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, 27(3): 143-150.

Norbury, W., Herndon, D. N., Tanksley, J., Jeschke, M. G., Finnerty, C. C., & Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society. 2016. Infection in burns. Surgical Infections, 17(2): 250-255.

Ochoa, S. A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., López-Martínez, B., & Xicohtencatl-Cortes, J. 2013. Pathogenic characteristics of Pseudomonas aeruginosa strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. Boletin Medico del Hospital Infantil de Mexico, 70(2): 136-150.

Oluborode, O. B., Smith, S. I., Seriki, T. A., Fowora, M., Ajayi, A., & Coker, A. O. 2018. Antibiotic susceptibility pattern and molecular typing by PCR-RAPD analysis of clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. Microbiology and Biotechnology Letters, 46(4): 434-437.

Oluyombo, O., Penfold, C. N., & Diggle, S. P. 2019. Competition in biofilms between cystic fibrosis isolates of Pseudomonas aeruginosa is shaped by R-pyocins. MBio, 10(1): e01828-18.

Ozer, E., Yaniv, K., Chetrit, E., Boyarski, A., Meijler, M. M., Berkovich, R., & Alfonta, L. 2021. An inside look at a biofilm: Pseudomonas aeruginosa flagella biotracking. Science Advances, 7(24): 8581.

Palleroni, N. J. 2010. The pseudomonas story. Environmental Microbiology, 12(6): 1377-1383.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology Advances, 37(1): 177-192.

Park, W. S., Lee, J., Na, G., Park, S., Seo, S. K., Choi, J. S., & 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.

Parker, C. M., Kutsogiannis, J., Muscedere, J., Cook, D., Dodek, P., Day, A. G., & Canadian Critical Care Trials Group. 2008. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or Pseudomonas aeruginosa: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. Journal of Critical Care, 23(1): 18-26.

Parsons, J. F., Greenhagen, B. T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., & Ladner, J. E. 2007. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry, 46(7): 1821-1828.

Patil, P., Joshi, S., & Bharadwaj, R. 2015. Aerobic bacterial infections in a burns unit of Sassoon General Hospital, Pune. International Journal of Healthcare & Biomedical Research, 3(3): 106-112.

Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. 2015. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecules, 20(4): 5286-5298.

Pierson, L. S., & Pierson, E. A. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 86: 1659-1670.

Remans, K., Vercammen, K., Bodilis, J., & Cornelis, P. 2010. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology, 156(9): 2597-2607.

Rosenthal, V. D., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A. A., AlKhawaja, S. A. A., Leblebicioglu, H., Mehta, Y., & Roncancio-Vill, G. E. 2016. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. American Journal of Infection Control, 44(12): 1495-1504.

Roulová, N., Mot'ková, P., Brožková, I., & Pejchalová, M. 2022. Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. Journal of Water and Health, 20(4): 692-701.

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

Salimi, H., Owlia, P., Yakhchali, B., & Lari, A. R. 2009. Drug susceptibility and molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa isolated in a burn unit. American Journal of Infectious Diseases, (5).

Salimi, H., Yakhchali, B., Owlia, P., & Lari, A. R. 2010. Molecular epidemiology and drug susceptibility of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients. Laboratory Medicine, 41(9): 540-544.

Sastry, A. S., & Bhat, S. 2018. Essentials of medical microbiology. JP Medical, 844 page, New Delhi.

Sauer, K., & Camper, A. K. 2001. Characterization of phenotypic changes in Pseudomonas putida in response to surface-associated growth. Journal of Bacteriology, 183(22): 6579-6589.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. 2002. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Journal of Bacteriology, 184(4).

Schaarup, C., Pape-Haugaard, L. B., & Hejlesen, O. K. 2018. Models used in clinical decision support systems supporting healthcare professionals treating chronic wounds: systematic literature review. JMIR Diabetes, 3(2): e8316.

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

Schooling, S. R., Hubley, A., & Beveridge, T. J. 2009. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. Journal of Bacteriology, 191(13): 4097-4102.

Schwartz, T., Jungfer, C., Heißler, S., Friedrich, F., Faubel, W., & Obst, U. 2009. Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks. Chemosphere, 77(2): 249-257.

Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., & Longaker, M. T. 2009. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound Repair and Regeneration, 17(6): 763-771.

Shariati, A., Asadian, E., Fallah, F., Azimi, T., Hashemi, A., Yasbolaghi Sharahi, J., & Taati Moghadam, M. 2019. Evaluation of Nano-curcumin effects on expression levels of virulence genes and biofilm production of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. Infection and Drug Resistance, 2223-2235.

Sheets, A. R., Hwang, C. K., & Herman, I. M. 2016. Developing “smart” point-of-care diagnostic tools for “next-generation” wound care. Chap, 17: 251-264.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40(2): 175-179.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis, 115(8): 891-899.

Strateva, T., & Mitov, I. 2011. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections. Annals of Microbiology, 61(4): 717-732.

Sudhakar, T., Karpagam, S., & Premkumar, J. 2015. Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by Pseudomonas aeruginosa SU1. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(3): 921-924.

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

Tille, P. 2015. Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book. Elsevier Health Sciences, 1136 page, Amsterdam.

Trastoy, R., Manso, T., Fernández-García, L., Blasco, L., Ambroa, A., Perez Del Molino, M. L., & Tomás, M. 2018. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. Clinical Microbiology Reviews, 31(4): e00023-18.

Turkina, M. V., & Vikström, E. 2019. Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of Pseudomonas aeruginosa infections. Journal of Innate Immunity, 11(3): 263-279.

Vasudevan, R. 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. ournal of Microbiology & Experimentation, 1(3): 14.

Vidaillac, C., & Chotirmall, S. H. 2021. Pseudomonas aeruginosa in bronchiectasis: infection, inflammation, and therapies. Expert Review of Respiratory Medicine, 15(5): 649-662.

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

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A., & Actor, J. K. 2017. Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice. Elsevier, 304 page, Amsterdam.

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

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

WHO, World Health Organization. 2017. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization, 2017(12).

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

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

Wolcott, R., Costerton, J. W., Raoult, D., & Cutler, S. J. 2013. The polymicrobial nature of biofilm infection. Clinical Microbiology and Infection, 19(2): 107-112.

Yan, J., & Bassler, B. L. 2019. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. Cell Host & Microbe, 26(1): 15-21.

Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. 2018. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. Materials, 11(12): 2468.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Tara Fouad Raouf RAOUF

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013-2017