ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYALA (IRAK) ŞEHRİNDEKİ FARKLI KLİNİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA BAZI DİRENÇ VE VİRÜLANS GENLERİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY tarafından hazırlanan **"Diyala (Irak) Şehrindeki Farklı Klinik Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da Bazı Direnç ve Virülans Genlerinin Moleküler Tespiti"** adlı tez çalışması 05/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Alyaa ABDELHAMEED

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Diyala (Irak) Şehrindeki Farklı Klinik Kaynaklardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'da Bazı Direnç ve Virülans Genlerinin Moleküler Tespiti**" 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 (05/06/2023).

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİYALA (IRAK) ŞEHRİNDEKİ FARKLI KLİNİK KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'DA BAZI DİRENÇ VE VİRÜLANS GENLERİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Alyaa ABDELHAMEED

Gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel etkinliğini belirlemek için idrar, yanık ve yara dahil olmak üzere çeşitli klinik bölgelerden 150 numune alınmıştır. *P. aeruginosa* bakterisini izole etmek için Vitek II teknolojisi, geleneksel biyokimyasal ve kültür testleri kullanılmıştır. Vitek II sisteminin *P. aeruginosa* antibiyotik direnci analizine göre izolatların %100'ü (n=40) Siprofloksasin'e, %87,7'si (n=35) Tikarsilin'e, %87,7'si (n=35) Tikarsilin/Klavulanik Asit'e, %75'i (n=30) Piperasilin'e, %60'ı (n=24) Piperasilin/Tazobaktam'a, %72,5'i (n=29) Seftazidim'e, %57,5'i (n=23) Sefepim'e, 87,7'si (n=35) İmipenem'e, %70'i (n=28) Amikasin'e, %55'i (n=22) Gentamisin'e, %75'i (n=30) Meropenem'e, %30'u (n=12) Tobramisin'e ve %25'i (n=10) Kolistin'e direnç göstermiştir. İzolatların hepsi biyofilm oluşturma yeteneği göstermiştir. PCR amplifikasyon sonuçlarına göre *algD*, *pelF* ve *pslD* genleri *P. aeruginosa* izolatlarının sırasıyla %50, %40 ve %25'inde bulunmuştur. AgNps'nin MİK ile *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki etkisini araştırmak için farklı gümüş nanopartikül konsantrasyonları (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml) kullanılmıştır. Sonuçlar, 4 µg/ml konsantrasyonun en yüksek etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu araştırmada, *algD* geni *P. aeruginosa* izolatlarında daha baskın olduğundan, AgNP'lerin *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki etkilerini incelemek için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. AgNP'lerle işlem öncesinde ve sonrasında *algD* ekspresyonunun ortalama ΔCT (23.72±0.85) ve (18.32±0.61) seviyeleri elde edilmiştir. Ayrıca, ΔΔCT değerleri (-0.32±0.85) ve (-5.1±0.61) olarak bulunmuştur.

2023, 57 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Biyofilm, Virülans genleri, Gen ifadesi, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DETERMINATION OF SOME RESISTANCE AND VIRULANCE GENES IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SOURCES IN DİYALA (IRAQ)

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Alyaa ABDELHAMEED

To identify the antibacterial efficacy of silver nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples, 150 samples from various clinical sites, including urine, burn, and wound, were collected for this study. Vitek II technology, traditional biochemical and culture tests were used to isolate *P. aeruginosa*. According to the *P. aeruginosa* antibiotic resistance analysis of the Vitek II system, 100% (n=40) of the isolates were Ciprofloxacin, 87.7% (n=35) Ticarcillin, 87.7% (n=35) Ticarcillin/Clavulanic Acid, 75% (n=30) Piperacillin, 60% (n=24) Piperacillin/Tazobactama, 72.5% (n=29) Ceftazidime, 57.5% (n=23) Cefepime 87.7 (n=35) Imipenem, 70% (n=28) Amikacin, 55% (n=22) Gentamicin, 75% (n=30) Meropenem, 30% (n=12) were resistant to Tobramycin and 25% (n=10) to Colistin. All of the isolates showed the ability to form biofilms. According to PCR amplification results, *algD*, *pelF* and *pslD* genes were found in 50%, 40% and 25% of *P. aeruginosa* isolates, respectively. Different silver nanoparticle concentrations (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml) were used to investigate the effect of AgNps on MIC and *P. aeruginosa* isolates. The results showed that the 4 μg/ml concentration had the highest efficacy. In this study, RT-PCR method was used to examine the effects of AgNPs on *P. aeruginosa* isolates, since the *algD* gene is more dominant in *P. aeruginosa* isolates. Mean ΔCT (23.72±0.85) and (18.32±0.61) levels of *algD* expression were obtained before and after treatment with AgNPs. Also, ΔΔCT values were found as (-0.32±0.85) and (-5.1±0.61).

2023, 57 pages

Keywords: Biofilm, Virulence genes, Gene expression, *Pseudomonas aeruginosa*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR'a bilimsel rehberliği, sabrı ve anlayışı için çok teşekkür ederim. Aynı zamanda eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Alyaa ABDELHAMEED'e de destekleri için teşekkür ederim.

Omar Hussein Ali AL-OBAIDY
Çankırı, Haziran 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**
1.1 Çalışmanın Amacı **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **2**
2.1 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Özellikleri **2**
2.2 Sınıflandırma **3**
2.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Patojenitesi **4**
2.4 *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi **5**
2.5 *P. aeruginosa*'nın Genomiği **6**
2.6 *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Direnci **7**
2.7 Gümüş Nano Parçacıklar (AgNPs) **9**
2.8 Virülans Faktörleri **9**
3. MATERYAL VE METOT **12**
3.1 Aletler ve Ekipmanlar **12**
3.2 Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar **12**
3.3 Kitler **13**
3.4 Hastalar ve Örneklerin Toplanması **13**
3.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Tanımlanması **14**
3.6 Antibiyotik Duyarlılık Testi **14**
3.7 Biyofilm Oluşumunun Saptanması **14**
3.7.1 Biyofilm oluşturma **14**
3.7.2 Biyofilmin boyanması **15**
3.7.3 Biyofilmin ölçülmesi **16**

3.8 Nanopartiküller 16
3.8.1 AgNP'lerin biyosentezi 16
3.8.2 Ag-NPs stok konsantrasyonunun belirlenmesi 17
3.8.3 AgNP'lerin *P. aeruginosa*'ya karşı (MİK) belirlenmesi 17
3.9 Moleküler Biyolojik Çalışmalar 17
3.9.1 DNA izolasyonu 17
3.9.2 DNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanması 19
3.9.3 DNA kalitesini analiz etmek için jel elektroforezi 19
3.9.4 RNA izolasyonu 19
3.9.5 Primerlerin hazırlanması 20
3.9.6 Genlerin tespiti 20
3.10 İstatistiksel Analiz 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 22
4.1 Bakteriyel İzolatlar 22
4.2 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karakterizasyonu ve Taranması 23
4.3 Fenotipik Karakterizasyon ve Mikroskobik Tanımlama 23
4.4 Biyokimyasal Tanımlama 24
4.5 Vitek II Tanımlaması 25
4.6 Vitek II sistemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Tespiti 26
4.7 Biyofilm Oluşumu 28
4.8 AgNP'lerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi 29
4.9 Genlerin Amplifikasyonu, Sekanslama ve Gen İfadesi 30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 36
5.1 Sonuçlar 36
5.2 Öneriler 36
KAYNAKLAR 37
EKLER 48
ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
β	Beta
dk	Dakika
gm	Gram
kb	Kilobayt
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Millilitre
nm	Nanometre
h(s)	Saatler
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
Δ	Silme
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

AST	Antimikrobiyal duyarlılık testi
NA	Besin agarı
MDR	Çoklu ilaca dirençli
DDW	Deiyonize damıtılmış su
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
PBS	Fosfat tampon salin
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
AgNPs	Gümüş nanopartiküller
UTIs	İdrar yolu enfeksiyonları
UTI	İdrar yolu enfeksiyonu
CAUTI	Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu
CF	Kistik fibrozis
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
COPD	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MBL	Metallo-ß-laktamazlar
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyon
OD	Optik yoğunluklar
PAGI	Patojenite adaları
Psl	Polisakkarit sentez lokusu
TSB	Triptikaz soya suyu
ICU	Yoğun bakım ünitelerinde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Başlıca *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının şematik gösterimi (Tuon *et al.* 2022) 2
Şekil 2.2 *P. aeruginosa* patojenitesi için önemli virülans faktörleri (Killough *et al.* 2022) 10
Şekil 4.1 Pozitif ve negatif kültürlere göre dağıtılmış örnekler 22
Şekil 4.2 Örneklerden elde edilen bakteri izolatları 23
Şekil 4.3 Cetrimide agar üzerinde 37°C'de 24 saat boyunca gelişen *P. aeruginosa* kolonileri (mavimsi-yeşil) 24
Şekil 4.4 *P. aeruginosa* için pozitif çıkan oksidaz (+), katalaz (+), indol (-), üreaz (-) ve sitrat kullanımı (+) testleri 25
Şekil 4.5 Klinik izolatlarda *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnci 26
Şekil 4.6 AgNP'lerin *P. aeruginosa*'ya karşı broth mikrodilüsyon tekniği ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 29
Şekil 4.7 *algD* geni için agaroz jel elektroforezi 30
Şekil 4.8 *pelF* geni için agaroz jel elektroforezi 30
Şekil 4.9 *pslD* geni için agaroz jel elektroforezi 31
Şekil 4.10 *algD* geninin amplifikasyonu cDNA ürünü ve 16S rRNA referans geni 33
Şekil 4.11 *algD* geninin değişimi 34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Ekipman ve araçlar 12
Çizelge 3.2 Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler 12
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan tanımlanmış ve orijinal kitler 13
Çizelge 3.4 TCP tekniği kullanılarak bakteriyel yapışma ve biyofilm sınıflandırması 16
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan reaksiyon bileşenleri 20
Çizelge 3.6 Araştırmada kullanılan primer seti 20
Çizelge 3.7 Genlerin reaksiyon bileşenleri 21
Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla DNA dizilimi 21
Çizelge 4.1 *P. aeruginosa*'nın karakterizasyonu için biyokimyasal testler 24
Çizelge 4.2 *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı 26
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* ile biyofilm oluşumu 28
Çizelge 4.4 Gen polimorfizmlerinin ifade edilme şekli 32
Çizelge 4.5 *algD* geninin ortalama ve aralık değişim sonuçları 33

1. GİRİŞ

Yoğun bakım ünitelerinde *Pseudomonas aeruginosa*, sağlık hizmetleriyle bağlantılı enfeksiyonların önemli bir kaynağıdır. Kistik fibrozis (KF), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), idrar yolu enfeksiyonları, yanık yarası enfeksiyonları ve keratiti olan kişiler ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkili olan enfeksiyonlarına karşı özellikle savunmasızdır (Botelho *et al.* 2019, Riquelme *et al.* 2020).

P. aeruginosa, uyarlanabilir metabolizması, çeşitli ortamlarda gelişme kapasitesi ve konakçı bağışıklık tepkilerine dayanma kapasitesi nedeniyle hem akut hem de kronik enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. DNA'sında çok sayıda virülans faktörü ve antibiyotik direnci etmeni bulunmaktadır (Maurice *et al.* 2018). Etkili tedavilerin ve aşıların geliştirilmesi, *P. aeruginosa*-konak etkileşimlerinin hala tam olarak anlaşılamamış olması nedeniyle daha da zorlaşmaktadır.

1.1 Çalışmanın Amacı

1. Vitek-2 kompakt sistemi kullanılarak bakteri izolasyonu ve tanımlanması.

2. Antimikrobiyal duyarlılık testi (AST).

3. Virülans faktörlerinin incelenmesi.

4. NPs materyallerinin inhibisyon biyofilm faktörleri olarak kullanılması.

5. Seçilen izolatı genetik olarak tanımlamak için plazmid DNA ekstraksiyonu.

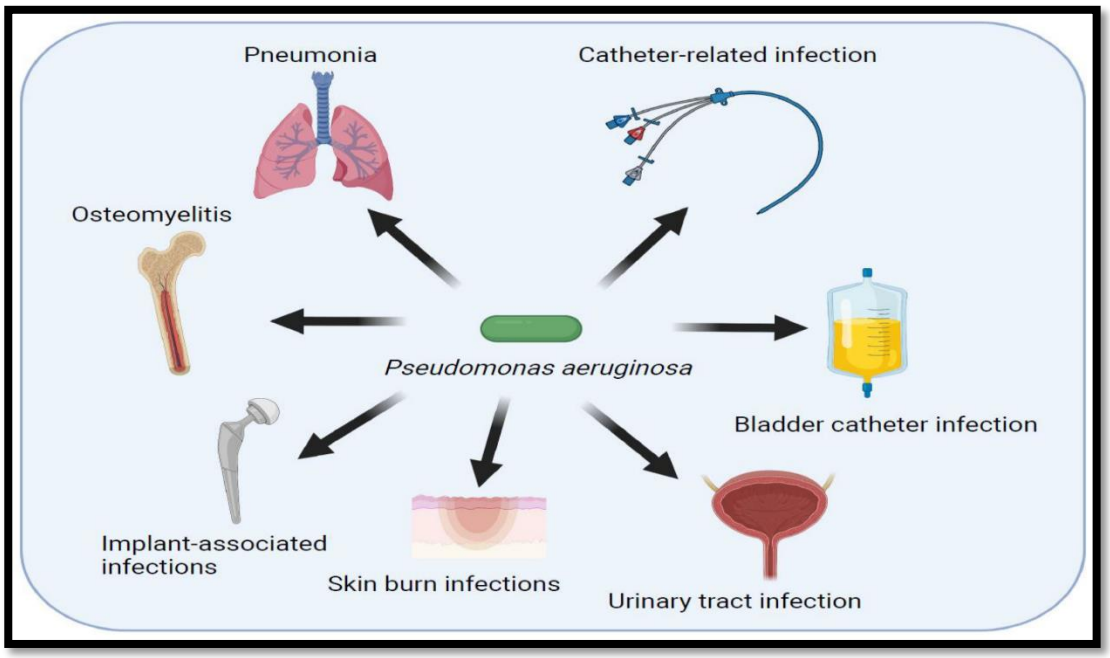
6. İnhibitörlerin direnç genleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için gen ekspresyonu ve bilgisayarlı analiz.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Özellikleri

Topraktan, bitkilerden ve hayvan dokularından izole edilebilen Gram negatif aerobik çubuk şeklinde bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* flagella, pili ve biyofilm gibi güçlü bağlayıcı bileşenlerini kullanarak suda, farklı yüzeylerde ve tıbbi ekipmanlarda yaşayabilir. Bu nedenle göller, hastaneler ve hatta mutfak giderleri gibi hem doğal hem de insan yapımı ortamlarda yaygındır (Wood *et al.* 2023).

P. aeruginosa, insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Şekil 2.1). Antibiyotiklere, çeşitli ışınlama tedavilerine, çevreye, dezenfektanlara ve bağışıklık sistemine karşı artan direnci nedeniyle *P. aeruginosa* biyofilmler oluşturur ve tıbbi cihazlar ve gıda endüstrisinde kullanılan ekipmanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli yüzeylerde kolonize olarak kronik enfeksiyonlara neden olur (Patel *et al.* 2022, Djuikoue *et al.* 2023).



Şekil 2.1 Başlıca *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının şematik gösterimi (Tuon *et al.* 2022)

Bu patojenin adezyon, kolonizasyon ve biyofilm oluşumu yoluyla hem doğuştan gelen hem de edinilmiş bağışıklık savunmalarından kaçma kapasitesi ve ciddi doku hasarına neden olan farklı virülans faktörleri üretmesi nedeniyle bağışıklık sistemi zayıflamış kişiler bu patojenin etkilerine karşı hassastır (Turkina and Vikström 2019).

P. aeruginosa enfeksiyonları, özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR) suşlar söz konusu olduğunda, yanlış tedavi uygulandığında ölümcül olabilir. 30 yıldır MDR hem insan hem de hayvan sağlığı için bir tehdit oluşturmaktadır. Yeni antimikrobiyal ilaçlar geliştirilmiş olsa da, %20-60 arasında değişen *P. aeruginosa* kaynaklı ölüm oranları hala yüksektir (Ito *et al.* 2021, Bail *et al.* 2022).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogenezi göz önünde bulundurulduğunda virülansın en önemli etkenlerinden biri biyofilm gelişimidir. Biyofilm üretme konusundaki ünü göz önüne alındığında *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu incelemek için ilgi çekici bir in vitro model oluşturmaktadır (Katsipis and Pantazaki 2023).

2.2 Sınıflandırma

rRNA/DNA homolojisi ve paylaşılan kültürel özelliklere dayanarak Pseudomonadaceae familyası beş gruba ayrılmıştır (Carroll *et al.* 2016).

P. aeruginosa'nın bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: *Pseudomonadales*

Family*: Pseudomonadaceae*

Genus: *Pseudomonas*

Species: *Pseudomonas aeruginosa*

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Patojenitesi

Pseudomonas aeruginosa, yaygın bir bakteri olan Gram-negatif fırsatçı bir patojendir ve zayıflamış doğal savunmalara sahip insanları enfekte ederek ölümcül akciğer hastalığına neden olabilir. Nosokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili temel patojenlerden biridir. Konakçının savunmalarının ötesine geçmek için kullandığı birçok patojenik faktöre sahiptir (Breidenstein *et al.*, 2011). Enfeksiyonlar, bir hasta hastaneye yatırıldığında daha yaygın ve çeşitlidir (Kumar *et al.*, 2016). AIDS, kanser veya ciddi yanıklar gibi bağışıklık sistemini baskılayan hastalıkları olan kişiler özellikle risk altındadır (Pang *et al.* 2019). *P. aeruginosa* tarafından üretilen akciğer enfeksiyonları temel olarak iki faktörden kaynaklanmaktadır: (i) bakterinin patojenitesi ve uyarlanabilirliği ve (ii) insan bağışıklık sisteminin etkinliği (Williams *et al.* 2010).

Deri veya mukoza zarı diyebileceğimiz birincil fiziksel bariyerler, bunların bozulması, geçişi ve enfeksiyonları hızlandırmak için tamamlayıcı bir neden olarak gerekli olan altta yatan bir bağışıklık savunma mekanizması bozukluğu, bir enfeksiyonun gelişimindeki tüm adımlardır (Ratkai 2011). Antibiyotik tedavisinin geçmişte kullanılması, *P. aeruginosa*'nın doku kolonizasyonu için dokulara erişimine izin vererek yararlı bakterileri ortadan kaldırmış olabilir (Kumar *et al.* 2016). Ayrıca, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ya da neoplastik hastalıklar için kemoterapi alan bireylerde enfeksiyonlara neden olmaktadır (Shaan and Robert 2013).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının miktarı ve ciddiyetine ek olarak, insanları enfekte edebileceği çok çeşitli dokular *P. aeruginosa*'yı önemli bir patojen haline getirmektedir (Gellatly and Hancock 2013). *P. aeruginosa*'nın çevresel değişikliklere hızla uyum

sağlama, hızlı bir şekilde antibiyotik direnci geliştirme ve çok çeşitli virülans faktörleri oluşturma yeteneği göz önüne alındığında bu enfeksiyonların morbidite ve mortalite oranlarını büyük ölçüde artırması şaşırtıcı değildir (Mitov *et al.* 2010).

P. aeruginosa, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yumuşak doku enfeksiyonları, septisemi, cerrahi yaralar, akciğer, kan dolaşımı ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan ilk beş mikroptan biridir (Veesenmeyer *et al.* 2009). İdrar yolu enfeksiyonlarının üçüncü en yaygın nedeni (%7-11), kan dolaşımı enfeksiyonlarının yedinci en yaygın nedeni (%2-6) ve cerrahi alan enfeksiyonlarında dördüncü en yaygın izole patojen (%8) olarak da bilinmektedir (Lister *et al.* 2009). Ayrıca, tüm nozokomiyal pnömoni vakalarının %14-16'sından sorumludur. *P. aeruginosa* yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü tarafından antibiyotiklere dirençli öncelikli enfeksiyonlar listesindeki başlıca hastalıklardan biri olarak dahil edilmiş ve yeni ilaçlara olan acil ihtiyaç vurgulanmıştır (WHO 2017). Bağışıklık sistemi defekti olan veya bağışıklığı bozulmuş kişilerin %50 ila %60'ını etkilemektedir (Migiyama *et al.* 2016).

Gen ifadesinin düzenlenmesi ve beslenme ve metabolik yollar gibi çeşitli adaptif mekanizmaların evrimi, *Pseudomonas* enfeksiyonlarının çeşitliliğinden sorumludur (Ryan 2011). Hastalar arasında zaman içinde belirli bir dizi genin ifadesinin karşılaştırılması, transkriptomik boylamsal çalışmaların *P. aeruginosa*'nın karşılaştığı genetik değişikliklere ışık tutmasını sağlamıştır (Huse *et al.* 2010, Holban *et al.* 2013).

2.4 *P. aeruginosa*'nın Epidemiyolojisi

Nozokomiyal pnömoni, *P. aeruginosa* için önde gelen enfeksiyon nedenidir ve çoğunlukla bu Gram-negatif bakteriden kaynaklanır. *P. aeruginosa*, yoğun bakım ünitesi (YBÜ) hastalarında sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların önemli bir yüzdesinden sorumludur ve insidansı son on yılda artmaktadır (Cillóniz *et al.* 2019).

Dünya çapında yapılan büyük bir gözlemsel nokta prevalans araştırması, *P. aeruginosa* enfeksiyonunun en yaygın kaynağının solunum sistemi olduğunu ve tüm YBÜ kaynaklı enfeksiyonların %23'ünü oluşturduğunu ortaya koymuştur (Vincent *et al.* 2020).

Hastanelerde *P. aeruginosa* özellikle CAUTI (Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu) olmak üzere idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) yaygın bir kaynağıdır. *P. aeruginosa,* yoğun bakım ünitesi hastalarında görülen İYE'lerin %16'sının kaynağıdır ve bunların %10'u CAUTI'lerden kaynaklanmaktadır (Reynolds and Kollef 2021). *P. aeruginosa*'ya bağlı nozokomiyal İYE önemli morbidite ve mortalite ile ilişkilidir ve bakteriyemi bu enfeksiyonun potansiyel bir sonucudur (Morin *et al.* 2021).

P. aeruginosa'ya bağlı üriner kateter ilişkili enfeksiyon (ÜKİE), bölgesel antimikrobiyal direnç eğilimlerine göre, floroakinolonlar, piperasilin-tazobaktam ve meropenem gibi antibiyotikler için yüksek direnç oranlarıyla ilişkilidir; Uluslararası nosokomiyal enfeksiyon kontrol konsorsiyumunun raporu, yoğun bakım ünitesindeki hastalarda %40'tan fazla direnç oranlarını ortaya koymuştur. (Popović *et al.* 2020).

Yanık yarası enfeksiyonlarının çoğuna, sepsis ve mortalite ile ilişkili olan *P. aeruginosa* neden olmaktadır; bu bakterinin yanık hastalarını tercih etmesinin, yanık yarası olan kişilerin nemli ortamından etkilendiği düşünülmektedir. Çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalar (MDR), yanık hastalarında da önemli bir ölüm nedenidir (Reynolds and Kollef 2021).

2.5 *P. aeruginosa*'nın Genomiği

Yatay gen transferi, çok sayıda genomik adanın varlığı ve hareketli elementlere (ekleme dizileri, bakteriyofajlar veya plazmidler gibi) bağlı genlerin veya gen parçalarının varlığı, *P. aeruginosa* genomunun mozaik yapısına katkıda bulunur (Jani and Azad 2021).

Ortalama 6,6 Mbp boyutuyla *P. aeruginosa*, insanlarda hastalığa neden olan en büyük bakteriyel genomlardan birine sahiptir. DNA'sında çok sayıda guanin ve sitozin (G+C) ve sadece bir kromozom vardır. Ayrıca ek bir kromozomal genetik element olan bir plazmide sahiptir (Dorman 2020).

Büyük genomik esneklik, hızlı bir şekilde antibiyotik direnç genlerini kodlayan büyük yer değiştirici genetik elementler (integronlar) kazanmayı mümkün kılar ve genomun %10'u, virülans bileşenlerini kodlayan uyarlanabilir genlerden oluşan 'patojenisite adaları' (PAGI) olarak düzenlenmiştir (Portillo-Ledesma *et al.* 2023).

P. aeruginosa 5,2 ila 7,1 Mbp arasında değişen değişken bir genom boyutuna sahiptir, Tavsiyelere göre, dizilenmiş *P. aeruginosa* suşu (PAO1 suşu) %80'den fazla tamamlanmış bir genoma sahiptir, bu da virülansın heterojenliğine katkıda bulunabilir (Mehra *et al.* 2021).

2.6 *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal direnç genellikle bir organizmanın, önceden hassas olduğu bir patojenin etkilerine karşı koyma kapasitesi olarak tanımlanır (Pachori *et al.* 2019).

Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'ne (IDS) göre, *P. aeruginosa* ve diğer sözde 'ESKAPE' enfeksiyonları, yeni antibiyotiklerin ve ilaç benzeri bileşiklerin acil olarak geliştirilmesi için ana hedeflerdir, çünkü yakın zamanda kurulan antimikrobiyal ilaçların etkilerinden 'kaçabilmektedirler' (Botelho *et al.* 2023).

Önemli ve sık görülen fırsatçı hastane enfeksiyonlarından biri *P. aeruginosa*'dır. Bu organizma, çeşitli antibiyotik türlerine karşı doğuştan gelen direnci nedeniyle tedavisi zor olan ve dolayısıyla yüksek morbidite ve ölümle ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır (Qin *et al.* 2022).

Hastanelerde *P. aeruginosa* enfeksiyonu, özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalar için büyük bir sorundur. Ayrıca, bu enfeksiyonların tedavisi, güçlü antibiyotiklerin kullanımının azlığı, *P. aeruginosa* suşlarının doğal direnci ve çoğalmalarının farklı yolları nedeniyle genellikle zordur (Bavaro *et al.* 2021).

Kromozomal gen repertuarlarını ve direnç belirleyicilerini içeren diğer kromozomal elementleri değiştirerek, *P. aeruginosa* çoğu antibiyotiğe karşı kolaylıkla direnç geliştirir. (Li and Plésiat 2016).

P. aeruginosa geniş spektrumlu direnci çoğunlukla bir dizi farklı nedenden kaynaklanmaktadır:

I. Dış zarın düşük geçirgenliği.

II. Kromozomal beta-laktamaz AmpC uyarılabilir ve mevcuttur.

III. Birlikte çalışan çoklu ilaç atılım sistemleri, daha büyük bir etki sağlamak için bir araya gelir.

IV. Karbapenem hidroliz enzimlerinin (çoğunlukla metalo-beta-laktamazlar MBL) bir taşınabilir direnç belirleyici olarak aktarımı. (Ghasemian *et al.* 2018).

P. aeruginosa'ya karşı çok sayıda antimikrobiyal (karbapenemler, sefepim, seftazidim, tobramisin ve amikasin) hala etkilidir, ancak son zamanlarda bu bakterinin çeşitli diğer antimikrobiyallere karşı direncinin arttığı gözlenmektedir. (Ruiz Martínez *et al.* 2011).

Karbapenemler, özellikle İmipenem, sıklıkla klinik ortamda kullanıldığından, *P. aeruginosa*'ya karşı güçlü antibakteriyel etkisi bu türde edinilmiş karbapenem direncinin oluşumu ve yayılması nedeniyle etkisini kaybetmektedir (Bakhat *et al.* 2019).

2.7 Gümüş Nano Parçacıklar (AgNPs)

Kemoterapilerdeki potansiyel faydaları nedeniyle AgNP'ler sağlık hizmetleri, biyotıp, gıda ve endüstriyel uygulamalar da dahil olmak üzere çeşitli disiplinlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartikül üretimi, nanoteknolojinin çok önemli bir bileşenidir (Yang *et al.* 2020).

Nanoteknoloji araçları, biyolojik engelleri aşarak ve terapötik ilaçları doğrudan ileterek kanserle mücadelede etkili bir yöntem sunmaktadır. Metalik nanopartiküllerin kapsamlı optik özellikleri, yüksek yüzey-hacim oranı, üretim kolaylığı ve yüzey işlevselleştirmesi yeni kemoterapötik anlayışlar sunmaktadır (Ali *et al.* 2021).

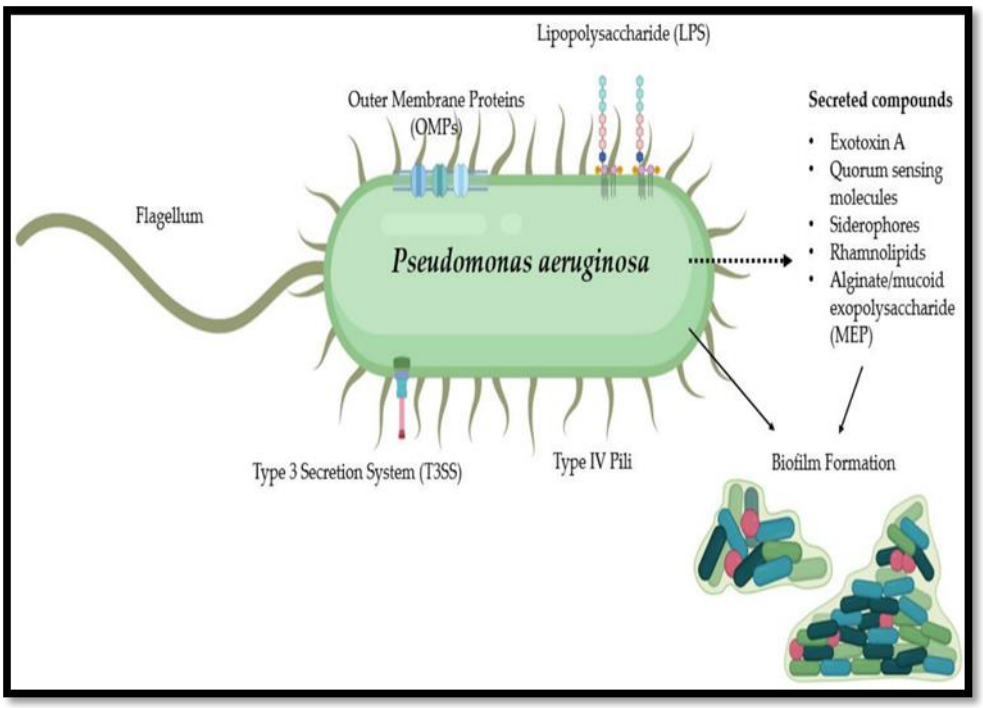
Tüm dünyada saf biyolojik moleküller, genellikle yüksek enerji tüketimi ve toksik, tehlikeli kimyasalların kullanıldığı AgNPs sentezi sürecine yardımcı olmak için başarıyla kullanılmıştır. Nanoteknolojideki bu biyomolekül yaklaşımı, nanopartikül destekli kemoterapilerin geliştirilmesi için özellikle dikkat çekici bir yöntemdir. (Zhang *et al.* 2016, Singh *et al.* 2018a). Ayrıca bakteri, maya ve mantarlar, çeşitli nanomateryallerin üretilmesi için Nano-fabrikalar olarak hızla kullanılmaktadır (Yang *et al.* 2020). Mikrobiyal süreç çok çeşitli ekoloji dostu, uygun maliyetli ve hızlı üretilen yeşil nanomateryal sentez yöntemleri sunmaktadır (Rónavári *et al.* 2017, Yang *et al.* 2020).

Pepton, maya özütü, dekstroz ve diğer önemli büyüme bileşenleri mikrobiyal büyüme ortamına dahil edilir ve bunlardan bazıları daha önceki bulgulara göre potansiyel azaltma ve stabilize etme yeteneklerine sahip olabilir (Rónavári *et al.* 2017).

2.8 Virülans Faktörleri

P. aeruginosa'nın vücuda enfeksiyon bulaştırmak için kullanmış olduğu çeşitli virülans faktörleri, patojenik karakterine katkıda bulunur ve vücudun birçok yerinde enfeksiyon oluşmasın sebep olur. Bu maddelerin birçoğu yüksek oranda immünojenik olmasına

rağmen, Şekil 2.2'de gösterildiği gibi bakterinin konakçının immünolojik reaksiyonundan kaçınmasına ve bunu bastırmasına yardımcı olmaktadır (Killough *et al.* 2022).



Şekil 2.2 *P. aeruginosa* patojenitesi için önemli virülans faktörleri (Killough *et al.* 2022)

P. aeruginosa biyofilmlerinde bulunan ekzopolisakkaritler arasında aljinat, polisakkarit uzama faktörü (Psl) ve polietilen glikol (Pel) bulunur. d-mannuronik asit ve -l-guluronik asitten oluşan doğrusal bir polimer olan aljinat, biyofilmlerin yapısal stabilitesi ve savunması için çok önemlidir (Franklin *et al.* 2011).

P. aeruginosa'nın alg ACD operonu aljinat sentezini kontrol eder. *algD* geni tarafından kodlanan GDP-mannoz dehidrojenaz a*lgD*, GDP mannozu GDP-mannuronik aside dönüştürür (Kamali *et al.* 2020).

algD geni, Alg proteinlerinin transkripsiyonunu ve aljinat biyosentezini kontrol eder. Ayrıca polimerizasyon ve aljinat sentezi için yapı taşı görevi gören öncü GDP-mannuronik asidin üretilmesinden de sorumludur (Laverty *et al.* 2014).

Biyofilm gelişimi sırasında Psl (polisakkarit sentez lokusu) tarafından yapılan hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarının biyofilm oluşumunun başlaması ve biyofilm yapısının korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Psl, d-mannoz, d-glukoz ve l-ramnozdan oluşan tekrar eden beşli bir sakkarittir (Zhang *et al.* 2022*).*

Birlikte kopyalanan 15 genden (pslA ila pslO) oluşan Psl operonu, muhtemelen biyofilmle ilgili bir ekzopolisakkaritin ihracı yoluyla biyofilm gelişiminin biyofilm bileşeni için gerekli olan dış membran proteini *pslD*'yi üretir (Kamali *et al.* 2020).

Pel (pellicle) operonu, *P. aeruginosa*'nın ayakta duran bir kültürün hava-sıvı arayüzünde oluşan polimer/hücre katmanları olan pelikülleri ürettiği süreci kontrol eder (Cao *et al.* 2020).

Pel, 14 bağlı, kısmen asetillenmiş galaktozamin ve glukozamin şekerlerinden (Pel A ila Pel G) oluşan bir ekzopolisakkarittir, selüloza duyarlıdır ve yedi genden oluşan bir operon tarafından kodlanır. Bir görüşe göre Pel F, Pel ekzopolisakkarit üretmek için donör substrat olarak UDP-glukoz kullanan çözünür bir glikoziltransferazdır (Fathima *et al.* 2023).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Aletler ve Ekipmanlar

Çizelge 3.1'de bu çalışma için laboratuvarda kullanılan alet ve ekipmanlar yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Ekipman ve aletler

Ekipman ve aletler \ Şirket \ Ülke
Hirayam'dan Otoklav
Almanya \Memmert\Almanya'dan İnkübatör ve Almanya\Almanya'dan Distilasyon Suyu (DW)
Julabo\Almanya'dan Su Banyosu\ ve \Rota vapor-RE- Buchi\ABD'den Döner Buharlaştırıcı
Santrifüj ve Mikropipetler Almanya
Uçlar
Ürdün'den Swablar ve Taşıma Ortamı Swabları
Çin'den Slaytlar ve Klipsler, plastik ve cam kaplar \OEM\China
Tek kullanımlık şırıngalar\USA
1,5 ml Eppendorf tüpleri \Promega'dan
ELISA (enzim bağlantılı immünosorbent deneyi) \Bio-Rad\USA
Uygulamalı biyo sistem\USA'dan Dijital Vernier Kumpas
Whatman filtre kağıdı nd 0.22 um Millipore from \Bio-Hit\Finlandiya
Steril polistiren (96)\\ kuyucuklu düz tabanlı doku kültürü plakaları \Sterial\Jordan
SaCycler-96 Gerçek Zamanlı PCR SİSTEMİ\Sacace\İtalya
Applied Biosystems TM ProFlex TM PCR System from \Fisher Scientific\USA

3.2 Biyolojik Materyaller ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik bileşenler çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasallar ve Biyolojik Maddeler

Biyolojik Malzemeler & Kimyasallar	Şirket	Ülke
MacConkey agar, Kan agarı, MR-VP broth, Cetrimide agar ve\veya Muller-Hinton agar\Hindistan, Simon sitrat agar, Kligler demir agar ve Nutrient agar\Oxoid\İngiltere		
Beyin kalp infüzyonu (BHI) suyu ve CCA ortamı\Pronadisa\İspanya		
Gram Stain (GS) Solüsyonları\Fluka\İsviçre ve \Sigma\ABD'den Üre agar bazı		
Normal salin (NS) \Mediplast\U.A.E'den		
DMSO \Loba chemie\India'dan ve TAE buffer10 X \Carl Roth\Almanya'dan		
Pepton broth medium from\Mast\U.K and Agarose\Carl Roth from\Germany		
Alamar BlueTM Cell Viability Reagent from \Invitrogen\U.S.A		
Biochmecal Reagent and Catalase Reagent from\BDH\İngiltere		
Suudi Arabistan'dan Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi ve \ veya Hidroklorik Asit (HCL)		
Kırmızı güvenli boyama solüsyonu\Intron\Kore ve Kloroform\BDH Prolabo from\Güney Afrika		
Ana Karışım veya GoTaq® Yeşil Ana Karışım\Promega\USA		
Primer \Makrojen\Kore ve Merdiven 100\Biyolab\New England		

3.3 Kitler

Bu araştırmadaki kitler ve menşeleri çizelge 3.3'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan tanımlanmış ve orijinal kitler

Ürün adı	Şirket	Menşei
FavorPrep Kan / Kültür Hücreleri Genomik DNA Ekstraksiyon Mini kiti	FAVORGEN	Kore
EasyScriptR Birinci-Strand cDNA Sentezi SuperMix	TransGen	Çin
GoTaqR qPCR Ana Karışımı	Promega	ABD
FavorPrep Kan/Kültürlü Hücre Total RNA Mini Kiti	FAVORGEN	Kore

3.4 Hastalar ve Örneklerin Toplanması

Nisan-Haziran 2022 tarihleri arasında Irak'ın Diyala kentindeki Bakuba Eğitim Hastanesi, Al-Batoul Eğitim Hastanesi ve Medical City Merkez Laboratuvarlarına gelen hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. İdrar yolu enfeksiyonu (İYE) olan hastalardan 50 idrar örneği, yanık geçiren hastalardan 50 yanık sürüntüsü ve yaralanan hastalardan 50

yara sürüntüsü olmak üzere 150 klinik örnek toplanmıştır. Toplandıktan hemen sonra, her numune soğutulmuş koşullar altında incelenmek üzere laboratuvara gönderilmiştir.

3.5 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Tanımlanması

P. aeruginosa izolatları laboratuvarda, Cetrimide agar besiyeri kullanılarak, agarda pigment oluşumu, oksidaz, indol, metil kırmızısı testi ve katalaz testleri gibi mikrobiyolojik ve biyokimyasal teknikler kullanılarak tanımlanmış ve ardından 37°C'de büyütülmüştür. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (CLSI) önerilerine göre, izolatların çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı Vitek II sistemi ile değerlendirilmiştir (Hussain *et al.* 2019).

3.6 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bir bakteri süspansiyonu oluşturmak için, daha önce tarif edilen üremeden 1-3 koloni (3 ml) normal salin içeren test tüplerine aktarılmış ve süspansiyonun bulanıklığı Ek 1'e göre (0,5) McFarland standardını karşılayacak şekilde ayarlanmıştır (Fritsche *et al.* 2011).

3.7 Biyofilm Oluşumunun Saptanması

Biyofilmin kantitatif tespiti bazı modifikasyonlarla (Fusco *et al.* 2017, O'Toole 2011, Tang *et al.* 2011) uyumlu olarak Doku Kültürü Plakası (TCP) yöntemiyle (mikrolitre plakası testi olarak da adlandırılır) belirlenmiştir. Bu metodoloji, biyofilm oluşumunu tespit etmede altın standart test olduğu için seçilmiştir (Costa *et al.* 2018) ve protokol aşağıdaki gibidir:

3.7.1 Biyofilm oluşturma

I. Taze üretilmiş izolatlar %1 glukoz içeren 10 ml triptikaz soya besiyerine (TSB) inoküle edildikten sonra 0,5 McFarland skalası kullanılarak karşılaştırılmıştır.

İnokülasyondan sonra besiyeri 37°C'ye kadar ısıtılmış ve 18 saat boyunca inkübe edilmiştir.

II. Bir gece inkübe edilen bakteri süspansiyonu daha sonra 9900 µl TSB'ye 100 µl bakteri süspansiyonu eklenerek taze TSB besiyeri ile 1:100 oranında seyreltilmiştir.

III. Seyreltilmiş bakteri süspansiyonunun 200 L'si steril bir polistiren doku kültürü plakasının (96 düz tabanlı kuyu içeren) kuyularına pipetlenmiştir. Ek olarak, steriliteyi sağlamak ve spesifik olmayan bağlanmayı tespit etmek için sadece steril besiyeri negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir izolat için üç kez inokülasyon gerçekleştirildi. Her izolat için üç kopya inokülasyon gerçekleştirilmiştir.

IV. Mikrolitre plakaları 24 saat boyunca 37°C'de tutulmuştur.

3.7.2 Biyofilmin boyanması

I. İnkübasyonun ardından, plakalardaki her bir oyuğun içeriği hafifçe vurularak çıkarılmıştır. Etrafta yüzen bakterilerden kurtulmak için oyuklar 200 L fosfat tampon tuzlu su (PBS) (pH 7.2) ile iki kez temizlenmiştir.

II. Plakanın 30 dk boyunca 37°C'de inkübatöre yerleştirilmesi, yapışık bakteriler tarafından üretilen biyofilmleri sabitlemiştir.

III. Bundan sonra kuyucuklara 200 L %1'lik kristal viyole çözeltisi eklendi ve numunelerin boyanması için 45 dk bekletildi. Mikrolitre plakaları, herhangi bir renk izini ortadan kaldırmak için üç kez steril damıtılmış su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 45 dk boyunca havada kurutulmuştur.

3.7.3 Biyofilmin ölçülmesi

I. Biyofilm adezyonlarında bulunan boyayı çözmek için 200 L etanol çözeltisi kullanılmıştır.

II. Bir mikro-ELISA okuyucu (630 nm dalga uzunluğunda) kullanılarak, etanolle boyanmış bakteriyel biyofilmlerin OD değeri 15-20 dk sonra ölçülmüştür. Deney üç kez tekrarlanmış ve ortalama OD belirlenmiştir. Bakteriyel aderans ve biyofilm oluşumu kuyulardaki optik yoğunluk okumalarıyla tespit edilmiştir. Biyofilm üretimi OD değerlerine göre güçlüden orta dereceye, zayıftan güçsüze doğru sıralanmıştır (Al-Dahmoshi 2013, Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 TCP tekniği kullanılarak bakteriyel yapışma ve biyofilm sınıflandırması

Ortalama OD değerleri	Uyumluluk	Biyofilm oluşumu
< 0.120	Yok	Yok/ zayıf
0.120 – 0.240	Orta derecede	Orta derecede
> 0.240	Güçlü	Yüksek

3.8 Nanopartiküller

3.8.1 AgNP'lerin biyosentezi

AgNP'lerin sentezi için hücre topağı, kültür sıvısının 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmesiyle yıkanmış ve ardından 50 mM fosfat tamponu (pH 7) kullanılarak aşındırılmıştır. Elde edilen hücre peleti, çift distile suda iyice süspanse edilmiş ve ardından 200 rpm'de 24 saat boyunca bir orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 7500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücresiz süpernatan elde edilmiştir Son olarak, 5 ml 1 mM $AgNO_3$ çözeltisi, 50 ml toplanmış hücresiz kültür süpernatanı içeren 100 ml şişeye aktarılmış ve daha sonra 20 dk boyunca 200 rpm'de çalkalanarak kültür oluşturulmuştur (Yang *et al.* 2020).

3.8.2 Ag-NPs stok konsantrasyonunun belirlenmesi

Gümüş nitrat çözeltisi DDW'de kimyasal olarak indirgenerek Ag-NP'lerin stok koloidal süspansiyonu sağlanmıştır (Khalil *et al.* 2021).

3.8.3 AgNP'lerin *P. aeruginosa*'ya karşı (MİK) belirlenmesi

Ag-NP'lerin stok kolloidal çözeltisi (1,7 g/ml) steril bir damıtıcı kullanılarak seyreltilmiştir. Çalışma çözeltileri, numunelerin mikrolitre plakalar üzerinde MHB ortamı ile istenen nihai konsantrasyonların iki katı konsantrasyona kadar seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Bakteriyel inokulum (1 105 CFU/ml) ve Ag-NP'ler (her biri 100 µl) 96 kuyucuklu mikrolitre plakalara değişen konsantrasyonlarda yerleştirilmiştir. Daha sonra plakalar 18 saat boyunca 37°C'de inkübatörde tutulmuştur (Chan and Mashitah 2013). İnkübasyonun ardından plakalar, her bir kuyucuğa 20 µl membran filtreli resazurin boyası (DDW içinde %0,1 w/v) eklenerek 37°C'de bir saat daha inkübatörde çalkalanmıştır. Koyu mavi, mikrolitre plaka kuyucuklarındaki bakteriyel büyümenin tamamen engellendiğini gösterirken mor resazurinin parlak pembeden kırmızıya dönüşmesi aktif olarak metabolize olan hücreleri göstermektedir. Kuyulardaki en düşük Ag-NP konsantrasyonları mavi kalarak MİK'lerin varlığını göstermiştir. Her deney üç kez gerçekleştirilmiştir (Abdelaziz *et al.* 2015).

3.9 Moleküler Biyolojik Çalışmalar

Çalışılan bakteri izolatlarının moleküler teşhisi amacıyla aşağıdakiler uygulanmıştır:

3.9.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu aşağıdaki talimatlara göre gerçekleştirilmiştir.

A. Kit İçeriği:

Cat. No:	**FABGK 100 (100 preps)**
RBC Lizis Tamponu	135 ml
FATG Tamponu	30 ml
FABG Tamponu	40 ml
W 1 Tampon	45 ml
Yıkama Tamponu * (konsantre)	25 ml
Elüsyon Tamponu	30 ml
FABG Mini Sütun	100 pcs
Toplama Tüpü	200 pcs
Kullanıcı Kılavuzu	1

B. Protokol

1. Uygun sayıda hücre (5 x 109'a kadar) 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve süpernatantı çıkarıldı.
2. Numuneye 200 µl FATG tamponu eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
3. Numuneye 200 µl FABG Tamponu eklendi ve 5 sn vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır
4. Numuneyi lize etmek için 70ºC'de 10 dk inkübe edildi.
5. DNA elüsyonu için gerekli Elüsyon tamponunu 70ºC su banyosunda önceden ısıtıldı.
6. Numuneye 200 µl etanol (%96~100) eklendi ve 10 sn boyunca vortekslendi.
7. Örnek karışımı FABG kolonuna aktarılarak 1 dk boyunca 14.000 rpm hızında santrifüjlendi.
8. FABG kolonuna 400 µl W1 tamponu eklendi ve 14.000 rpm hızda 30 sn santrifüjlendi. Akış suyu atıldı ve FABG kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
9. FABG kolonuna 600 µl yıkama tamponu eklendi ve 14.000 rpm hızda 30 sn santrifüjlendi. Akış suyu atıldı ve FABG kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
10. Kolonu kurutmak için 14.000 rpm hızda 3 dk daha santrifüjlendi.
11. Kuru FABG kolonu yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
12. FABG kolonunun membran merkezine 100 µl önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklendi.
13. FAGB kolonu bir inkübatörde 37 ºC'de 10 dk inkübe edildi.
14. DNA'yı elüe etmek için tam hızda 14.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi.

3.9.2 DNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanması

DNA konsantrasyonunu test etmek için Nano damla cihazı kullanılmıştır. Her DNA örneği bir mikrolitreye seyreltilmiş ve saflık, örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3.9.3 DNA kalitesini analiz etmek için jel elektroforezi

1. 1 gr agaroz materyalini çözmek için 100 ml 1x TBE içeren bir şişe kullanılmıştır. Çözelti berraklaştığında, agaroz sıcak bir blokta eritilmiştir.
2. Agaroz çözeltisini soğutmak için şişe 50-55°C sıcaklığa kadar soğutulmuştur.
3. Döküm tepsisinin uçlarını kapatmak için iki parça bant kullanmadan önce, ısıtılmış jele kırmızı boya (3 l) dökülmüştür.
4. Jel kalıbı tepsisi, tarakları yerleştirmek için kullanıldı.
5. Döküm tepsisi erimiş agaroz çözeltisi ile doldurulmuştur.
6. Tarak ve bant dikkatlice çıkarıldıktan sonra agaroz oda sıcaklığında sertleşmeye bırakılmıştır. Jel, TBE (1x) tamponu ile doldurulmuş olan elektroforez odasının üstüne yerleştirilmiştir.
7. DNA örnekleri (5 l) ve DNA yükleme tamponu (3 l) karıştırılmış ve ardından agaroz jel kuyucuklarına eklenmiştir.
8. Agaroz jel üzerinde bir saatlik elektroforez 70 V ve 65 A'da gerçekleştirilmiştir. UV-trans aydınlatıcı altında DNA görülebilmiştir.

3.9.4 RNA izolasyonu

RNA Çıkarma İzolasyonu üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir (Ek 2).

3.9.4.1 RNA'yı cDNA'ya dönüştürme

1. Her numune için yeni bir steril 0,2'lik tüp hazırlanmış ve aşağıdaki bileşenler çizelge 3.5'e göre eklenmiştir.

2. 25°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Bundan sonra, 42°C'de 15 dk inkübe edilmiştir (qPCR için).

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
Rastgele Astar	1 µl
2 x ES Reaksiyon Karışımı	10 µl
Easy Script RT/RI Enzim Karışımı	1 µl
RNaz içermeyen Su	Up to 20 µl
Elüe edilmiş RNA	5 µl

3.9.5 Primerlerin hazırlanması

Liyofilize primerler serbest ddH_2O içinde stok çözelti olarak kullanıma uygun 100 pmol/l konsantrasyona kadar sulandırılmıştır. Bundan sonra, bir stok -20°C'de muhafaza edilmiş ve 10 pmol/l mikrometre konsantrasyonunda bir çalışma primeri süspansiyonu yapılmıştır. Stok çözeltisinin 10 µl'si 90 µl serbest ddH_2O su ile karıştırılarak 100 µl nihai hacim elde edilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Araştırmada kullanılan primer seti

Primer	Sekanslar (5'- 3')	Ürün Boyutu (bp)	Referans
pslD-F	TGTACACCGTGCTCAACGAC	369	(El-sayed and Fahmy 2021)
pslD-R	CTTCCGGCCCGATCTTCATC		
pelF-F	GAGGTCAGCTACATCCGTCG	789	
pelF-R	TCATGCAATCTCCGTGGCTT		
algD-F	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT	1310	(Derakhshan *et al.* 2021)
algD-R	CTACCAGCAGATGCCCTCGGC		

3.9.6 Genlerin tespiti

Mevcut çalışma PCR kullanılarak genlerin tespitini içermektedir (Çizelge 3.7-3.8).

Çizelge 3.7 Genlerin reaksiyon bileşenleri

Bileşen	25 µl (Son Hacim)
Ana karışım	12.5 µl
İleri primer	10 picomols/ µl (1 µl)
Ters primer	10 picomols/ µl (1 µl)
DNA	1.5 µl
Damıtılmış su	9 µl

Çizelge 3.8 Polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla DNA dizilemesi

Faz ve Tm (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon\ 95 °C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon-2\ 94 °C	30 sn	30 döngü
Tavlama\ 60 °C	40 sn	
Uzatma-1\ 72 °C	40 sn	
Uzatma-2\ 72 °C	5 dk	1 döngü

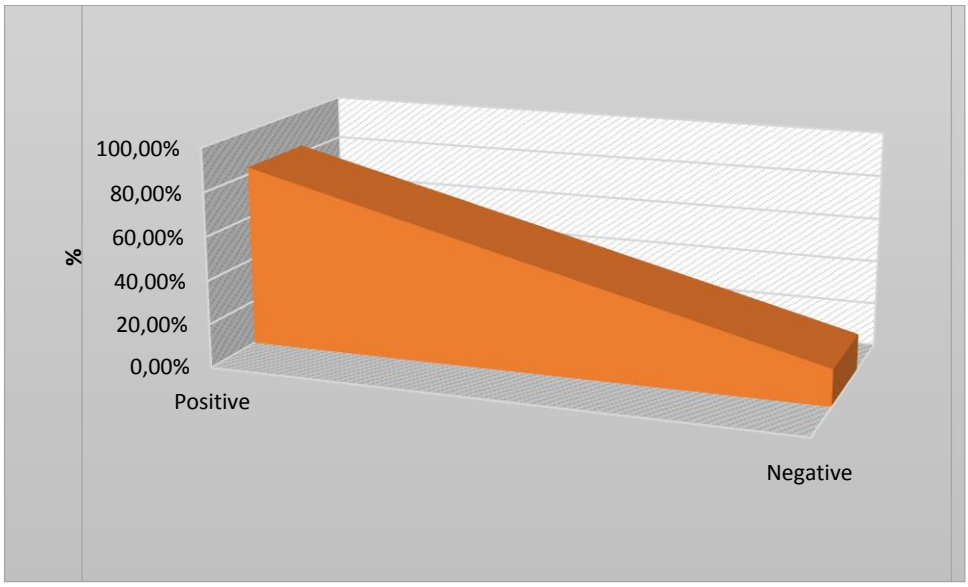
3.10 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde Excel ve SPSS programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

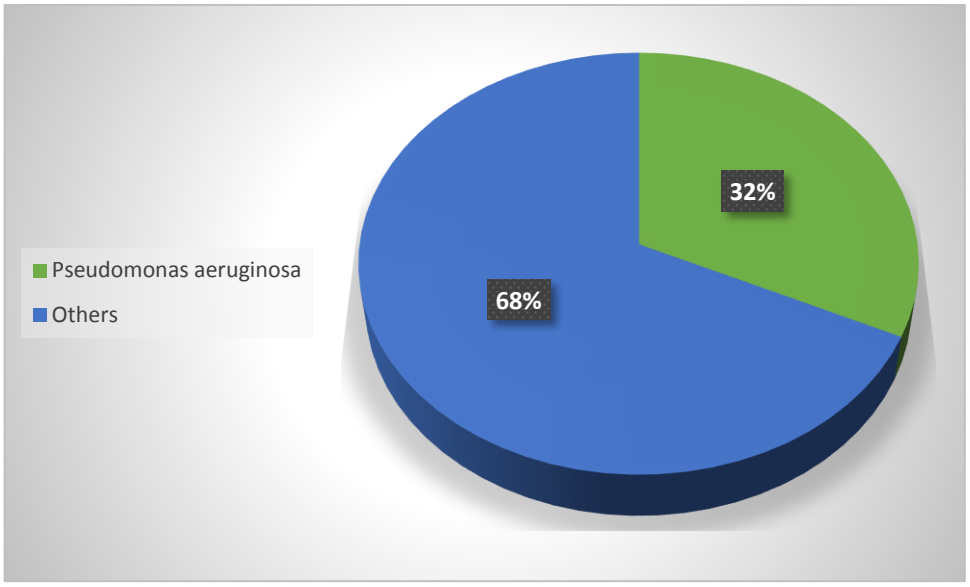
4.1 Bakteriyel İzolatlar

Bu çalışmada, 150 klinik örnek kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* izole ve identifiye edilmiştir. Bu örneklerin ekimi için nutrition agar, MacConkey agar, kanlı agar ve setrimid plakları kullanılmıştır. Bunların %83,3'ünde (125/150) bakteri kültürü pozitif, %16,7'sinde (25/150) ise negatif bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Pozitif ve negatif kültürlere dayalı dağıtılmış örnekler

Pozitif kültür örneklerinin sadece %32'si (40/125) *P. aeruginosa* pozitif olarak belirlendi ve %68'i (85/125) izolatlar diğer bakteri cinslerine aitti. (Şekil 4.2).



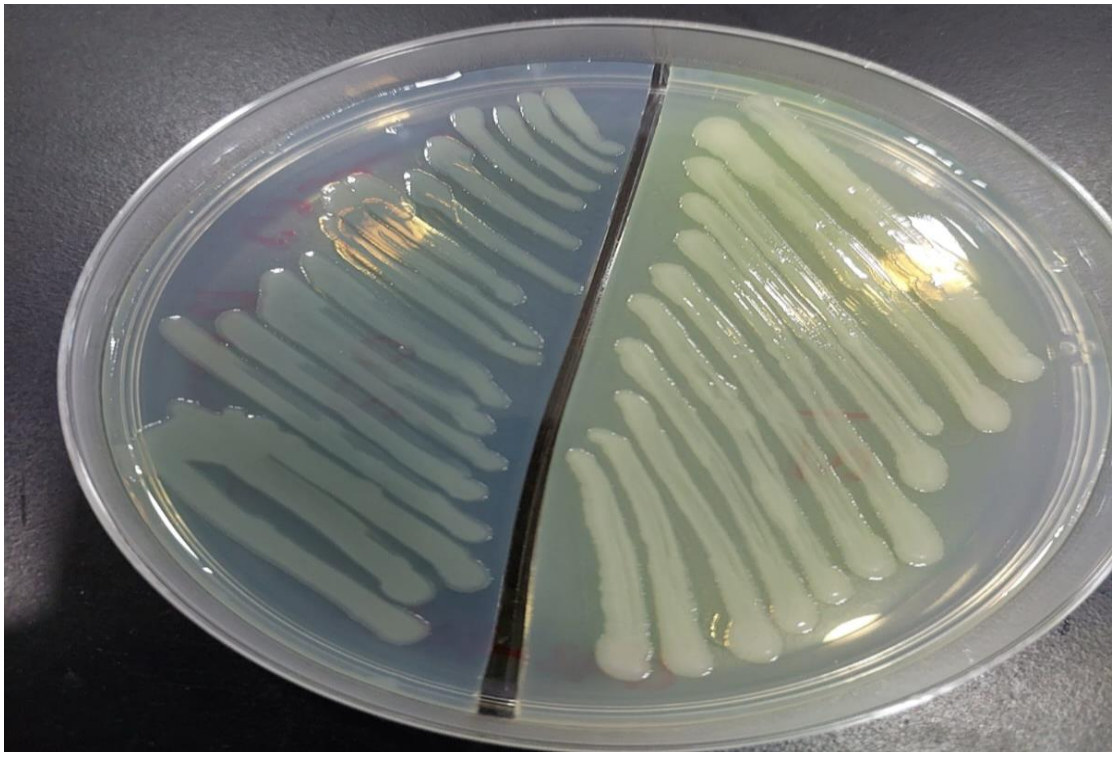
Şekil 4.2 Örneklerden elde edilen bakteri izolatları

4.2 *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karakterizasyonu ve Taranması

Bu çalışmadaki tüm *P. aeruginosa* bakteri izolatları Vitek II sistemi, morfolojik, mikroskobik ve biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmıştır.

4.3 Fenotipik Karakterizasyon ve Mikroskobik Tanımlama

Cetrimide agar besiyerindeki *P. aeruginosa* kolonileri Şekil 4.3'te görüldüğü gibi yeşilimsi mavi renkteydi.



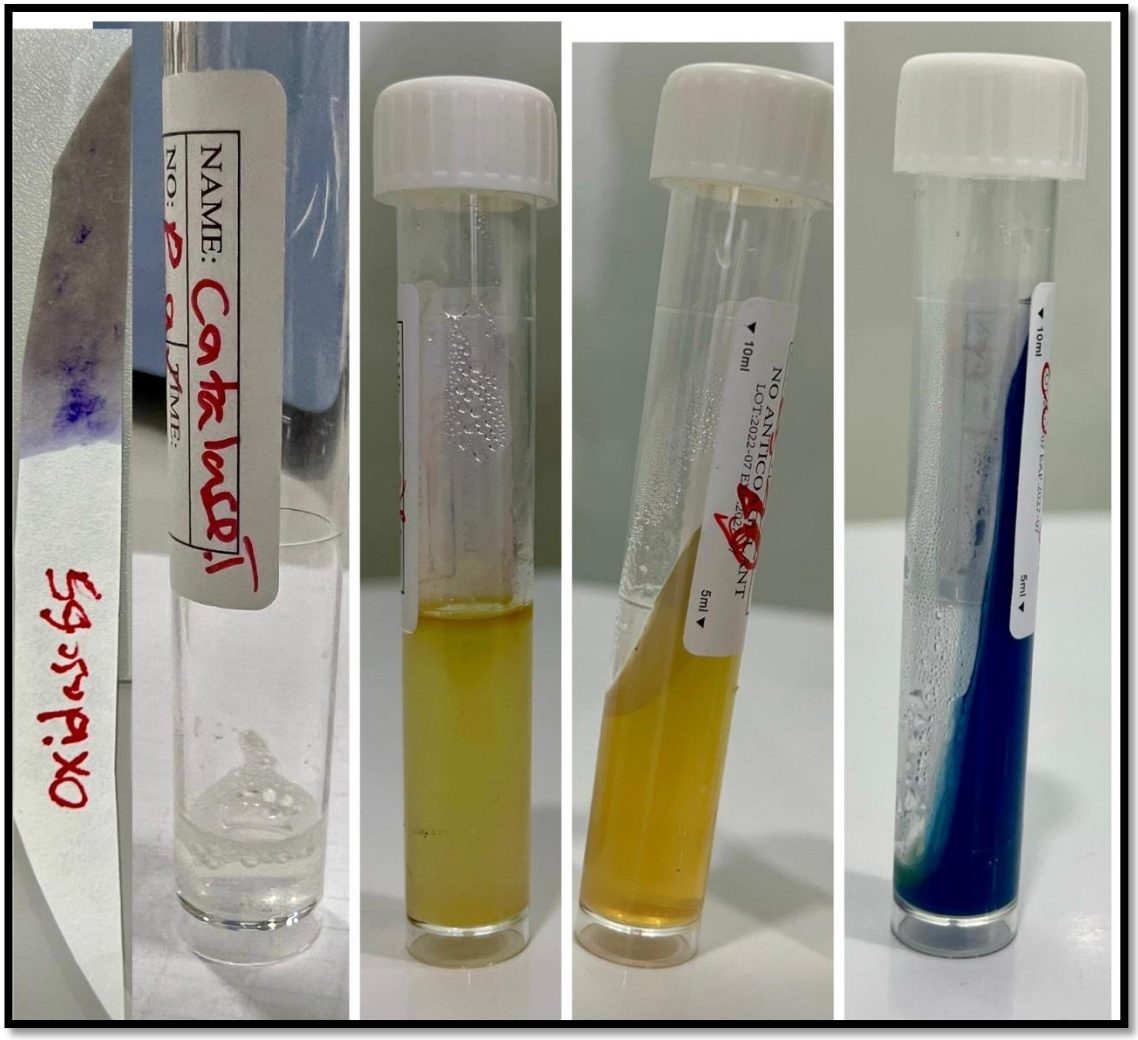
Şekil 4.3 Cetrimide agar üzerinde 37°C'de 24 saat boyunca gelişen *P. aeruginosa* kolonileri (mavimsi-yeşil)

4.4 Biyokimyasal Tanımlama

Hidrojen peroksit reaktifini su ve oksijene dönüştüren tüm *P. aeruginosa* suşları katalaz için pozitif test edilmiştir (Çizelge 4.1). *P. aeruginosa* bir hidrojen alıcısı olarak işlev gören sitokrom oksidaz enzimine sahiptir, bu nedenle oksidaz testini de geçmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.4).

Çizelge 4.1 *P. aeruginosa* için biyokimyasal testler

Bakteri	**Biyokimyasal test**				
	Katalaz	**Oksidaz**	**Indol**	**Sitrat**	**Üreaz**
P. aeruginosa	+	+	-	+	-



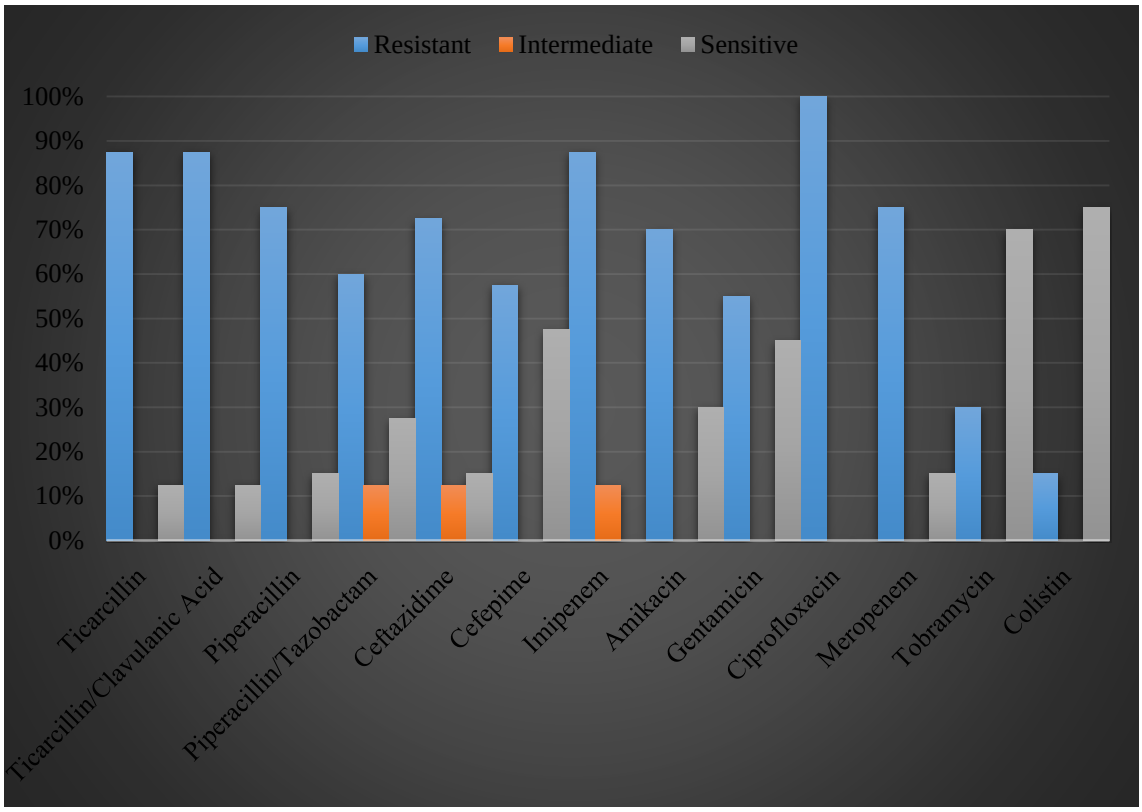
Şekil 4.4 Oksidaz (+), katalaz (+), indol (-), üreaz (-) ve sitrat kullanımı (+) testlerinin tümü *P. aeruginosa* için pozitif çıkmıştır

4.5 Vitek II Tanımlaması

P. aeruginosa izolatları için antimikrobiyal duyarlılık testi ve Vitek II sistemi tanı sonuçları, Ek 1'de gösterilmektedir.

4.6 Vitek II sistemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Tespiti

CLSI yorumlama kriterlerine göre, incelenen antibiyotiklere karşı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında direnç oranları şekil 4.5 ve çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Tikarsilin (TC) %87.5 (n=35), Tikarsilin/Klavulanik Asit (TCC) %87.5 (n=35), Piperasilin (PIP) %75 (n=30), Piperasilin/Tazobaktam (TAZ) %60 (n=24), Seftazidim (CAZ) %72.5 (n=29), Sefepim (CPM) %57.5 (n=23), İmipenem (IPM) %87.5 (n=35), Amikasin (AMK) %70 (n=28), Gentamisin (GEN) %55 (n=22), Siprofloksasin (CIP) %100 (n=40), Meropenem (MEM) %75 (n=30), Tobramisin (TOB) %30 (n=12), ve Kolistin (COL) % 25 (n=10).



Şekil 4.5 Klinik izolatlarda *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direnci

Çizelge 4.2 *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı

Antibiyotikler	Dayanıklılık (No. &%)	Orta düzey (No. &%)	Duyarlılık (No. &%)
Tikarsilin (TC)	35 (87.5%)	0 (0%)	5 (12.5%)
Tikarsilin/Klavulanik Asit (TCC)	35 (87.5%)	0 (0%)	5 (12.5%)
Piperasilin (PIP)	30 (75%)	0 (0%)	10 (25%)
Piperasilin/Tazobaktam (TAZ)	24 (60%)	5 (12.5%)	11 (27.5%)
Seftazidim (CAZ)	29 (72.5%)	5 (12.5%)	6 (15%)
Sefepim (CPM)	23 (57.5%)	0 (0%)	17 (42.5%)
İmipenem (IPM)	35 (87.5%)	5 (12.5%)	0 (0%)
Amikasin (AMK)	28 (70%)	0 (0%)	12 (30%)
Gentamisin (GEN)	22 (55%)	0 (0%)	18 (45%)
Siprofloksasin (CIP)	40 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Meropenem (MEM)	30 (75%)	0 (0%)	10 (25%)
Tobramisin (TOB)	12 (30%)	0 (0%)	28 (70%)
Kolistin (COL)	10 (25%)	0 (0%)	30 (75%)

Jasim *et al.* (2020) tarafından yapılan bir araştırmada, CIP direncinin %100 olduğunu göstermiştir ki bu bulgularımız ve Odoi *et al.* (2022) tarafından yapılan araştırma ile de tutarlıdır.

PIP direncinin %50 olduğunu tespit eden Saleh (2012) ve Ansari *et al.* (2015)'nın aksine, Mohammed (2012), Haran (2012) ve Shilba *et al.* (2015) PIP direncini sırasıyla %93,3, %88 ve %86,67 olarak bulmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, PIP direncini %35,8 olarak bulan Al-Doory (2012)'nin sonuçları ile çelişmektedir ve direnç oranı önemli bir farka işaret etmektedir.

Gailiene *et al.* (2007), *P. aeruginosa*'nın CAZ'a karşı direncinin %12,8 olduğunu tespit etmiştir. Bu bulgular, CAZ için sırasıyla %51,67 ve %61,6 direnç oranları tespit eden Al-Doory (2012) ve Shilba *et al.* (2015)'nın elde ettiği bulguların gerisinde kalmıştır.

Bu çalışmada, AMK'ya karşı direncin 28 (%70) olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, AMK için sırasıyla %82 ve %90 olarak tespit eden Nikkokar *et al.* (2013) ve Corehtash *et al.* (2015) ile uyumludur. Ancak, Haran (2012)'nin AMK direncinin %28 olduğu bulgusuyla çelişmektedir. Bu farklılıklar, mevcut çalışmada olduğu gibi, reçeteli ilaç kullanımının getirdiği seçici baskının ve direnç oranlarındaki artışın bir sonucu olabilir.

GEN, bu antibiyotiğin direnç oranının %60 olduğunu tespit eden Mohammed (2012) tarafından elde edilen bulgularla uyumludur ve *P. aeruginosa*'nın gentamisine %40 dirençli göründüğünü kaydeden Saleh (2012) tarafından elde edilen bulgularla çelişmektedir.

4.7 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm tespiti için altın standart olarak kabul edilen Doku Kültürü Plakası (TCP) Yöntemi (TCPM), test edilen 40 (%100) *P. aeruginosa* izolatının tamamının üretim boyunca pozitif biyofilm gelişimi sergilediğini ortaya koymuştur.

P. aeruginosa izolatları, çizelge 4.3'te gösterildiği üzere, 40 izolattan 24'ünün (%60) güçlü biyofilm oluşturucu, 14'ünün (%35) orta derecede biyofilm oluşturucu ve 2'sinin (%5) zayıf biyofilm oluşturucu olması nedeniyle yüksek biyofilm üretimi sergilemiştir.

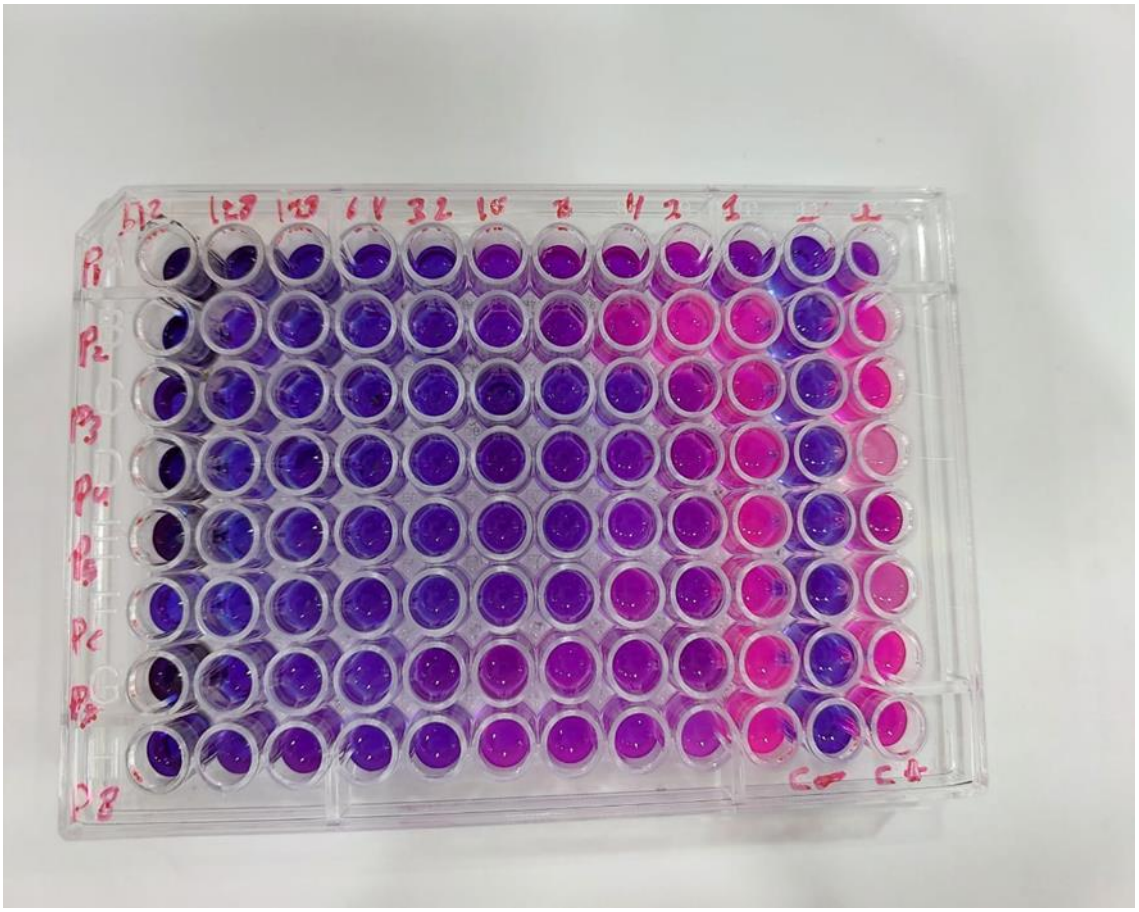
Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* aracılığıyla biyofilm oluşumu

Biyofilm (No. & %)		
Güçlü	**Orta**	**Zayıf**
24 (60%)	14 (35%)	2 (5%)

Bu çalışmanın bulguları Vasiljevi *et al.* (2014)'nın bulgularıyla örtüşmektedir. Farklı bir araştırmada, 57 *P. aeruginosa* izolatından 55'i (%96,5) biyofilm üreterek bu çalışmadakinden daha yüksek bir orana işaret etmiştir (Karballaei Mirzahosseini *et al.* 2020). Rajabi *et al.* (2022)'na göre, biyofilm üreten izolatların %21,8'i zayıf biyofilm, %30,9'u güçlü biyofilm ve %47,3'ü orta düzeyde biyofilm üretmiş, sadece 2'si hiç üretmemiştir (%3,5). Jabalameli *et al.* (2012)'nın çalışmasında suşların %96'sından fazlasının biyofilm ürettiği, bunların %47'sinin güçlü biyofilm, %26'sının orta biyofilm ve %22,9'unun zayıf biyofilm ürettiği bulunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının %92,4'ü biyofilm oluşumu sergilemiştir (Corehtash *et al.* 2015). Coğrafik konum, enfeksiyon kaynağı, numune boyutları ve biyofilm test tekniklerindeki farklılıklar, biyofilm üreten suşların sayısındaki ve üretim yoğunluğundaki değişikliklerin nedeni olabilir.

4.8 AgNP'lerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

Şekil 4.6, test edilen *P. aeruginosa* bakterilerine karşı AgNPs'in MİK'teki antibakteriyel aktivitesi sonuçlarını detaylandırmaktadır. (Şekil 4.6).

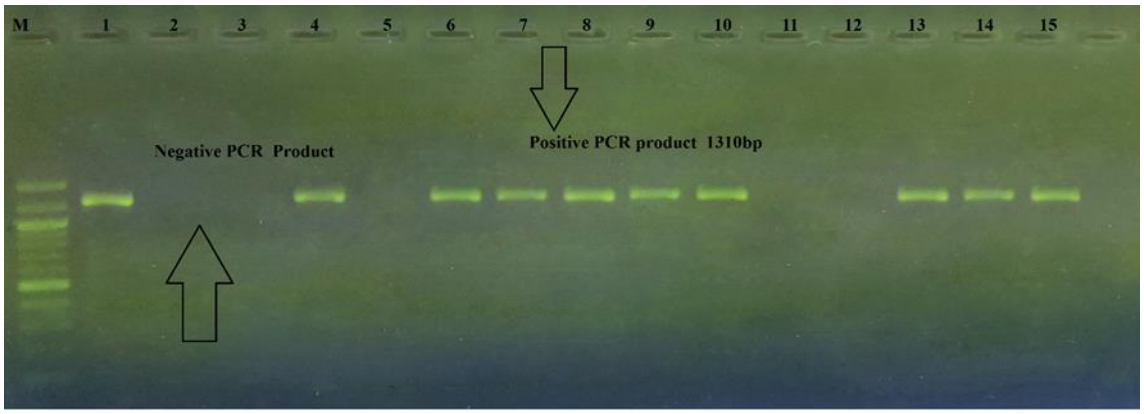


Şekil 4.6 Broth mikrodilüsyon yönteminde AgNPs'nin *P. aeruginosa*'ya karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi

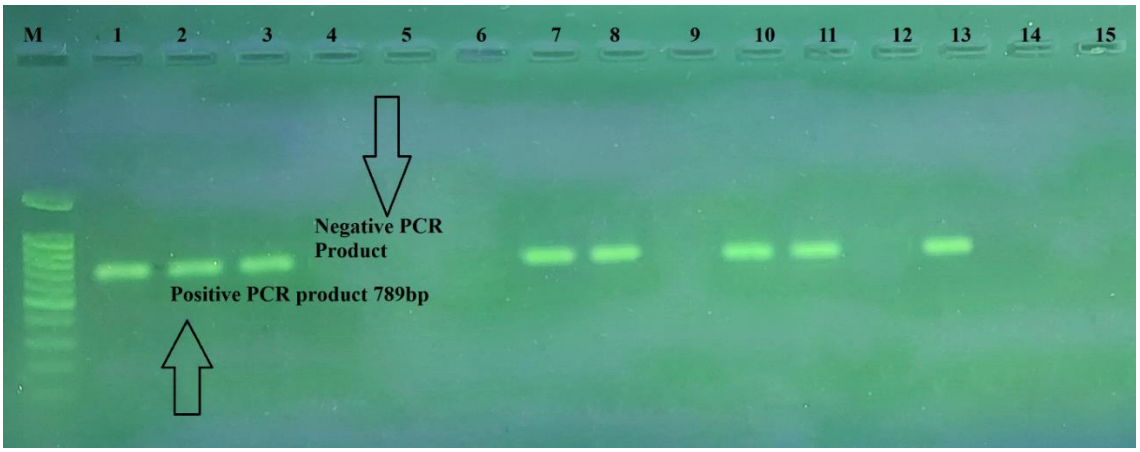
Shah *et al.* (2019)'nın çalışmasında *P. aeruginosa* suşları için MİK değerini 12,5µg/mL olarak bulurken, bu çalışmada *P. aeruginosa* suşları için MİK değeri 4-8µg/mL arasında bulunmuştur. Singh *et al.* (2018b)'nın çalışmasındaki MİK değerleri sırasıyla 6,25 ve 12,5µg/mL iken, Yuan *et al.* (2017) ve Meng *et al.* (2018), *P. aeruginosa* suşları üzerindeki aktivitelerini incelediklerinde sırasıyla 1,406 ve 1µg/mL MİK değerinin altında değerler bulmuşlardır.

4.9 Genlerin Amplifikasyonu, Sekanslama ve Gen İfadesi

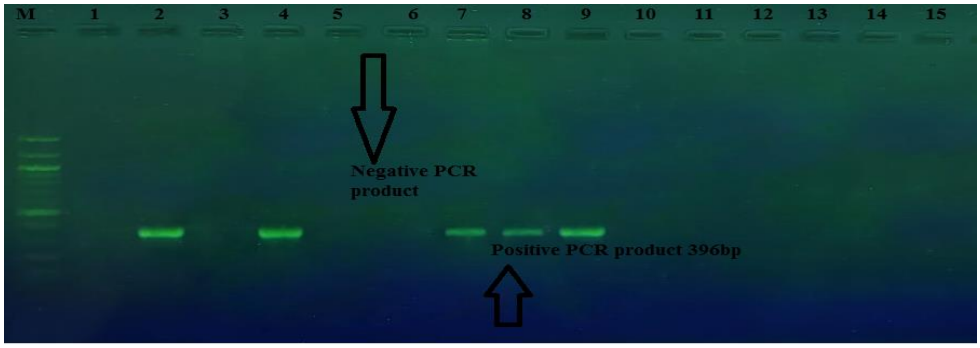
Her bir PCR reaksiyonu için 1,5 l genomik DNA kullanılmıştır. *algD*, *pelF* ve *pslD* genlerinin varlığını eş zamanlı olarak değerlendirmek için tipik bir PCR prosedürünün kullanımını göstermektedir (Şekil 4.7-4.9).



Şekil 4.7 *algD* geni için agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.8 *pelF* geni için agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.9 *pslD* geni için agaroz jel elektroforezi

algD, *pelF* ve *pslD* genleri PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve dizileme hizmeti için Macrogen Company Korea'ya gönderilmiştir. *algD*, *pelF* ve *pslD* genleri PCR yöntemiyle amplifiye edilmiştir ve dizileme hizmeti için Macrogen Company Korea'ya gönderilmiştir. *algD* geninin dizileme sonucunda, Grup 1'de amino asit E (Glutamik asit)/G (Glisin) konumunda bir geçiş T/C (1540660 nükleotit) ve tahmin edilen etki Missense olarak bulunmuştur, ayrıca amino asit değişikliği R (Arjinin)/L (Lösin) konumunda bir transversiyon C/A (1540783 nükleotit) ve etki Missense olarak bulunmuştur. Grup 2'de ise üç geçiş G/A ve iki T/C (sırasıyla 1541057, 1541167 ve 1541168 nükleotit konumlarında) amino asit L (Lösin)/L (Lösin), sessiz değişim ve K (Lizin)/G (Glisin) olarak bulunmuştur, ayrıca amino asit değişikliği I (Izolösin)/F (Fenilalanin) konumunda bir transversiyon T/A (1541336 nükleotit) ve etki Missense olarak bulunmuştur.

pelF geninin analizi Grup 1 için iki Transversiyon T/A ve T/G ve amino asit dönüşümü M (Metiyonin)/ K (Lizin) lokasyonda (2159111nükleotid) Missense etkisi, ayrıca G (Glisin)/ G (Glisin) lokasyonda (2159160 nükleotid) Silent etkisi gösterirken, grup 2 iki Transition T/C göstermiştir, L (Lösin)/P (Prolin) ve E (Glutamik asit)/K (Lizin) amino asitlerinin sırasıyla (2159244 ve 2159437 nükleotid) lokasyonlarında G/A ve G/A Öngörülen etki Missense, ayrıca (2159349 nükleotid) lokasyonunda bir Transversiyon C/G amino asit değişimi G (Glisin)/G (Glisin) etki Silent olmuştur.

pslD geni için de bir Transisyon A'dan G'ye (3065606 nükleotit konumunda) ve amino asit V (Valin)/A (Alanin) değişikliği olduğu, ayrıca bir transversiyon T'den A'ya

(3065511 nükleotit konumunda) ve amino asit değişikliği M (Metiyonin)/L (Lösin) olduğu gözlenmiştir. Grup 2 ise bir T/C değişikliği (3065588 nükleotit konumunda) ile amino asit değişikliği Q (Glutamin)/R (Arjinin) göstermiştir. Gen Bankasından yapılan araştırmada, tüm genlerin NCBI'deki genlerle %99 uyumlu olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Gen polimorfizmlerinin gösterilme şekli

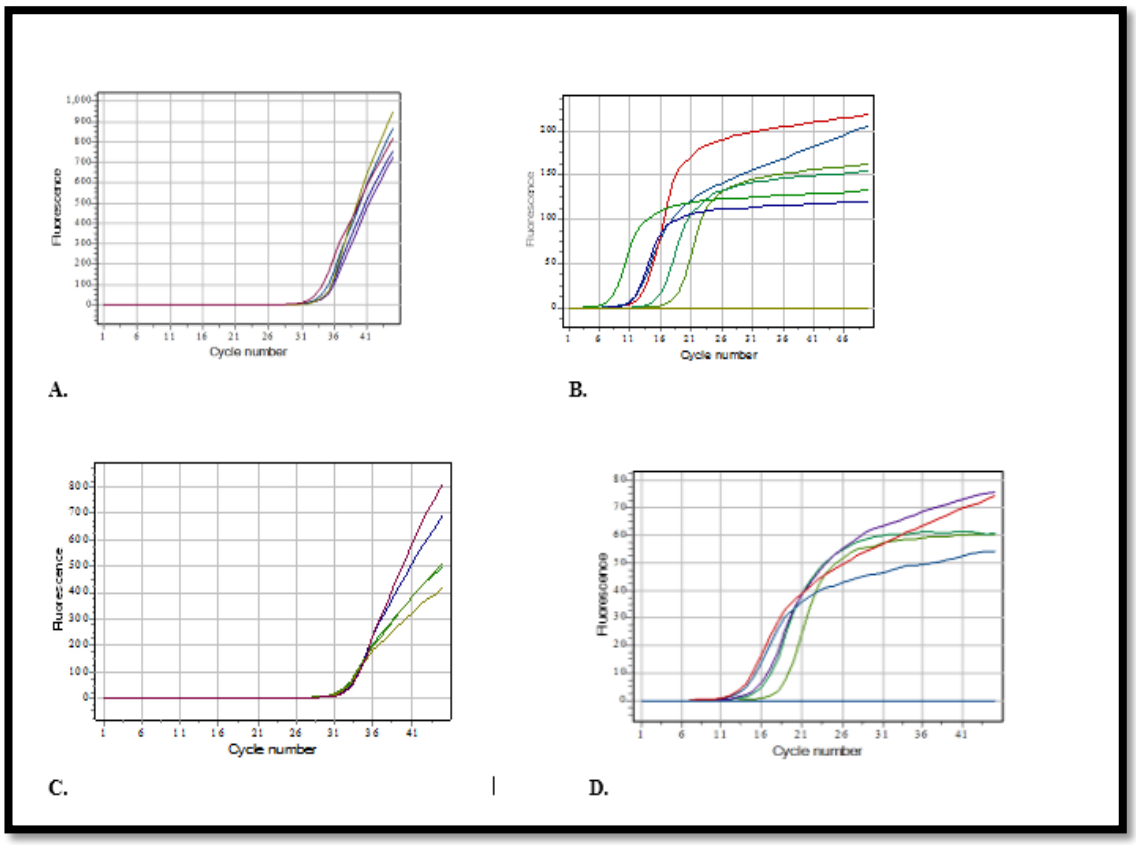
Grup Numarası	İkame türü	Lokasyon	Nükleotid	Amino asit değişimi	Öngörülen etki	Karşılaştırmalı Sekans Kimliği
1	Geçiş	1540660	T/C	E (Glutamic acid)/G (Glycine)	Missense	ID: LR130537.1 gene= "*algD*"
	Dönüşüm	1540783	C/A	R (Arginine)/ L (Leucine)	Missense	
2	Geçiş	1541057	G/A	L (Leucine)/ L (Leucine)	Silent	ID: LR130537.1 gene= "*algD*"
	Geçiş	1541167	T/C	K (Lysine)/ G (Glycine)	Missense	
	Geçiş	1541168	T/C	K (Lysine)/ G (Glycine)	Missense	
	Dönüşüm	1541336	T/A	I(Isoleucine)/ F (Phenylalanine)	Missense	
1	Dönüşüm	2159111	T/A	M (Methionine)/ K (Lysine)	Missense	ID: CP106784.1 gene= "*pelF*"
	Dönüşüm	2159160	T/G	G (Glycine)/ G (Glycine)	Silent	
2	Geçiş	2159244	T/C	L (Leucine)/ P (Proline)	Missense	ID: CP106784.1 gene= "*pelF*"
	Dönüşüm	2159349	C/G	G (Glycine)/ G (Glycine)	Silent	
	Geçiş	2159437	G/A	E (Glutamic acid)/ K (Lysine)	Missense	
1	Dönüşüm	3065511	T/A	M (Methionine)/ L (Leucine)	Missense	ID: CP050335.1 gene= "*psID*"
	Geçiş	3065606	A/G	V (Valine)/ A (Alanine)	Missense	
2	Geçiş	3065588	T/C	Q (Glutamine)/ R (Arginine)	Missense	ID: CP050335.1 gene= "*psID*"

Bu araştırmada *algD* geni *P. aeruginosa* izolatlarında daha yaygındır. Bu nedenle, nanopartiküllerin (AgNPs) *P. aeruginosa* izolatları üzerindeki etkileri hem öncesinde hem de sonrasında RT-PCR ile incelenmiştir. AgNP'lerle muamele öncesi ve

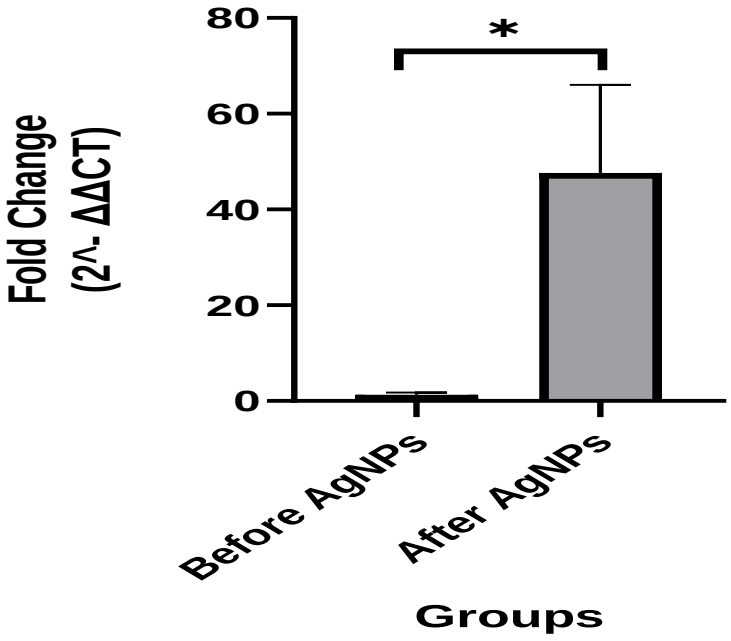
sonrasında *algD* ekspresyonunun ortalama ± SE seviyesi sırasıyla ΔCT (23,72±0,85) ve (18,32±0,61) iken, ΔΔCT (0,32±0,85) ve (-5,1±0,61) ve ayrıca değişim (1,30±0,48) ve (47,61±18,43) olup P değeri (0,001 ve 0,036) anlamlı farklılık göstermektedir (Çizelge 4.5, Şekil 4.10-4.11).

Çizelge 4.5 *algD* geninin ΔCt ve ΔΔCt ortalama ve aralık sonuçları

algD	**ΔCT (Ortalama ±SE)**	**P-değeri**	**ΔΔCT (Ortalama ±SE)**	**P- değeri**	**Değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$) Ortalama ±SE**	**P-değeri**
AgNPs Öncesi	23.72 ± 0.85	0.001	0.32 ± 0.85	0.001	1.30 ± 0.48	0.036
AgNPs Sonrası	18.32 ± 0.61		-5.1 ± 0.61		47.61±18.43	



Şekil 4.10 *algD* (A: AgNPs öncesi C: AgNPs sonrası) cDNA ürünü ve 16S rRNA referans geninin (B: AgNPs öncesi D: AgNPs sonrası) genlerinin amplifikasyonu



Şekil 4.11 *algD* geninin katlanma değişimi

Gümüş nanopartiküller (AgNPs), yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve kütle formlarına kıyasla farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle, çeşitli patojenlere karşı yeni antibakteriyel etkinlik göstermiştir.

AgNP'lerin planktonik bakteri hücrelerini, hücresel morfolojinin bozulması, enzim deaktivasyonu, DNA replikasyonunun engellenmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşturulması ve oksidatif stresin indüklenmesi gibi çeşitli yöntemlerle öldürdüğü düşünülmektedir (Morones-Ramirez *et al.* 2013, Dizaj *et al.* 2014).

Klinik ortamlarda gram-negatif bakteriler arasında gümüş direnci birçok araştırma tarafından gözlemlenmiştir ve gümüşün çeşitli bakteri türlerinde direnç ürettiği kanıtlanmıştır (Lansdown and Williams 2007, Davies and Davies 2010).

Bu, Ag'nin dolaylı bir şekilde bir seçilim baskısı uygulayabileceğini göstermektedir ancak antibiyotik çapraz direnciyle ilgili endişeler devam etmektedir. Ag ve geniş

spektrumlu ß-laktamlara karşı direnç, protein porin eksikliği tarafından neden olunan geçirgenlik eksikliği gibi ortak bir nedene sahip olabilir (Pal *et al.* 2017).

P. aeruginosa'da biyofilm matrisini oluşturan *algD, pelF* ve *pslD* genleri bulunmaktadır. Bu çalışmada, 40 farklı *P. aeruginosa* suşu biyofilm oluşturma yetenekleri açısından test edilmiş ve bunların %96.2'si biyofilm üreten suşlar olarak belirlenmiştir. (Alonso *et al.* 2020).

Bu araştırmadan elde edilen PCR amplifikasyon sonuçlarına göre, *algD, pelF* ve *pslD* genleri *P. aeruginosa* izolatlarının sırasıyla %50, %40 ve %25'inde bulunmuştur. Bu bulgu Rajabi *et al.* (2022)'nın çalışmasıyla tutarlıdır. Banar *et al.* (2016) tarafından yapılan bir araştırmada, 57 *P. aeruginosa* suşu içerisinde *algD* (%100), *pelF* (%93) ve *pslD* (%54.6) genlerinin sıkça bulunduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, Zaranza *et al.* (2013), Strunecka *et al.* (2016) ve Namuq *et al.* (2019) tarafından yapılan araştırmalar, *algD* geninin sırasıyla bireylerin %39'unda, %87,5'inde ve %98'inde bulunduğunu ortaya koymuştur.

Biyofilm oluşturan bakteri suşları ciddi hastalıkların potansiyel kaynağıdır, bununla birlikte yönetilmeleri zor ve zaman alıcıdır. Çalışmalar, pel gen kümesinin *P. aeruginosa* izolatlarında korunduğunu göstermektedir. Diğer bölgelerde *pslD* ve *pelF* genlerinin baskınlığı olmamasına rağmen, bu izolatların yayılması durumunda halk sağlığına tehdit oluşturabilir (Zhou *et al.* 2018). Bununla birlikte, tüm izolatlar *psl* genleri içermemektedir ve bu da bulgularımızla kısmen tutarlıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

- Bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitesi tespit edilirken, sonuçlar tüm *P. aeruginosa* izolatlarının değişen derecelerde biyofilm ürettiğini göstermiştir.

- Tüm bakteri izolatları sifrofloksasin (CIP) antibiyotiğine direnç göstermiş ve çoğunluğu kolistin (COL) antibiyotiğine duyarlı bulunmuştur.

- Gümüş nanopartiküller, incelenen bakteri izolatları tarafından üretilen bazı virülans faktörlerini inhibe etme kabiliyetlerini göstermiştir.

5.2 Öneriler

- Hastanelerde ilaç duyarlılığı incelemesinin benimsenmesi ve çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasını önlemek için antibiyotik kullanımının gerekli olduğu durumlarda kullanılması vurgulanmalıdır.

- Gümüş nanopartiküllerin diğer bakteri türleri üzerindeki etkisinin incelenmesi gerekmektedir.

- Bağışıklık sistemi ilişkisini incelemek ve bakterilerin bu sistem üzerindeki etkisini incelemek için immünolojik yöntemler kullanılmalıdır.

- Hastaların kan örneklerinde virülans faktörlerinin ekspresyonunu belirlemek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abdelaziz, A. A., Elbanna, T. E., Sonbol, F. I., Gamaleldin, N. M. and El Maghraby, G. M. 2015. Optimization of niosomes for enhanced antibacterial activity and reduced bacterial resistance: in vitro and in vivo evaluation. Expert Opinion on Drug Delivery, 12(2): 163-180.

Al-Dahmoshi, H. O. M. 2013. Genotypic and phenotypic investigation of alginate biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn victims in Babylon, Iraq. Science Journal of Microbiology, Volume 2013, Article ID sjmb-233, 8 Pages.

Al-Doory, I. A. H. 2012. A diagnostic study of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contaminated burns and wounds using cultural and molecular methods. MSc. Thesis, University of Baghdad, 74 page, Iraq.

Ali, E. S., Sharker, S. M., Islam, M. T., Khan, I. N., Shaw, S., Rahman, M. A., Uddin, S. J., Shill, M. C., Rehman, S., Das, N. and Ahmad, S. 2021. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives. In Seminars in cancer biology. Academic Press, 69: 52-68.

Alonso, B., Fernández-Barat, L., Di Domenico, E. G., Marín, M., Cercenado, E., Merino, I. and Guembe, M. 2020. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. BMC Infectious Diseases, 20: 1-8.

Ansari, A., Salman, S. M. and Yaqoob, S. 2015. Antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated at Era s Lucknow Medical College and Hospital, Lucknow, India. Int J Curr Microbiol App Sci, 1: 48-58.

Bail, L., Ito, C. A. S., Arend, L. N. V. S., da Silva Nogueira, K. and Tuon, F. F. 2022. Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing Enterobacterales. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 102(1): 115568.

Bakhat, S., Taj, Y. and Hanif, F. 2019. Carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: A review. Journal of Bahria University Medical and Dental College, 9(2): 141-146.

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

Bavaro, D. F., Belati, A., Diella, L., Stufano, M., Romanelli, F., Scalone, L. and Saracino, A. 2021. Cefiderocol-based combination therapy for "difficult-to-treat" Gram-negative severe infections: Real-life case series and future perspectives. Antibiotics, 10(6): 652.

Botelho, J., Cazares, A. and Schulenburg, H. 2023. The ESKAPE mobilome contributes to the spread of antimicrobial resistance and CRISPR-mediated conflict between mobile genetic elements. Nucleic Acids Research, 51(1): 236-252.

Botelho, J., Grosso, F. and Peixe, L. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*–Mechanisms, epidemiology and evolution. Drug Resistance Updates, 44: 100640.

Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. Trends in Microbiology, 19(8): 419-426.

Cao, D., Sun, X., Li, Q., Natan, A., Xiang, P. and Zhu, H. 2020. Lithium dendrite in all-solid-state batteries: Growth mechanisms, suppression strategies, and characterizations. Matter, 3(1): 57-94.

Carroll, K. C., Mietzner, T. A., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mitchell, T. G., Sakanari, J. A., McKerrow, J. H. and Detrick, B. 2016. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. McGraw-Hill Education, 324 p., U.S.A.

Chan, Y. S., Mashitah M. D. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Schizophyllum* commune and in-vitro antibacterial and antifungal activity studies. J. Phys. Sci., 24(2): 83–96.

Cillóniz, C., Dominedò, C. and Torres, A. 2019. Multidrug resistant gram-negative bacteria in community-acquired pneumonia. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine, 459-475.

Corehtash, Z. G., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H. and Aznaveh, A. M. 2015. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Jundishapur J Microbiol, 8(10): e22345.

Costa, G. A., Rossatto, F. C., Medeiros, A. W., Correa, A. P. F., Brandelli, A., Frazzon, A. P. G. and MOTTA, A. D. S. 2018. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and Enterococcus faecalis. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 90: 73-84.

Davies, J. and Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3): 417-433.

Derakhshan, S., Rezaee, A. and Sh, M. 2021. Relationship between type III secretion toxins, biofilm formation, and antibiotic resistance in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Инфекция и иммунитет, 11(6): 1075-1082.

Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H. and Adibkia, K. 2014. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. Mat. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 44: 278–284.

Djuikoue, C. I., Djouela Djoulako, P. D., Same Njanjo, H. V., Kiyang, C. P., Djantou Biankeu, F. L., Guegang, C. and Jeannot, K. 2023. Phenotypic characterization and prevalence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Six Health Facilities in Cameroon. BioMed, 3(1): 77-88.

Dorman, C. J. 2020. Structure and function of the bacterial genome. John Wiley & Sons.

El-sayed, H. and Fahmy, Y. 2021. Correlation between biofilm formation and multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes and Infectious Diseases, 2(3): 541-549.

Fathima, A., Arafath, Y., Hassan, S., Prathiviraj, R., Kiran, G. S. and Selvin, J. 2023. Microbial biofilms: A persisting public health challenge. In Understanding Microbial Biofilms. Academic Press, 291-314.

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

Fritsche, T. R., Swoboda, S. E., Olson, B. J., Moore, F. M., Meece, J. K. and Novicki, T. J. 2011. Evaluation of the Sensititre@ ARIS 2X and Vitek@ 2 automated systems for identification of bacterial pathogens recovered from veterinary specimens. LACROSSE. Univ. Wisconsin.

Fusco, A., Coretti, L., Savio, V., Buommino, E., Lembo, F. and Donnarumma, G. 2017. Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains. International Journal of Molecular Sciences, 18(2): 414.

Gailiene, G., Pavilonis, A. and Kareiviene, L. 2007. The peculiarities of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to antibiotics and prevalence of serogroups. Medicina, 43(1): 36-42.

Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and Disease, 67(3): 159173.

Ghasemian, A., Rizi, K. S., Vardanjani, H. R. and Nojoomi, F. 2018. Prevalence of clinically isolated metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, coding genes, and possible risk factors in Iran. Iranian Journal of Pathology, 13(1): 1-9.

Haran, O. H. 2012. Detection of β-lactam resistance genes isolated from some clinical infections. MSc. Thesi, University of Al-Qadisiya, 76 page, Iraq.

Holban, A. M., Chifiriuc, M. C., Cotar, A., Bleotu, C., Grumezescu, A. M. and Banu, O. 2013. Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitalacquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. Romanian Biotechnological Letters, 18(6): 8843-8854

Huse, H. K., Kwon, T., Zlosnik, J. E., Speert, D. P., Marcotte, E. M. and Whiteley, M. 2010. Parallel evolution in *Pseudomonas aeruginosa* over 39,000 generations in vivo. mBio, 1: 4.

Hussain, A., Satti, L., Hanif, F., Zehra, N. M., Nadeem, S., Bangash, T. M. and Peter, A. 2019. Typhoidal *Salmonella* strains in Pakistan: an impending threat of extensively drug-resistant *Salmonella Typhi*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38: 2145-2149.

Ito, C. A. S., Bail, L., Arend, L. N. V. S., Silva, K. O., Michelotto, S. S., Nogueira, K. D. S. and Tuon, F. F. 2021. Evaluation of microscan walkaway for determination of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam susceptibility in carbapenem-resistant Gram-Negative Bacilli. Journal of Clinical Microbiology, 59(12): e01536-21.

Jabalameli, F., Mirsalehian, A., Khoramian, B., Aligholi, M., Khoramrooz, S. S., Asadollahi, P. and Emaneini, M. 2012. Evaluation of biofilm production and

characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. Burns, 38(8): 1192-1197.

Jani, M. and Azad, R. K. 2021. Discovery of mosaic genomic islands in *Pseudomonas spp*. Archives of Microbiology, 203(5): 2735-2742.

Jasim, S. A., Feisal, T. and Huda, L. 2020. A Review: Antimicrobial agent for *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iraqi patients. Systematic Reviews in Pharmacy, 11(12): 1117-1125.

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

Karballaei Mirzahosseini, H., Hadadi-Fishani, M., Morshedi, K. and Khaledi, A. 2020. Meta-analysis of biofilm formation, antibiotic resistance pattern, and biofilm-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. Microbial Drug Resistance, 26(7): 815-824.

Katsipis, G. and Pantazaki, A. A. 2023. Serrapeptase impairs biofilm, wall, and phospho-homeostasis of resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol, 107: 1373-1389.

Khalil, M. A., El Maghraby, G. M., Sonbol, F. I., Allam, N. G., Ateya, P. S. and Ali, S. S. 2021. Enhanced efficacy of some antibiotics in presence of silver nanoparticles against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wound infections. Frontiers in Microbiology, 12: 648560.

Killough, M., Rodgers, A. M. and Ingram, R. J. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. Vaccines, 10(7): 1100.

Kumar, A., Thotakura, P. L., Tiwary, B. K. and Krishna, R. 2016. Target identification in *Fusobacterium nucleatum* by subtractive genomics approach and enrichment analysis of host-pathogen protein-protein interactions. BMC Microbiology, 16: 1-12.

Lansdown, A.B.G. and Williams, A. 2007. Bacterial resistance to silver in wound care and medical devices. Journal of Wound Care, 16(1): 15-19.

Laverty, G., Gorman, S. P. and Gilmore, B. F. 2014. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. Pathogens, 3(3): 596-632. .

Li, X. Z. and Plésiat, P. 2016. Antimicrobial drug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications, pp.359-400.

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

Maurice, N. M., Bedi, B. and Sadikot, R. T. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 58(4): 428-439.

Mehra, S., Tyagi, C., Dudha, N., Reddy, Y. P., Manjhi, J., Sharma, V. K. and Tomar, L. K. 2021. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from wound infection. Arab Gulf Journal of Scientific Research, 39(3): 221-235.

Meng, Q., Wang, A., Hua, H., Jiang, Y., Wang, Y., Mu, H. and Sun, K. 2018. Intranasal delivery of Huperzine a to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease. International Journal of Nanomedicine, 13: 705.

Migiyama, Y., Yanagihara, K., Kaku, N., Harada, Y., Yamada, K., Nagaoka, K. and Kohno, S. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among immunocompetent and immunocompromised patients: Relation to initial antibiotic therapy and survival. Japanese Journal of Infectious Diseases, 69(2): 91-96.

Mitov, I., Strateva, T. and Markova, B. 2010. Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 588-595.

Mohammed, A. S. 2012. Phenotypic and genotypic detection of Metalloβ-Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* from local isolates. Ph.D. Thesis, University of Babylon, 142 page, Iraq.

Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C. and Lau, G. W. 2021. An organ system-based synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Virulence, 12(1): 1469-1507.

Morones-Ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S. and Collins, J. J. 2013. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. Sci. Transl. Med, 5: 190ra81.

Namuq, A. O., Ali, K. O. M. and Al-Ani, A. H. 2019. Correlation between biofilm formations, 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.

Nikkokar, I., Tishayar, A., Flakiyan, Z., Alijani, K., Rehana-Banisaeed, S., Nordmann, P., Naas, T. and Poirel, L. 2013. Global spread of Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae. Emerg. Infect. Dis, 17: 1791–1798.

O'Toole, G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments, 47: e2437.

Odoi, H., Boamah, V. E., Duah Boakye, Y., Dodoo, C. C. and Agyare, C. 2022. Sensitivity patterns, plasmid profiles and clonal relatedness of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the Ashanti region, Ghana. Environmental Health Insights, 16: 11786302221078117.

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

Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. J. and Hobman, J. L. 2017. Metal resistance and its association with antibiotic resistance. Advances in Microbial Physiology, 70: 261-313.

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

Patel, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Snoussi, M. and Adnan, M. 2022. *Lactiplantibacillus* plantarum-derived biosurfactant attenuates quorum sensing-mediated virulence and biofilm formation in

Pseudomonas aeruginosa and Chromobacterium violaceum. Microorganisms, 10(5): 1026.

Popović, R., Tomić, Z., Tomas, A., Anđelić, N., Vicković, S., Jovanović, G. and Sabo, A. 2020. Five-year surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of Gram-negative bacteria at an intensive care unit in Serbia. Journal of Chemotherapy, 32(6): 294-303.

Portillo-Ledesma, S., Li, Z. and Schlick, T. 2023. Genome modeling: From chromatin fibers to genes. Current Opinion in Structural Biology, 78: 102506.

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L. and Wu, M. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1): 199.

Rajabi, H., Salimizand, H., Khodabandehloo, M., Fayyazi, A. and Ramazanzadeh, R. 2022. Prevalence of *algD, pslD, pelF, Ppgl*, and PAPI-1 Genes Involved in Biofilm Formation in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. BioMed Research International, 22: 1716087.

Ratkai, C. 2011. Characterization of medically important *Pseudomonas aeruginosa* isolates. M.Sc. Thesis, Faculty of Medicine. University of Szeged, 113 page, Szeged.

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

Riquelme, S. A., Liimatta, K., Lung, T. W. F., Fields, B., Ahn, D., Chen, D. and Prince, A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation. Cell Metabolism, 31(6): 1091-1106.

Rónavári, A., Kovács, D., Igaz, N., Vágvölgyi, C., Boros, I. M., Kónya, Z. and Kiricsi, M. 2017. Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. International Journal of Nanomedicine, 12: 871.

Ruiz Martínez, L., López Jiménez, L., d'Ostuni, V., Fusté i Domínguez, E., Vinuesa Aumedes, T. and Viñas, M. 2011. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. International Microbiology, 14(1): 51-58.

Ryan, T. P. 2011. Examining the role of specific *Pseudomonas aeruginosa* infection in a zebra fish model of cystic fibrosis. Msc Thesis, The University of Maine May, 115 page, United States.

Saleh, R. H. 2012. Immunological and molecular Study on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in Babylon Province. Ph.D. Thesis, University of Babylon, 144 page, Iraq.

Shaan, L. G. and Robert, E. W. 2013. Hancock ournaliiste. Org Fast Review, Publishing and Printing International Journal (US Published). Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Federation of European Microbiologica, 67(3):159-173.

Shah, S., Gaikwad, S., Nagar, S., Kulshrestha, S., Vaidya, V., Nawani, N. and Pawar, S. 2019. Biofilm inhibition and anti-quorum sensing activity of phytosynthesized silver nanoparticles against the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Biofouling, 35(1): 34-49.

Shilba, A. A., Al-Azzawi, R. H and Al-Awadi, S. J. 2015. Dissemination of Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* among burn patients in Karbala Province/ Iraq. Iraqi Journal of Science, 56(3A): 1850- 1857.

Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P. and Kumar, P. 2018a. 'Green'synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. Journal of Nanobiotechnology, 16(1): 1-24.

Singh, P., Pandit, S., Garnaes, J., Tunjic, S., Mokkapati, V. R. S. S., Sultan, A. and Mijakovic, I. 2018b. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from Cannabis sativa (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. International Journal of Nanomedicine, 13: 3571-3591.

Strunecka, A., Blaylock, R. L. and Strunecky, O. 2016. Fluoride, aluminum, and aluminofluoride complexes in pathogenesis of the autism spectrum disorders: A possible role of immunoexcitotoxicity. Journal of Applied Biomedicine, 14(3): 171-176.

Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J. and Du, Y. 2011. The Staphylococcal nucclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. Science China Life Sciences, 54(9):863-869.

Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H. and Tasca Ribeiro, V. S. 2022. Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa biofilm: A Review. Pathogens, 11(3): 300.

Turkina, M. V. and 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.

Veesenmeyer, A., Hauser, J., and Lisboa, R. 2009. Pseudomonas aeruginosa Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. NIH Public Access, 37(5): 1777-1786.

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

Williams, B. J., Dehnbostel, J. and Blackwell, T. S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. Respirology, 15: 1037-1056.

Wood, S. J., Kuzel, T. M. and Shafikhani, S. H. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. Cells, 12(1): 199.

World Health Organization, 2017. Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of new Antibiotics for Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis (No. WHO/EMP/IAU/2017.12). Geneva: World Health Organization.

Yang, J., Wang, Q., Wang, C., Yang, R., Ahmed, M., Kumaran, S. and Li, B. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* synthesized silver nanoparticles inhibit cell proliferation and induce ROS mediated apoptosis in thyroid cancer cell line (TPC1). Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 48(1): 800-809.

Yuan, Y. G., Peng, Q. L. and Gurunathan, S. 2017. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. International Journal of Molecular Sciences, 18(3): 569.

Zaranza, A. V., Morais, F. C., do Carmo, M. S., de Mendonça Marques, A., Andrade-Monteiro, C., Ferro, T. F. and Figueiredo, P. D. M. S. 2013. Antimicrobial susceptibility, biofilm production and adhesion to HEp-2 cells of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 4(1): 98-106.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W. and Gurunathan, S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International Journal of Molecular Sciences, 17(9): 1534.

Zhang, Y., Cheng, P., Wang, S., Li, X., Peng, L., Fang, R. and Chen, H. 2022. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by the mouse antimicrobial peptide CRAMP. Veterinary Research, 53(1): 80.

Zhou, X., Zhang, N., Xia, L., Li, Q., Shao, J., Shen, Q. and Zhang, R. 2018. ResDE two-component regulatory system mediates oxygen limitation-induced biofilm formation by Bacillus amyloliquefaciens SQR9. Applied and Environmental Microbiology, 84(8): e02744-17.

EKLER

EK 1. Vitek II sistem raporu

EK 2. RNA ekstraksiyon adımları

EK 2. Etik kurul onayı

EK 1. Vitek II sistem raporu

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed December 29, 2022 5:05:46 PM CST

Patient Name: دكتور عمر , .
Location: مكتب المصدر العلمي
Lab ID: 34580

Patient ID: 34580
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: 46

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 11.90 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Meropenem	8	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Amikacin	32	*R
Piperacillin	>= 128	R	Gentamicin	4	S
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Ceftazidime	32	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefepime	<= 1*	*R	Colistin	2	S
Imipenem	>= 16	R			

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction

Page 1 of 1

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed December 29, 2022 5:05:47 PM CST

Patient Name: دكتور عمر , .
Location: مكتب المصدر العلمي
Lab ID: 34581

Patient ID: 34581
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: 40

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 12.62 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Meropenem	>= 16	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Piperacillin	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Ceftazidime	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefepime	>= 64	R	Colistin	1	S
Imipenem	>= 16	R			

AES Findings	
Confidence:	Consistent

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed December 29, 2022 5:05:48 PM CST

Patient Name: دكتور عمر , .
Location: مكتب المصدر العلمي
Lab ID: 34582

Patient ID: 34582
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: 23

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 12.62 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Meropenem	>= 16	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Piperacillin	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Ceftazidime	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefepime	>= 64	R	Colistin	2	S
Imipenem	>= 16	R			

AES Findings	
Confidence:	Consistent

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed December 29, 2022 5:05:49 PM CST

Patient Name: دكتور عمر , .
Location: مكتب المصدر العلمي
Lab ID: 34583

Patient ID: 34583
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: 18

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 11.63 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	16	*R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	8	*R	Minocycline		
Aztreonam			Colistin	>= 16	R
Imipenem	2	S	Rifampicin		
Meropenem	1	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole		

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed December 29, 2022 5:05:50 PM CST

Patient Name: دكتور عمر, .
Location: مكتب المصدر العلمي
Lab ID: 34584

Patient ID: 34584
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: 47

Collected:

Comments:	

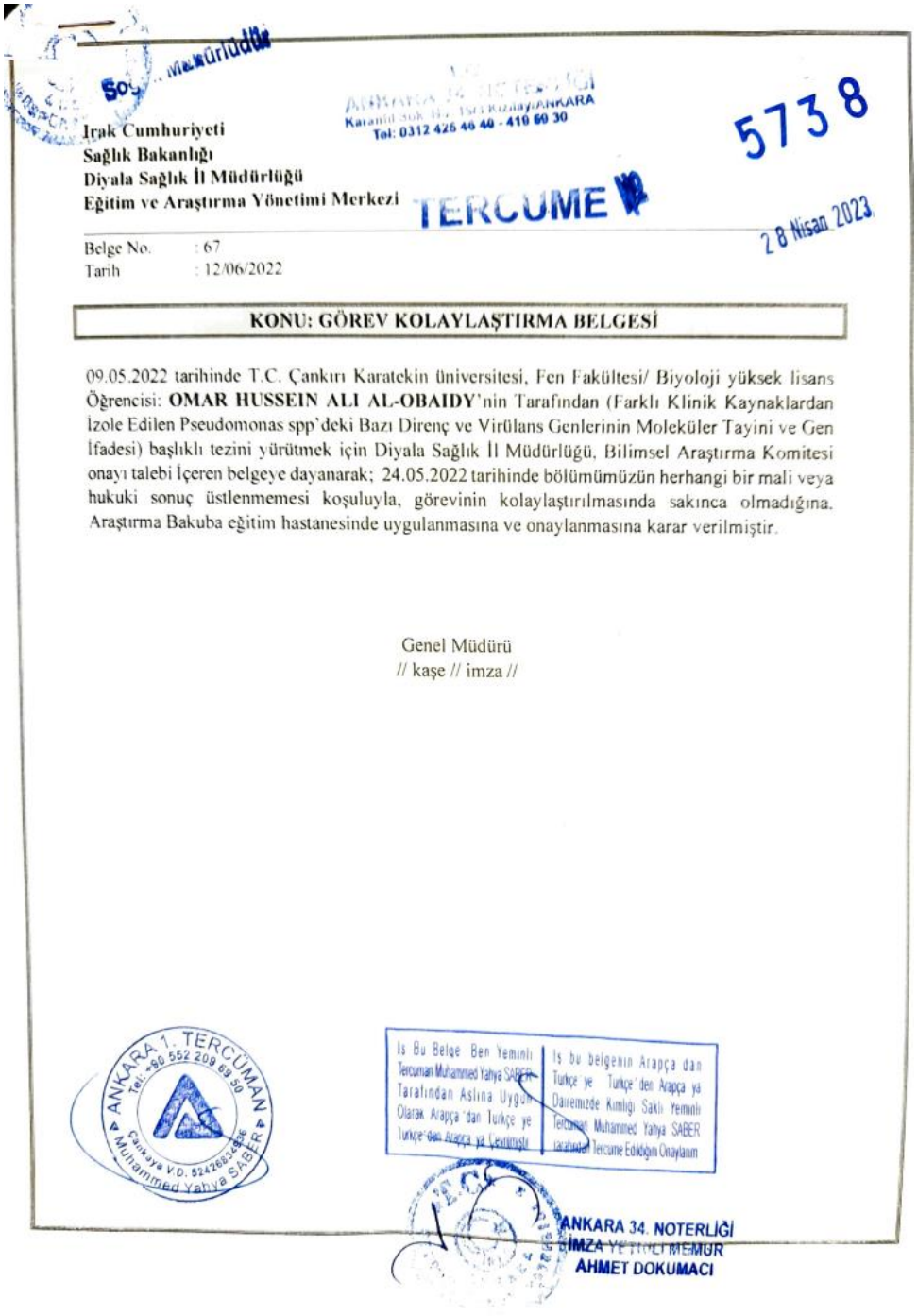
Susceptibility Information	**Analysis Time:** 12.37 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Meropenem	>= 16	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Piperacillin	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Ceftazidime	4*	*R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Cefepime	>= 64	R	Colistin	<= 0.5	S
Imipenem	>= 16	R			

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction

EK 2. Etik kurul onayı



Irak Cumhuriyeti
Sağlık Bakanlığı
Diyala Sağlık İl Müdürlüğü
Eğitim ve Araştırma Yönetimi Merkezi

Karanfil Sok. No: 1 Bakanlıklar/ANKARA
Tel: 0312 425 46 40 - 410 60 30

TERCUME

5738

28 Nisan 2023

Belge No. : 67
Tarih : 12/06/2022

KONU: GÖREV KOLAYLAŞTIRMA BELGESİ

09.05.2022 tarihinde T.C. Çankırı Karatekin üniversitesi, Fen Fakültesi/ Biyoloji yüksek lisans Öğrencisi: **OMAR HUSSEIN ALI AL-OBAIDY**'nin Tarafından (Farklı Klinik Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas spp'deki Bazı Direnç ve Virülans Genlerinin Moleküler Tayini ve Gen İfadesi) başlıklı tezini yürütmek için Diyala Sağlık İl Müdürlüğü, Bilimsel Araştırma Komitesi onayı talebi İçeren belgeye dayanarak; 24.05.2022 tarihinde bölümümüzün herhangi bir mali veya hukuki sonuç üstlenmemesi koşuluyla, görevinin kolaylaştırılmasında sakınca olmadığına. Araştırma Bakuba eğitim hastanesinde uygulanmasına ve onaylanmasına karar verilmiştir.

Genel Müdürü
// kaşe // imza //

ANKARA 1. TERCÜMAN
Tel: +90 552 209 69 50
Muhammed Yahya SABER
Çankaya V.D. 5242683456

İş Bu Belge Ben Yeminli Tercuman Muhammed Yahya SABER Tarafından Aslına Uygun Olarak Arapça'dan Turkçe ye Turkçe'den Arapça ya Çevrilmiştir

İş bu belgenin Arapça dan Turkçe ye Turkçe'den Arapça ya Dairemizde Kimliği Sabit Yeminli Tercuman Muhammed Yahya SABER tarafından Tercume Edildiğini Onaylarım

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İMZA YETKİLİ MEMUR
AHMET DOKUMACI

جمهورية العراق

Diyala Governorate
Directorate of Health of Diyala
Center of the Training and Human Development
Research and Knowledge Management Division

محافظة ديالى
دائرة صحة ديالى
مركز التدريب والتنمية البشرية
شعبة ادارة البحوث والمعرفة

5738
28 Nisan 2023

م/ تسهيل مهمة

.....

يهمنا اخطر الحضرة .....

يرجى التكرم بالعلم من قبل طالب الماجستير في كلية العلوم/ علوم حياة في جامعة جنكيري في تركيا (عمر حسين علي) بتاريخ ٢٠٢٢/٥/٩ المتضمن طلبه لحصول موافقة اللجنة العلمية للبحوث في دائرة صحة ديالى على اجراء بحث تخرج رسالة ماجستير بعنوان (Molecular Detection and Gene Expression for Some resistance and virulance Genes in Pseusomonas sp Isolated from Different Clinical Sources)

حيث تم حصول الموافقة من قبل اللجنة العلمية للبحوث في دائرتنا بتاريخ ٢٠٢٢/٥/٢٤ على مشروع البحث

في العلاه

في دائرة صحة ديالى / مستشفى بعقوبة التعليمي .

مع الاخذ بنظر الاعتبار عدم تحميل دائرتنا اي نفقات مادية او مالية .

للتفضل بالاطلاع مع الاحترام..

ANKARA 1. TERCUMAN
Tel: +90 552 209 69
Muhammed Yahya SABER

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İMZA YETKİLİ MEMUR
AHMET DOKUMACI

EK 2. RNA ekstraksiyon adımları

1. 30 mg'a kadar izolat eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
2. 350 µl FARB tamponu ve 3,5 µl ß-Merkaptoetanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
3. Bir toplama tüpüne filtre kolonu yerleştirilmiş ve numune karışımını filtre kolonuna aktarılmıştır. Tam hızda (18.000 rpm) 2 dk santrifüjlenmiştir.
4. Berraklaştırılmış süpernatant toplama tüpünden yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak süpernatantın hacmi ölçülmüştür.
5. 1 hacim %70 RNaz içermeyen etanol eklenmiş ve vorteksleyerek iyice karıştırılmıştır.
6. Bir toplama tüpüne bir FARB mini kolon yerleştirilmiştir. Etanol eklenerek numune karışımı FARB mini kolona aktarılmıştır. Tam hızda 1 dk santrifüjlenmiş, akış suyu atılmış ve FARB mini kolonu toplama tüpüne geri koyulmuştur.
7. FARB mini kolona 500 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 1 dk boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir. Akış suyu atılmış ve FARB mini kolonu toplama tüpüne geri koyulmuştur.
8. FARB mini kolona 750 µl yıkama tamponu 2 eklenerek, 1 dk boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir. Akış suyu atılmış ve FARB mini kolonu toplama tüpüne geri koyulmuştur.
9. Bir kez daha yıkamak için 9. adım tekrarlanmıştır.
10. FARB mini kolonu kurutmak için kolon 3 dk daha tam hızda santrifüjlenmiştir.
11. ARB mini kolonu bir elüsyon tüpüne yerleştirilmiştir.
12. FARB mini kolonun membran merkezine 40 ~ 100 µl RNaz içermeyen ddH_2O eklenmiştir ve 1 dk boyunca bekletilmiştir.
13. RNA'yı elüe etmek için FARB mini kolonu 1 dk boyunca tam hızda santrifüjlenerek RNA -70 ºC'de saklanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Omar Hussein Ali AL-OBAIDY

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
Lisans	Diyala Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyoloji Bölümü	2016-2020