ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ BETA-LAKTAMAZ PROFİLLERİ

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI tarafından hazırlanan **"Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Çoklu İlaca Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Beta-Laktamaz Profilleri"** adlı tez çalışması 21/12/2022 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. Şinasi AŞKAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hussein Oleiowi Muttalab AL-DAHMOSHI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Şinasi AŞKAR
Biyoloji
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Esra ŞEKER
Mikrobiyoloji
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji
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 Örneklerden İzole Edilen Çoklu İlaca Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Beta-Laktamaz Profilleri"** 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 (21/12/2022).

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLACA DİRENÇLİ *P. AERUGINOSA* İZOLATLARININ BETA-LAKTAMAZ PROFİLLERİ

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şinasi AŞKAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hussein Oleiowi Muttalab AL-DAHMOSHI

Bu çalışmada, Aralık 2021 ve Şubat 2022 tarihleri arasında Irak'ta bulunan Babil şehrindeki hastanelerin farklı kliniklerinden toplam 112 mikrobiyolojik sürüntü örneği elde edilmiştir. Bu örneklerin 100 (%89,2) tanesinde pozitif bakteri üremesi görülürken, 12`sinde (%10,8) bakteri üremesi görülmemiştir. Kliniklere göre yara sürüntüsü 12 (%24), yanık sürüntüsü 28 (%56), kulak sürüntüsü 3 (%6) ve diyabet hastalarının ayaklarından 7 (%14) olmak üzere toplam 50 izolatta *Pseudomonas aeruginosa* tanımlanmıştır. Tüm izolatlar, *P. aeruginosa* için setrimid agar seçici besiyeri ile araştırılmış ve *P.aeruginosa* 16S rRNA amplikonu saptamak için PZR ile doğrulanmıştır. Antibiyogram test sonucuna göre 50 *Pseudomonas aeruginosa* izolatında, direnç fenotiplerinin sonuçları, izolatların %50 oranında MDR olduğunu göstermiştir. β-laktamazın fenotipik araştırılması kombinasyon disk testi (β-laktam/β-laktam+β-laktamaz inhibitörü) ile üç sistem (Piperacilin/Piperacilin - Tazobaktam; Seftazidim/Seftazidim - Tazobaktam ve Tikarcilin/Tikarsilin - Klavulanat) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen 50 *P.aeruginosa* izolatında β-laktamaz varlığı üç farklı antibiyotik disk kombinasyonuna göre sırasıyla %78, %40 ve %72 olarak bulunmuştur. Üç farklı β-laktamaz gen varlığını araştırmak için PZR kullanılmıştır. PZR sonucuna göre 50 *P.aeruginosa* izolatında bla_{TEM} %98, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ %50 ve bla_{SHIV} %38 oranında tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* β-Laktamaz üreten 50 izolatının fenotipik ve genotipik tespiti karşılaştırıldığında, Fenotipik pozitif/ Genotipik pozitif 43 izolat (%86), Fenotipik pozitif/Genotipik negatif 1 izolat (%2) ve Fenotipik negatif/Genotipik pozitif 6 izolat (%12) olarak tespit edilmiştir. Hem MDR hem de MDR olmayan *P. aeruginosa* yanık izolatları arasındaki direnç genlerinin dağılımı incelendiğinde; fenotipik incelemenin direnç genlerinin varlığını yansıtmayabileceği bununla beraber bla_{TEM} ve $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$'in farklı antibiyotik sınıflarına karşı var olan dirençten birlikte sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

2022, 72 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Antibiyogram, β-laktamaz, Kombinasyon disk testi, Çoklu ilaç direnci

ABSTRACT

Master of Science Thesis

BETA-LACTAMASES PROFILE AMONG MULTIDRUG-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATE FROM DIFFERENT CLINICAL SAMPLES

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Şinasi AŞKAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Hussein Oleiowi Muttalab AL-DAHMOSHI

In this study, a total of 112 microbiological swab samples were obtained from different clinics of hospitals in the city of Babylon, between December 2021 and February 2022. Positive bacterial growth was observed in 100 (89.2%) of these samples, while bacterial growth was not observed in 12 (10.8%) samples. According to clinics, *Pseudomonas aeruginosa* was identified in a total of 50 isolates, 12 (24%) on wound swab, 28 (56% on burn swab), ear swab 3 (6%), and 7 (14%) isolates from the feet of diabetic patients. All isolates were investigated with cetrimid agar selective medium for *P. aeruginosa* and validated by PCR to detect the *P. aeruginosa* 16S rRNA amplicon. According to the antibiogram test results, in 50 *P. aeruginosa* isolates, the results of the Resistance phenotypes showed that 50% of the isolates were MDR. Phenotypic investigation of β-lactamase was performed using the Combination Disc Test (β-lactam/β-lactam+β-lactamase inhibitor) using three systems (Piperacilin/Piperacillin-Tazobactam; Ceftazidime / Ceftazidime - Tazobactam and Ticarcillin / Ticarcillin-Clavulanate). The presence of β-lactamase in 50 *P.aeruginosa* isolates obtained was 78%, 40% and 72%, respectively, compared to three different antibiotic disc combinations. PCR was used to investigate the presence of three different β-lactamase genes. According to the PCR results, bla_{TEM} was detected in 98%, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ 50% and bla_{SHIV} 38% in 50 *P.aeruginosa* isolates. When the phenotypic and genotypic detection of 50 isolates producing *P. aeruginosa* β-Lactypic were compared, 43 isolates were Phenotypic positive/Genotypic positive (86%), Phenotypic positive/Genotypic negative 1 isolate (2%), and Phenotypic negative/Genotypic positive 6 isolates (12%). detected. When the distribution of resistance genes between both MDR and non-MDR *P. aeruginosa* burn isolates was examined; It can be concluded that phenotypic analysis may not reflect the presence of resistance genes, however, it can be concluded that bla_{TEM} and $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ may be responsible for the existing resistance against different antibiotic classes.

2022, 72 pages

Keywords: Antibiogram, β-lactamase, Combination disc test, Multidrug resistance

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Şinasi AŞKAR ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hussein Oleiowi Muttalab AL-DAHMOSHI'ye bana gösterdikleri sabır, rehberlik ve destek için en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca destekleri için değerli aileme de teşekkürü bir borç bilirim.

Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI
Çankırı, Aralık 2022

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 ÖZETI **3**
2.1 *Pseudomonas aeruginosa* **3**
2.2 *Pseudomonas Spp.*'nin Evrimi **4**
2.3 *Pseudomonas* Spp.'nin Taksonomisi **5**
2.4 *Pseudomonas aeruginosa* Genomu **6**
2.5 *P. aeruginosa* Tanısında 16S rRNA **7**
2.6 *P. aeruginosa*'nın Patojenitesi **8**
2.6.1 Yanık sepsisi ile ilişkili *P. aeruginosa* **8**
2.6.2 Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *P. aeruginosa* **9**
2.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın bakteriyemi veya septisemi ile ilişkisi **10**
2.6.4 Kulak enfeksiyonu ile ilişkili *P. aeruginosa* **10**
2.6.5 İdrar yolu enfeksiyonuna neden olan *P. aeruginosa* **10**
2.7 *Pseudomonas Aeruginosa* için Antibiyotik Direnci Mekanizmaları **11**
2.7.1 İçsel direnç **12**
2.7.2 Kazanılmış direnç **13**
2.7.3 Adaptif direnç **13**
2.8 β-Laktamazlar **14**
2.8.1 β-laktamazların sınıflandırılması **15**
2.9 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) **19**
2.10 β-Laktamaz Gen Tipleri **21**
3. MATERYAL VE METOT **25**

3.1 Materyal **25**
3.1.1 Ekipman ve aletler **25**
3.1.2 Biyolojik ve kimyasal maddeler **25**
3.1.3 Kitler **26**
3.1.4 Kültür besi yerleri **26**
3.1.5 Antibiyotik diskleri **27**
3.1.6 Antibiyotik diskler β-laktam kombinasyonu **27**
3.1.7 Primer dizileri **28**
3.2 Metot **29**
3.2.1 Hasta numunelerinin toplanması **29**
3.2.2 Kültür ortamının hazırlanması **29**
3.2.3 Mikroskobik inceleme **30**
3.2.4 Oksidaz testi **31**
3.2.5 Çözeltilerin hazırlanması **31**
3.2.6 Moleküler metot **31**
3.2.7 Antibakteriyel direnç/duyarlılık testi **35**
3.2.8 β-laktamaz üretiminin fenotipik tespiti **35**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **37**
4.1 İzolasyon **37**
4.2 *P. aeruginosa*'nın İdentifikasyonu **39**
4.3 *P. aeruginosa*'nın Moleküler Tanımlanması **41**
4.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi **41**
4.5 β-Laktamaz Enziminin Fenotipik İncelenmesi **48**
4.6 PZR ile β-Laktamaz Genlerinin Genotipik Tespiti **52**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **57**
KAYNAKLAR **58**
ÖZGEÇMİŞ **72**

SİMGELER DİZİNİ

-	Eksi
%	Yüzde
+	Artı
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

CTX-M	Sefotaksimaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GSBL	Genişlemiş spectrumlu β-laktamaz
MBL	Metallo-β-laktamaz
OXA	Oksasilinaz
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SBL	Serin β-laktamaz
SHV	Sülfidril varyantı
TEM	Temoneira (β-laktamaz)
VIM	Verona imipenamaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Bakteri üremesi pozitif ve negatif olan örneklerin yüzdeleri 38
Şekil 4.2 Örneklerin cinsiyete göre dağılımı 39
Şekil 4.3 *P. aeruginosa* kolonilerinin morfolojik özellikleri (A) Kanlı agar (B) MacConkey agar 40
Şekil 4.4 *P. aeruginosa* kolonilerinin setrimid agar üzerindeki morfolojik özellikleri 40
Şekil 4.5 *P. aeruginosa* 16S rRNA amplikonunun (956 bp) %1,5 agaroz jel elektroforezi görüntüsü 41
Şekil 4.6 Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi 43
Şekil 4.7 *P. aeruginosa* izolatlarının penisilin sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları 43
Şekil 4.8 *P. aeruginosa* izolatlarının aminoglikozid sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları 44
Şekil 4.9 *P. aeruginosa* izolatlarının florokinolonlar sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları 45
Şekil 4.10 *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenem sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılığı 46
Şekil 4.11 *P. aeruginosa* izolatlarının Aztreonam antibiyotiğine duyarlılıkları 47
Şekil 4.12 *P. aeruginosa* izolatlarının Sephemler sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılığı 47
Şekil 4.13 *P. aeruginosa* izolatları arasında MDR dağılımı 48
Şekil 4.14 β-laktamaz fenotipik incelenmesi 49
Şekil 4.15 β-laktamaz geninin kombinasyon disk testi ile fenotipik incelenmesi 50
Şekil 4.16 bla_{CTXm-1} gen (499bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü 53
Şekil 4.17 bla_{SHV} gen (231bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü 53
Şekil 4.18 bla_{TEM} gen (861bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *P.aeruginosa* taksonomisi 6
Çizelge 2.2 β-laktamazların Ambler moleküler sınıflandırması (Bush and Jacoby 2010) 15
Çizelge 2.3 β-laktamazların Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması (Bush and Jacoby 2010) 16
Çizelge 3.1 Ekipman ve aletler 25
Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal maddeler 26
Çizelge 3.3 Kullanılan kitler 26
Çizelge 3.4 Besiyerleri 26
Çizelge 3.5 Antibiyotik diskler 27
Çizelge 3.6 β-laktam+β-laktamaz inhibitörünün antibiyotik diskleri 27
Çizelge 3.7 *P. aeruginosa*'yı tanımlamak için kullanılan spesifik primer çiftleri ve PZR termal döngü koşulları 28
Çizelge 3.8 β-laktamaz genini saptamak için kullanılan primer çiftleri ve PZR termal döngü koşulları 28
Çizelge 3.9 Moleküler tanımlama için reaksiyon karışımı 33
Çizelge 4.1 Farklı klinik örnekler arasında *P. aeruginosa*'nın dağılımı 37
Çizelge 4.2 Piperasilin/Piperasilin-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit 50
Çizelge 4.3 Seftazidim/Seftazidim-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit 51
Çizelge 4.4 Beta-laktamazın Tikarsilin/Tikarsilin-Klavulanat ile fenotipik tespiti 51
Çizelge 4.5 Beta-laktamaz enzimleri üreten *P. aeruginosa* izolatlarının fenotip dağılımı 52
Çizelge 4.6 *P. aeruginosa*'nın β-laktamaz geninin dağılımı 52
Çizelge 4.7 Beta-laktamaz enzimleri üreten *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının genotipik dağılımı 54
Çizelge 4.8 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ ve bla_{TEM} gen varlığında farklı antibiyotiklere direnç 55
Çizelge 4.9 β-laktamazın fenotipik ve genotipik sonuçları 56

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, birçok yüzeysel ve sistemik enfeksiyonda karşılaşılan klinik olarak önemli bir fırsatçı Gram negatif patojendir. Farklı ortamlara uyum sağlar ve onu süper patojen yapabilen bir dizi virülans genine sahiptir. *P. aeruginosa* solunum yolu, idrar yolu, sepsis, kulak, diyabetik ayak, yanık ve yara enfeksiyonları gibi çok çeşitli bölgelerde hastalıklara neden olur (Tuon *et al.* 2022). Bazen hastalıkların tedavisinde karşılaşılan zorluklar patojenin virülansından kaynaklanabilir. Virülans, antibiyotik direnci de dahil olmak üzere birçok faktör veya mekanizmadan kaynaklanır. Ayrıca bu direncin yükselmesi biyofilm oluşumuna bağlanabilir. Direnç mekanizmaları arasında enzimatik ilaç yıkımı, hedefin enzimatik modifikasyonu, geçirgenliğin azalması, çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance-MDR) dışa atım pompalarının ekspresyonu yer alır (Hall *et al.* 2018).

β-laktam antibiyotikler, *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan oldukça önemli bir ilaç türüdür. Antibakteriyel aktivite, peptidoglikan üretiminin inhibisyonu yoluyla bakteri hücre duvarının yapımını engelleyen beta-laktamlar tarafından sağlanır. Bu, "transpeptidazlar" olarak da bilinen penisilin bağlayıcı proteinin (PBP) işleyişinin engellenmesiyle etkinlik gerçekleştirilir (Bush and Bradford 2016). Bakteri üç veya daha fazla antibiyotik sınıfından en az bir antibiyotiğe direnç gösteriyorsa çoklu ilaç dirençli, iki sınıf dışındaki tüm sınıflardan bir antibiyotiğe direnç gösteriyorsa kapsamlı ilaç dirençli (Extreme-drug resistance-XDR), tüm sınıflardan en az bir antibiyotiğe direnç gösteriyorsa Pan ilaç dirençli (Pan Drug Resistance-PDR) olarak adlandırılır (Magiorakos *et al*. 2012).

β-laktamaz üretimi, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler arasında en sık görülen direnç mekanizması olarak kabul edilir. Farklı beta-laktamaz sınıflarından (A, B, C ve D) farklı enzimler, β-laktamlara direnç kazandırabilir ve aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi farklı sınıflardaki antibiyotiklere birlikte direnç gösterebilirler (Wolter and Lister 2013). Temoneira adlı hastanın adının kısaltması olan TEM Gram negatif bakterilerde tanımlanan ilk plazmit kaynaklı β-laktamaz, SHV (sülfhidril

varyantı) başlangıçta *K. pneumonia* kromozomunda keşfedilen TEM'e benzer aktiviteye sahip bir enzim ve CTX-M (Sefotaksimaz, oksimino sefalosporin olan sefotaksim'e karşı doğal olarak aktif olan bir enzim) çinkoya bağımlı olan en yaygın görülen B sınıfı enzimler arasında olup büyük, eski ve yaygın bir metallo üst ailesinin üyeleridirler. C sınıfı hidrolazlar, penisilinleri hidrolize edebilir ancak en çok sefalosporinlere ve sefamisinlere karşı aktiftir. D sınıfı β-laktamazlar, plazmitlerde bulunan bla_{OXA} genleri tarafından eksprese edilir ve penisilin, sefalosporinler ve karbapenemlere karşı etkilidirler (Bush and Bradford 2020).

Bazen bir hekim petri kabındaki bakterilerin duyarlı olduğu ancak hastaların iyileşmediği antibiyotiği reçete eder. Aslında, β-laktamlara direnç ifade eden ve β-laktamaz fenotipik tarama testleri için pozitif sonuçlar veren *P. aeruginosa*, β-laktamazların varlığını vurgulayacak ve ilgili β-laktamaz genlerinin olduğuna işaret edecektir. Tersine, bazı bakteriler β-laktamlara duyarlılık gösterir ve β-laktamazlar fenotipik tarama testleri için negatif sonuçlar gösterir, ancak direnç genine sahip olabilir ve bu durum antibiyotik direnç dönemi için zor bir durum yaratır.

Bu tezde, farklı klinik örneklerden *P. aeruginosa'*nın izolasyonu ve moleküler tanımlanması, antibiyotik duyarlılık/direnç porifillerinin belirlenmesi, β-laktamazların fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. bitkileri, hayvanları ve insanları enfekte edebilen Gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Aerobik, ancak nitrat varlığında anaerobik olarak çoğalabilir. Ventilatörle ilişkili pnömoni ve diğer sepsis sendromları da dahil olmak üzere hastane kaynaklı enfeksiyonlara bağlı çok sayıda ciddi hastalığın sebebi olarak gösterilir (Diggle and Whiteley 2020). *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi diğer önemli patojenik bakteri türleriyle karşılaştırıldığında, *P. aeruginosa* daha virülenttir bunun yanı sıra geniş kolonizasyon yeteneğine sahiptir ve dayanıklı biyofilmler oluşturur (Høiby *et al.* 2010).

Kistik fibroz ve travma yanıkları gibi önceden var olan hastalıklar veya rahatsızlıkların seyri boyunca önemli enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojen olarak sınıflandırılır. Çoğunlukla bağışıklık sistemi baskılanmış bireyleri etkiler, ancak bağışıklık sistemi yetkin kişileri de enfekte edebilir (Moradali *et al.* 2017).

Pseudomonas aeruginosa, çeşitli antibiyotik direnç mekanizmalarına ve ayrıca çok hücreli biyofilmler üretme eğilimine sahiptir (Diggle and Whiteley 2020). Çok sayıda kimyasal maddeye karşı antibiyotik direnç mekanizmaları, diğer mikroplar üzerinde de etkileri olabilecek kromozomal ve plazmid kodlu genlerden kaynaklanmaktadır (Xu *et al.* 2017). Kistik fibrozlu ve primer siliyer diskinezili kişilerde akciğer enfeksiyonları sırasında ortaya çıkan bazı *P. aeruginosa*'lar için, akciğerin kalın mukusu tabakalarının ve bakteri tarafından üretilen aljinatın oksijen difüzyonunu kısıtlayabildiği yerlerde, mikroaerobik veya anaerobik ortamlara adaptasyon sağlayabilir.

P. aeruginosa bir biyofilm oluşturup bağışıklık sistemi güçlenene kadar, asemptomatik kalabilir. Bu potansiyel olarak ölümcül biyofilmler, kistik fibroz ve primer siliyer diskinezi hastalarının akciğerlerinde görülür (Sousa and Pereira 2014). *P. aeruginosa*,

yaygın dağılımı ve doğası gereği karmaşık antibiyotik direnç mekanizmaları ile dikkat çeken, çoklu ilaca dirençli bir bakteridir (Diggle and Whiteley 2020).

2.2 *Pseudomonas Spp.*'nin Evrimi

Pseudomonas, gamma proteobakterilerin *pseudomonadaceae* familyasından Gram negatif bakterilerin önemli bir cinsidir. *Xanthomonas, Burkholderia* ve *Ralstonia* cinsleri bu karmaşık ailenin diğer üyeleridir (Anzai *et al.* 2000). *Pseudomonas,* 1850'de Fransız askeri cerrah Sedillot tarafından cerrahi pansuman üzerindeki mavi-yeşil akıntılı enfeksiyonlarda tanımlandı. *Pseudomonas* cinsi, 1894'te, mikrobiyolojik tarihin başlarında Migula tarafından önerildi. (Palleroni 2010)'ya göre, "Hücrelerin kutupsal hareket organları var" diyen Migulas'ın bu cinse dair orijinal çizimi kısa ve hatalıydı. Migulas'ın nadir olmakla birlikte bazı türlerde spor oluşumunun gerçekleştiğini de öne sürmesine rağmen günümüzde *Pseudomonad*ların spor oluşturmadığı gösterilmiştir. Migulas tarafından tanımlanan "sporların" ise refraktil yedek madde granülleri olduğuna inanılmaktadır (Palleroni 2010).

Yirminci yüzyılın ortalarında, *Pseudomonas* cinsine 800'den fazla tür atanmış ve bu, cinsle ilgilenen araştırmacılar için kafa karıştırıcı bir zemin oluşturmuştur. Herhangi bir Gram-negatif, kesinlikle aerobik, sporsuz, hareketli basili *Pseudomonas* cinsinin bir üyesi olarak sınıflandırma alışkanlığı bu hatanın en önemli sebebi olmuştur (Scales *et al.* 2014).

Bunu takiben, RNA/DNA hibridizasyonu, 5 farklı rRNA grubunun (rRNA grubu I, II, III, IV ve V) varlığını ortaya çıkardı. *Pseudomonas* rRNA grup I (*Pseudomonas* sensu stricto olarak da bilinir), *P. aeruginosa*'yı, tüm floresan *Pseudomonas*'ları ve bazı floresan olmayan *Pseudomona*s'ları içerir (*P. stutzeri, P. alcaligenes, P. Pseudoalcaligenes ve P. Mendocina* gibi) (Peix *et al*. 2009).

Bakteri taksonomisindeki en önemli değişiklikler, Woese vd. (1975)'nin bakterilerin sınıflandırılması için 16S ribozomal RNA gen dizilerinin kullanılmasını önerdiği 1980 yılında meydana gelmiştir. Bu öneri, *Pseudomonas* cinsinin gamma *proteobacteria*'ya

dahil edilmesine yol açtı; bu, o sırada bakteri taksonomisindeki en önemli değişiklikti (Peix *et al.* 2018). Bununla birlikte, *Pseudomonas* cinsini etkileyen bu değişikliklerin en önemlisi, Anzai vd. (2000) tarafından yürütülen 128 *Pseudomonas* türünün 16S rRNA gen dizilerini derleyen ilk çalışma ile başlamıştır. Birçok türün, rRNA grubu I'in üyelerini içeren *Pseudomonas* sensu stricto kümesine uymadığı keşfedilmiştir (Palleroni 1983). Bu çalışmayı, kalan rRNA gruplarının üyeleri de dahil olmak üzere, Alpha, Beta ve Gamma-proteobacteria sınıflarına atanan 25'ten fazla cinse ayrılan diğer mikroorganizmalar izlemiştir (Beiki *et al.* 2016). Şu anda, Lalucat vd. (2020)'a göre cinsin 220'den fazla türü vardır, bu türlerin hepsi tanımlanmış ve taksonomik tanımlamaları nomenklatürde yer alan prokaryotik isimlerin listesi (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature-LPSN)'nde temsil edilmektedir (Peix *et al*. 2018).

2.3 *Pseudomonas* Spp.'nin Taksonomisi

1894'te *Pseudomonas'*ın keşfinden bu yana, *Pseudomonas* spp. için taksonomik standartlar önemli ölçüde değişti, daha kapsamlı hale geldi ve daha önce belirtildiği gibi cins üyelerinde önemli bir azalmaya neden oldu. *Pseudomonas* cinsi için mevcut taksonomik kriterler, diğer tüm bakterilerde olduğu gibi fenotipik özelliklerin yanı sıra filogeniye de dayanmaktadır (Anzai *et al*. 2000). Hücre şekli, flagella tipi, antibiyotik direnci, büyüme koşulları, karbon kaynağı tüketimi ve analitik profil indeksi (API) testleri gibi çeşitli özellikler, belirli türleri bulmak için kullanılmaktadır (Peix *et al*. 2009).

Sınırlı sayıda mevcut testin bir sonucu olarak, daha sık görülen klinik izolatları tanımlamak için fenotipik karakterler kullanılabilir, ancak çevresel türlerin tanımlanmasında bazı sınırlamalar vardır. Sodyum-dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) profili oluşturma, serotipleme, polar lipit profili oluşturma ve floresans spektroskopik parmak izi kullanan biyomolekül analizi gibi çeşitli ek kemotaksonomik analizler türler arasında ayrım yapmakta etkilidir (Peix *et al*. 2009).

Pseudomonas spp.'nin özelliklerine göre tiplendirilmesi için mevcut çok çeşitli testler olmasına rağmen, filogenetik ve gen dizileme çalışmaları taksonomi için en yararlı yoldur. *P.fluorescens* ve *P. aeruginosa*, bugüne kadar 16S rRNA, gyrB, rpoB ve rpoD

genlerinin birleştirilmiş dizileri kullanılarak gerçekleştirilen çeşitli *Pseudomonas* türlerinin filogenetik ilişkilerinin en kapsamlı çalışılan iki ana türüdür (Beiki *et al*. 2016). *P. fluorescens* altı evrimsel grupta sınıflandırılır, *P.fluorescens* grubu en büyüğüdür ve birkaç alt grup içerir: *P. fluorescens, P. syringae, P. lutea, P. putida, P. anguilliseptica* ve *P. straminea*. *P. aeruginosa* dört grupta sınıflandırılır: *P. aeruginosa, P. oleovorans, P. oryzihabitans* ve *P. stutzeri*. Ayrıca, *P. pertucinogena* kümeleri adı verilen yeni bir tür, iki ana *Pseudomonas* evrimsel türden (*P. fluorescens* ve *P. aeruginosa*) ayrılır (Beiki *et al*. 2016). *P.aeruginosa* taksonomisi Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 *P.aeruginosa* taksonomisi

Alem	**Bacteria**
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gamma *proteobacteria*
Sıra	Pseudomonadales
Aile	Pseudomonadaceae
Cins	*Pseudomonas*
Tür	*Pseudomonas aeruginosa*

2.4 *Pseudomonas aeruginosa* Genomu

Pseudomonas aeruginosa, suşa bağlı olarak 5,2 ila 7 milyon arasında değişen baz çiftine sahip oldukça büyük tek bir kromozoma sahiptir (Shen *et al*. 2018). *P. aeruginosa*'nın genomu, kabaca %66'lık nispeten yüksek bir GC içeriğine sahiptir. PA01, tüm genomu sıralanan ilk suştur (Stover *et al*. 2000). Uzunluğu 6,3Mbp'dir. *P. aeruginosa, E. coli* (4,72 Mbp) (Fredens *et al.* 2019) ve *S. aureus* (2,8 Mbp) (Liao *et al*. 2019) gibi diğer yaygın nozokomiyal enfeksiyonlardan daha büyük bir genoma ve gen sayısına sahiptir. Dizilimi, genomu 6200'den fazla ORF'ye sahip olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası gibi temel ökaryotlarınkiyle karşılaştırılabilir bir sayı olan yaklaşık 5570 açık okuma çerçevesi (ORF) ile oldukça karmaşıktır. *P. aeruginosa*, daha önce belirtildiği gibi, çevrede yaygındır ve çeşitli habitatlarda bulunabilir. Bunun nedeni, PA01 dizilimine dayanan önemli ölçüde daha büyük genomun diğer bakterilerden daha fazla gen içermesidir (Stover *et al*. 2000).

Düzenleme, katabolizma, organik kimyasal taşıma/akış ve çeşitli kemotaksis sistemlerinde yer alan çok sayıda gen vardır (Stover *et al*. 2000). Araştırmacılar daha önce *P. aeruginosa* genomunun büyük bir kısmının (yaklaşık % 90), tam genomlu bir mikroarray kullanılarak terapötik ve ekolojik olarak ilgili 18 suşta korunduğunu göstermiştir (Wolfgang *et al*. 2003). Bu büyük genomun en önemli yönlerinden biri, bakterilere çeşitli farklı ortamlara uyum sağlamasına izin veren muazzam metabolik yollar ve fizyolojik tepkiler sağlamasıdır (Battle *et al.* 2009).

Metabolizma ve solunumla ilgili genler *P. aeruginosa* genomun merkezinde yer alırken, çoklu ilaç akış pompaları, salgılama sistemleri ve iki bileşenli sistemler gibi antibiyotik direnciyle ilişkili genler de sıklıkla mevcuttur. Bu bulgu, *P. aeruginosa*'nın daha küçük genom araştırmalarından elde edilen daha önceki bulgularla doğrulanmıştır (Valot *et al*. 2015).

Yardımcı genom, toksinlerin, proteazların, lipazların ve diğer efektörlerin transportunda yer alan I ve IV salgılama sistemlerine ve ayrıca vankomisin direnci veren molekülleri kodlayan genler dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik direnç genlerine sahiptir. Bu DNA bölümleri, yatay gen transferi ile elde edilir ve çekirdek genomdan farklı bir GC yüzdesine sahip olacaktır (Stover *et al*. 2000, Battle *et al*. 2009).

2.5 *P. aeruginosa* Tanısında 16S rRNA

Zamanla, bakteri türlerinin sınıflandırılmasında 16S ribozomal RNA gen dizilerinin kullanımı yaygın olarak kabul görmüştür. En son araştırmalara göre, bu gen dizileri şu anda bakterilerde taksonomik nedenlerden dolayı en yaygın olarak kullanılan DNA bölümüdür. Bu genin tüm bakterilerde bulunması nedeniyle, bakterilerin aralarında var olan ilişkileri analiz etmek için bu genler kullanılabilir (Yarza *et al*. 2014). Bu gen sadece diğer bakterilerin işleviyle değil, aynı zamanda arkebakterilerin işleviyle ve ökaryotların 18S rRNA geniyle de karşılaştırılabilir (Clarridge III 2004).

16S rRNA geni, insan genomunda en yüksek oranda korunan genlerden biridir. 16S rRNA'daki mutlak değişim hızının ne olduğu bilinmemekle birlikte, türler arasındaki evrimsel mesafelerin ve akrabalıkların ayrımını yapmak için kullanılır (Clarridge III 2004, Martijn *et al*. 2019).

16S rRNA geni kullanmanın genellikle filogenetik analiz yapmanın en iyi yolu olduğu düşünülür. Mevcut standartlar, 16s rRNA dizisi, dizilenmiş diğer mikroorganizmaların dizileriyle yüzde 97 aynı değilse, bir bakterinin yeni bir tür olduğunu kabul eder. Ribozomal RNA dizileri, geleneksel taksonomik yaklaşımlara dayanan organizmaların karakterizasyonlarına karşılık gelmesi gerekli değildir. Tipik olarak kararlı ve homojen moleküler hedeflere dayanan genotipik sınıflandırmaların aksine, fenotipik sınıflandırmalar morfoloji, metabolik durum ve yorumlamadaki değişikliklere duyarlıdır (Madigan *et al*. 2008).

2.6 *P. aeruginosa*'nın Patojenitesi

P. aeruginosa, topraklar ve su kütleleri de dahil olmak üzere birçok doğal habitatta yaygındır ve insan enfeksiyonlarının önde gelen kaynağıdır. Bunun nedeni, türün doğuştan gelen ve sonradan kazanılan virülansı ve antibiyotiklere, dezenfektanlara ve diğer antimikrobiyal maddelere karşı direncinin yanı sıra çok çeşitli sıcaklıklarda ve beslenme kaynaklarında yaşama ve hatta gelişme kapasitesidir. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri ve Dünya Sağlık Örgütü, bu türü halk sağlığını tehdit eden çeşitli antibiyotik dirençleriyle bağlantılı önemli bir tür olarak belirlemiştir. Etkili virülans yolları olduğu için, ciddi, yaşamı tehdit eden nozokomiyal insan enfeksiyonlarının önemli bir kaynağıdır ve kistik fibrozlu kişilerde akciğer enfeksiyonlarıyla ilişkili birincil patojendir (Amsalu *et al*. 2020).

2.6.1 Yanık sepsisi ile ilişkili *P. aeruginosa*

Gram negatif bakteriler söz konusu olduğunda, *P. aeruginosa* yanıkların ve yara sepsisinin en yaygın nedenidir ve tarihsel olarak yanıklardan sonra oluşan enfeksiyon

ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir. Küresel olarak en ciddi halk sağlığı sorunlarından biri olan yanıklar ve yaralar, *P. aeruginosa, S. aureus, Klebsiella* spp ve çeşitli koliform basiller gibi hem endojen hem de yabancı kökenli organizmalar tarafından fırsatçı kolonizasyona karşı savunmasız olan nozokomiyal enfeksiyonlar için yüksek risk altındadır (Belba *et al*. 2013). Yanık sepsisi, kan kültürleri, morbidite ve mortalitenin tümü ciddi yanıklarla ilişkilidir. Bununla birlikte, yanmış bölge her zaman enfeksiyon için bir risk faktörü oluşturmaz (Wang *et al*. 2014). Buna karşılık, yanık bölgesinde canlı doku kontaminasyonu varsa ve enflamatuar yanıtın klinik göstergeleri varsa bu yanmış yüzey alanının kontamine olduğunu ve bunun sistemik bir enfeksiyona ilerleyebileceğini gösterir, bu durumda yanık yüzey alanı derhal tedavi edilmelidir (Manjula *et al.* 2007).

2.6.2 Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, kistik fibroz (KF) hastalarının hava yollarına kalıcı olarak yerleşmesiyle, tekrarlayan kronik akciğer enfeksiyonlarına, akciğer fonksiyonlarında kademeli azalmaya ve ayrıca artan morbidite ve ölüme neden olma kapasitesiyle bilinmektedir. Kistik fibrozun (CF) patogenezi, *P. aeruginosa*'nın bu genetik olarak edinilmiş solunum yolu hastalığına sahip insanları kolonize ettiği birincil yöntemdir. Hastalığa, epitel dokularında homeostazın korunmasında önemli olan bir klorür kanalının işlevini düzenleyen kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) proteinindeki bir mutasyonun neden olduğu düşünülmektedir. Epitel yoluyla klorür iyonu taşınımının kontrolünün bozulması, CFTR kanallarının işlev bozukluğuna bağlı olarak sodyum hiperabsorpsiyonuna ve mukosiliyer klirensinin azalmasına neden olur. Kalın viskoz mukus hava yollarında birikerek tıkanıklıklara neden olur ve mukusun neden olduğu hipoksi *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunu teşvik eder. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan kişiler, kistik fibrozu(CF) olmayan hastalara göre solunum yollarının *P. aeruginosa* kolonizasyonuna karşı daha savunmasızdır. KOAH hastaları, mukosiliyer klirensin azalması gibi kistik fibroz hastalarınınki ile benzer semptomlara sahiptir ve *P.aeruginosa*, bu predispozan koşullar altında kolonize olabilir ve enfeksiyona neden olabilir (Streeter and Katouli 2016).

2.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*'nın bakteriyemi veya septisemi ile ilişkisi

P. aeruginosa, bağışıklığı baskılanmış kişilerde bakteriyemiye neden olan en yaygın patojendir. Hematolojik maligniteler, AIDS ile ilişkili immün yetmezlik, nötropeni, diabetes mellitus ve ciddi yanıkların tümü predispozan faktörlerdir. *Pseudomonas* bakteriyemi enfeksiyonlarının çoğu hastanelerde ve bakım tesislerinde edinilir. *Pseudomonas aeruginosa*, hastanelerde edinilen tüm Gram-negatif bakteriyemilerin yaklaşık %25'inden sorumludur. *P. aeruginosa* septisemisi, diğer faktörlerin yanı sıra, şiddetli toksemi, antibiyotik direnci ve altta yatan hastalığın ciddiyetine bağlı olarak önemli morbidite ve ölümle sonuçlanabilmesine rağmen, seyrek olarak ortaya çıkar (Elsahn 2016).

2.6.4 Kulak enfeksiyonu ile ilişkili *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, bazen "yüzücü kulağı" olarak bilinen kulak enfeksiyonlarının (Otitis eksterna) en büyük nedenidir. Otitis eksterna, neme uzun süre maruz kalmanın ve/veya işitme kanalına yabancı cisimlerin girmesinin (örn. pamuk uçları) neden olduğu dış işitme kanalının iltihaplanması veya enfeksiyonudur. Aslında, iyi bilinen patojen *P. aeruginosa,* otitis eksternaya neden olan en yaygın patojendir fakat halka açık kirli yüzme havuzlarında yüzme ile çok nadiren bağlantılıdır (Streeter and Katouli 2016).

2.6.5 İdrar yolu enfeksiyonuna neden olan *P. aeruginosa*

İdrar yolu enfeksiyonları, hastaneye yatırılan hastalar arasında en sık görülen hastalıklardan biridir ve kaynağına bağlı olarak tüm hastane enfeksiyonlarının yüzde 20 ila 49'unu oluşturur (Horcajada *et al.* 2013). İdrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık yüzde 7 ila 10'u hastane ortamında meydana gelir ve *P. aeruginosa*'dan kaynaklanır. *P. aeruginosa,* hastaneleri etkileyen belirgin bir nozokomiyal üropatojendir. Farklı direnç mekanizmaları sayesinde çok çeşitli fiziksel koşullara ve çok çeşitli antibiyotiklere dayanabilir (Abbas *et al*. 2018). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu İYE, diabetes mellituslu veya böbrek yetmezliği olan özel hastanelerdeki hastalarda bildirilmiştir. Bu bakterinin

neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarından ölen bireylerin sayısı, hastalık sayısındaki artışın bir sonucu olarak yükselmiştir (Lamas Ferreiro *et al*. 2017).

2.7 *P. aeruginosa* için Antibiyotik Direnci Mekanizmaları

P. aeruginosa, kritik hasta bireylerde ciddi sistemik enfeksiyonlara neden olma kabiliyetine sahip fırsatçı bir bakteridir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu artan enfeksiyon insidansı ve hastanede yatan hastalarda şu anda mevcut olan hemen hemen tüm ilaçlara dirençli olan çoklu ilaca dirençli (MDR) suşların gelişimi, yaygın dağılımı, nemli ortamlarda kalıcılık kapasitesi ve çok çeşitli antibakteriyel ve antiseptik ajanlara karşı doğal direnci nedeniyle bir endişe kaynağıdır (Magalhães *et al*. 2020).

"Çoklu ilaç direnci", üç veya daha fazla antibiyotik grubundan en az bir ajana dirençli bakterileri ifade eder. Antibiyotik direnci, özellikle de MDR halk sağlığı için bir endişe kaynağıdır. MDR enfeksiyonlarının diğer enfeksiyonlara göre daha ağır klinik sonuçları ve daha yüksek tedavi maliyetleri vardır ve pan dirençli suşların (şu anda mevcut olan tüm ilaçlara dirençli patojenler) yayılmasının yakın gelecekte bazı hastalıkları tedavi edilemez hale getireceğinden korkulmaktadır (Serra-Burriel *et al*. 2020).

MDR *P. aeruginosa* sıklıkla neoplazili ve yanık yarası enfeksiyonlu kistik fibrozlu (CF) hastalarda tanımlanmıştır (Nasser and Kharat 2019). Amerika Birleşik Devletleri'nde *P. aeruginosa*, yaklaşık 51,000 enfeksiyona ve yılda yaklaşık 440 ölüme neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların üçte birinden fazlasına (6,700) MDR-*Pseudomonas* neden olmuştur. MDR *P. aeruginosa*, ABD Hastalık Kontrol Antibiyotik Direnci Merkezlerinde (CDC AR) önemli bir tehlike olarak kabul edilmiştir. İnsan sağlığı için tehlikeli olduğu düşünülen 12 bakteri ailesinden oluşan bir katalog olan antibiyotiğe dirençli öncelikli patojenlerin (World Health Organization 2017) listesi, karbapenem dirençli *P. aeruginosa'*yı en ciddi risklerden biri olarak içermektedir. *P. aeruginosa* antibiyotik direnci geliştirerek tedaviyi zorlaştırır ve bu nedenle terapötik seçimlerimiz kısıtlanmıştır. Bazı *P. aeruginosa* suşları, β-Laktam antibiyotiklerden (penisilinler, monobaktamlar, sefalosporinler ve karbapenemler), MDR bakterilerini tedavi etmek için önerilen

alternatifler olan üçüncü nesil sefalosporinlere kadar piyasadaki antimikrobiyal ilaçların çoğuna dirençlidir (Idowu *et al.* 2020).

P. aeruginosa'nın antibiyotiğe direnci, doğuştan veya edinilmiş ve adaptif direnç olarak sınıflandırılabilir. *P. aeruginosa*'da hem içsel hem de edinilmiş direnç yollarının prevalansı göz önüne alındığında, ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisi zordur (Azam and Khan 2019).

2.7.1 İçsel direnç

İçsel direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanlara kendi başına direnme kabiliyetini ifade eder. *P. aeruginosa* gibi fırsatçı bakterilerin çok çeşitli antimikrobiyal tedavilere karşı doğal direnci yüksektir. *P. aeruginosa* içsel direncin gelişimi, dış zarın geçirgenliğinde bir azalma, MDR akış pompalarının ekspresyonu ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimi de dahil olmak üzere bir dizi mekanizmayı içerir (Hall *et al*. 2018).

Dış zarın geçirgenlik bariyeri kullanılarak, antimikrobiyallerin bakteri hücrelerine girmesi önlenir. Karbapenemlerin önemli hedefleri olan OprD gibi dış zar porin proteinlerinin değişimi, görülen zar geçirgenliğinin azalmasının birincil kaynağıdır. Antibiyotikleri hedef alan ve bunları belirli kimyasal parçaların eklenmesi veya antibiyotik molekülünün tahrip edilmesi gibi kimyasal modifikasyonlarla etkisiz hale getiren bakteri hücreleri tarafından çeşitli enzimler üretilir (Arzanlou *et al.* 2017).

β-laktam antibiyotiklerin çoğunu hidrolize eden kromozomal olarak kodlanmış AmpC beta-laktamazların ekspresyonu ve karbapenem hidrolize edici enzim poxB gibi antibiyotik inaktive edici enzimlerin, antibiyotikleri etkisiz hale getirerek veya antibiyotikleri yok ederek antibiyotiklere karşı direnç göstermesi mümkündür. Bunun nedeni, AmpC beta-laktamazlarının çoğunun β-laktam antibiyotiğini hidrolize etmesidir (Arzanlou *et al.* 2017).

2.7.2 Kazanılmış direnç

P. aeruginosa, kromozomal gen mutasyonu, yatay gen transferi ve dirence neden olan yabancı genlerin edinilmesi gibi bir dizi işlemle kazanılmış direnç geliştirebilir. Genetik değişikliklerin neden olduğu kazanılmış direnç, β -laktamlar, florokinolonlar (FQs) ve aminoglikozitler dahil olmak üzere bir dizi antibiyotik tipine dirençlidir (Munita and Arias 2016). Florokinolonlara kalıtsal direnç, DNA giraz A-B ve topoizomeraz IV enzimlerinin alt birimlerini kodlayan genlerdeki kromozomal mutasyonlardan kaynaklanır. Bu, florokinolonlara (parC-parE) karşı kazanılmış direncin en yaygın mekanizmalarından biridir (Nouri *et al*. 2016).

Ek antibiyotik direnci mekanizmaları arasında antibiyotik modifiye edici enzimlerin geliştirilmesi, antibiyotiklere geçirgenliğin azalması, mutasyonların neden olduğu hedef bölge değişiklikleri ve akış pompalarının mutasyonel aktivasyonu yer alır. Bu tür mekanizmalar antibiyotiğin kimyasal olarak değiştirilmesine veya bazı durumlarda işlevsizleşmesine yol açar. Antibiyotiklerin kimyasal modifikasyonuna neden olan enzimlerin gelişimi, antibiyotiklere karşı kazanılmış direncin önemli bir mekanizmasıdır (Munita and Arias 2016).

Antibiyotik modifiye edici enzimler, aminoglikozid modifiye edici enzimlerden (örnek olarak aminoglikozid asetiltransferazlar, aminoglikozid nükleotidiltransferazlar, aminoglikozid fosforil transferaz), edinilmiş beta-laktamazlardan, karbapenemazlardan, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardan (GSBL), 16s rRNA metilazlarından ve lipopolisakkarit (LPS) modifikasyonlarında yer alan enzimlerden oluşur (Poole 2011).

2.7.3 Adaptif direnç

Adaptif direnç, antibiyotikler gibi antimikrobiyal ilaçların veya büyüme ortamındaki değişiklikler, pH, sıcaklık, oksijen veya diğer çevresel faktörler de dahil olmak üzere kimyasal veya fiziksel olabilecek diğer çevresel stresörlerin varlığına yanıt olarak gelişen indüklenebilir bir direnç türüdür (Breidenstein *et al*. 2011). Adaptif bağışıklıktan gelen

spektrumun diğer ucunda, içsel ve edinilmiş direnç, antibiyotiklerin veya çevresel uyaranların varlığından etkilenmeyen kalıcı bir fenotip sergiler (Fernández *et al*. 2011).

Isı şoku, DNA stresi, poliaminler, beslenme yetersizliği, biyositler, anaerobiyoz, katyon düzeylerindeki değişimler, karbon kaynaklarındaki değişimler, biyofilm oluşumu ve sürünme motilitesi gibi sosyal aktiviteler ile diğer çevresel koşullar antibiyotiklere karşı adaptif direncin gelişmesine neden olabilir. Son derece uyarlanabilir olmasının yanı sıra, *P. aeruginosa* çevre koşullarına cevap olarak tepkisini değiştirme yeteneğine sahiptir. Diğer bakterilerle karşılaştırıldığında, mevcut en büyük bakteri genomlarından birine sahiptir (Buhl *et al.* 2019).

2.8 β-Laktamazlar

Antibiyotik direnci, acilen ele alınması gereken kritik öneme sahip klinik bir tehlikedir. Bakterilerdeki önemli antibiyotik dirençlerinden birisi, β-laktam moleküllerini parçalayabilen mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler olan β-laktamazların varlığından kaynaklanır. Bakteriyel β-laktamaz direnci, gram negatif bakterilerde plazmid aracılı veya kromozomal olarak üretilen mekanizmalarla sağlanır (Leonard *et al*. 2013).

Moleküler ve genetik yöntemler kullanılarak yapılan klinik izolatların analizi, *P. aeruginosa'nın*, bazıları kromozomal genler tarafından kodlanan ve diğerleri mobil genetik elementler tarafından kodlanan çok çeşitli β-laktamaz oluşturabileceğini ortaya koymuştur (Wolter and Lister 2013). *P. aeruginosa* tarafından üretilen β-laktamazların spektrumları ve hidroliz verimliliği aralarında farklılık gösterebilmesine rağmen hepsi aynı şekilde işlev görür. Bunun yerine, *P. aeruginosa*'daki β-laktamazla ilişkili direnç aynı zamanda ilaç penetrasyonunun etkinliğine, bu patojenin periplazmik boşlukta ilaç birikimini en aza indirgeme kabiliyetine (porin aracılı direnç ve/veya akış pompaları ile ekstrüzyon yoluyla) ve aynı hücre içindeki farklı β-laktamazların ortak etkilerine de bağlıdır ve bunların hepsi dikkate alınması gereken faktörlerdir. Bu, *P. aeruginosa'nın* bir suşundaki bir β-laktamaz ile bağlantılı direnç özelliklerinin, başka bir *P. aeruginosa*

suşundaki aynı β-laktamaz ile bağlantılı direnç özelliklerinden farklı olabileceği anlamına gelir ki bu durum beklenmedik olmamalıdır (Wolter and Lister 2013).

2.8.1 β-laktamazların sınıflandırılması

Şu anda, bu enzimler için kullanılan iki ana sınıflandırma sistemi vardır. Birincisi, enzimleri A, C ve D enzimleri gibi korunmuş protein dizileri ve motiflerine dayalı olarak dört gruba ayıran moleküler sınıflandırma olarak da bilinen Ambler moleküler sınıflandırmasıdır. Serin, β-laktamları hidrolize etmek için kullanılırken, substratları hidrolize etmek için divalent çinko iyonlarına (metal iyonu) ihtiyaç duyan B sınıfı metallo enzimler, maddeleri enzimatik olarak hidrolize etmek için kullanılır (Bush and Bradford 2020).

İkinci tür sınıflandırma, fonksiyonel sınıflandırma olarak adlandırılır ve β-laktamazları sırasıyla substrat ve inhibitör profillerine göre gruplara ayırır. Bu teknik kullanılarak klinik izolatlardaki β-laktamazlar fenotipleri ile korele edilir. En son fonksiyonel sınıflandırmaya toplam üç grup dahil edilmiştir: Sefalosporinazlar içeren grup 1 (Ambler sınıf C), geniş spektrumlu, inhibitöre dirençli, geniş spektrumlu beta-laktamazları ve serin Karbapenemazları içeren grup 2 (Ambler sınıf A ve D), ve metallo β-laktamazları içeren grup 3 (Ambler sınıf B) (Bush and Bradford 2020). β-laktamazların sınıflandırılması Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 β-laktamazların Ambler moleküler sınıflandırması (Bush and Jacoby 2010)

Metal olmayan Serin β-laktamazlar	A sınıfı: Klasik dar spektrum (PSE, CARB) GSBLs (Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz) (TEM, SHV, CTX-M) A sınıfı karbapenemazlar (GES, KPC, SME, IMI/NMC-A, SHV-38, SFC-1)
Metal (Bakır)	B sınıfı: Metallo- β-laktamaz (MBL) Alt kategori B1: (IMP, VIM, SPM, IND, NDM, DIM, GIM, SIM) Alt kategori B2: (CophA, Sfh-1, ImiS) Alt kategori B3: (AIM, CAU-1, GOB-1, FEZ-1)
Metal olmayan Serin β-	C sınıfı: AmpC ESAC (Genişlemiş spektrumlu AmpC)
Metal olmayan Serin β-laktamazlar	D sınıfı: GSBLs (Oksasilinazlar, OXA) CHDLs (karbapenem hidrolize edici D sınıfı β-laktamaz)

Çizelge 2.3 β-laktamazların Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması (Bush and Jacoby 2010)

Grup 1	Sefalosporinler (Ambler Sınıf C)
Grup 2	Serin β-laktamaz (Ambler Sınıf A ve D)
Grup 3	Metallo β-laktamaz (Ambler Sınıf B)

Serin β-laktamazlar*:* Bu enzimler serin-β-laktamazlar (SBL) olarak bilinir, çünkü penisilin bağlayıcı proteinler gibi aktif bölgelerinde nükleofilik serin kalıntıları içerirler ve bu da onları penisiline benzer kılar. Gerçekten de, SBL'lerin evrimsel süreçler yoluyla PBP'lerden evrimleşmiş olmaları muhtemeldir (Tooke *et al.* 2019). SBL'ler sırasıyla Penisilinazlara, Sefalosporinazlara ve Oksasilinazlara karşılık gelen Ambler sınıfları A, C ve D olmak üzere üç gruba ayrılır. Ambler sınıfları A, C ve D, sekans kimliklerine ve substrat profillerine göre sınıflandırılır. Üç ana tip serin β-laktamaz son derece çeşitli amino asit dizilerine sahip olsa da, hepsi serin proteazlarla bir asilasyon-deasilasyon mekanizmasını paylaşır. Bu işlemde, genel baz, nükleofilik serini aktive eder, bu daha sonra bir tetrahedral anyon geçiş durumu yoluyla acyl enzim ara ürününü üretmek için β-laktam amid bağının karbonil karbonuna saldırır. Bu türün rezolüsyonunda kullanılan deasilasyon suyu genel bir baz tarafından uyarılır ve bu da asil enziminin hidrolize olmasına ve rezolüsyon işleminin bir yan ürünü olan hasarlı ürünün salınmasına neden olur. Mekanizma açısından, üç Ambler sınıfı, diğer Ambler sınıflarından farklılık gösterir (Tooke *et al.* 2019).

A sınıfı β-Laktamazlar: A sınıfı enzimler olarak bilinen beta-laktamazlar, enzim sınıfları arasında en çok çalışılan ve en geniş dağılıma sahip olanlardır. Kayda değer A sınıfı enzimler arasında; *S. aureusa* penisilin direncinden sorumlu PC1, gram-negatif bakterilerde tanımlanan ve aminopenisilinlere ve erken sefalosporinlere karşı aktif olan ilk plazmid kaynaklı β-laktamaz TEM; başlangıçta *K. pneumoniae* kromozomunda tanımlanan ve daha sonra plazmitler üzerinde mobilize edilen, TEM'e benzer aktiviteye sahip bir enzim olan sülfhidril varyantı SHV, Sefotaksimaz, doğal olarak Oksiminosefalosporin Sefotaksim'e karşı aktif olan ve dünya çapında hızla yayılan bir enzim olan CTX-M ve *K. pneumoniae* Karbapenemaz KPC bulunur. TEM, SHV ve CTX-M familyaları gibi enzimlerin başarısının anahtarı, bunların bir dizi Gram negatif

patojende, özellikle *Enterobacteriaceae*'de plazmitler ve diğer mobil genetik elementler üzerinde yayılmaları ve aktivite spektrumlarını genişletme yetenekleri olmuştur (Tooke *et al*. 2019).

Örneğin, TEM ve SHV'nin Sefotaksim ve Seftazidim gibi Oksinimino Sefalosporini hidrolize etmesini sağlayan nokta mutasyonlarının birikmesi, "genişlemiş spektrumlu" fenotipin (GSBL'ler) gelişmesine yol açmıştır; bu substratların bazılarına karşı zaten doğal bir aktiviteye sahip olan CTX-M β-laktamaz enzimleri, çeşitli klinik durumlar söz konusu olduğunda artacak mutasyonlar biriktirir, GSBL'ler Sefalosporinlerin etkinliği için önemli bir tehlikedir (Chong *et al*. 2018).

B sınıfı β-laktamazlar: B sınıfı çinko bağımlı metallo β-laktamaz, bilinen herhangi bir PBP'ye bağlı değildir; bunun yerine, dünya çapında bulunan devasa, eski ve geniş çapta dağılmış bir metallo hidrolaz süper ailesinin üyeleridir. Prokaryotlarda bu enzimler, çeşitli küçük bileşiklerden (tiolesterler, fosfonatlar) nükleik asitlere kadar çok çeşitli substratlar üzerinde çalışır (Baier and Tokuriki 2014, Pettinati *et al.* 2016).

Metallo beta-laktamaz, proteinin çekirdeğini oluşturan iki tabakanın çizgisinde bir metal merkez olarak işlev gören His-Xaa-His-Xaa-Asp motifinin varlığı ile ayırt edilir. Bu çekirdeği oluşturan tabakalar ve ayrıca stokiyometrisi ve mimarisi, üç farklı MBL alt ailesini birbirinden ayırır (B1, B2 ve B3). B1 enzimlerinde, Zn_2 koordine edici Cys, ilave bir His ile değiştirilir; B3 enzimlerinde, tanımlayıcı motifin ilk His'i Asn ile değiştirilir, bunun sonucunda sadece Zn_2 metal bölgesinin bulunduğu bir mononükleer enzim oluşur. Klinik olarak en önemli B1 enzimleri tri-His (Zn_1 olarak adlandırılır) ve Cys-His-Asp'den (Zn olarak adlandırılır) oluşan binükleer çinko merkezi içerenlerdir. Metal koordinasyonu için binükleer enzimlerin su moleküllerinin varlığına ihtiyacı vardır (Palzkill 2013).

Bu su moleküllerinden biri ("bridging" su olarak adlandırılır) iki metal iyonunu birleştirirken, diğeri ("apik" su olarak adlandırılır) Zn_2Zn_1'e bağlandığında genellikle tetrahedral geometriye sahip olduğu varsayılırken, Zn_2'nin trigonal bipiramidal geometriye veya deforme olmuş kare piramidal geometriye sahip olduğu düşünülmektedir. MBL enzimleri genellikle çinko enzimleri olarak sınıflandırılır, ancak

onları diğer metalli formlarda yeniden oluştururken de işlev görebilir ve diğer üst aile üyeleri bir dizi farklı metal iyonu kullanır (Pettinati *et al*. 2016). Buna istisna olarak, demir enzimleri olarak izole edilen IMP enzimleri verilebilir (Carruthers *et al.* 2014). MBL enzimleri, binükleer enzimler için penisilinleri, sefalosporin ve karbapenem antibiyotiklerini içeren β-laktamazlar olarak olağanüstü geniş aktivite yelpazesi ile dikkat çekicidirler, ancak monobaktam antibiyotiklere karşı çok az veya hiç etki göstermezler (Lohans *et al.* 2017).

C sınıfı β-laktamazlar: B ve C sınıfı GSBL'ler (AMPC'ler) esas olarak kromozomal aracılıklıdır, ancak C sınıfı enzimler plazmidler üzerinde de bulunur ve büyük ölçüde *Enterobacteraceae*'da bulunur. Bu enzimlerin penisilinleri hidrolize edebilmelerine rağmen, sefalosporin hidrolizi sırasında difüzyon sınırına yakın işleyen bazı AmpC enzimleriyle Sefalosporinlere ve Sefamisinlere karşı daha etkilidirler (Sawa *et al*. 2020). Çoğu durumda, Klavulanik asit gibi SBL inhibitörleri C Sınıfı enzimleri inhibe etmez, bununla birlikte, bazıları enzime bağlı olarak Sulbaktam veya Tazobaktam tarafından inhibe edilir. Öte yandan, Aztreonam, bu substrat için yüksek bir afiniteye buna karşılık düşük molar aktivite hızına sahip olduğu için bu ezimlerin aktivitelerini inhibe eder (Mack *et al*. 2020). Sefamisinlere (CMY), Ambler sınıfı C'ye (ACC) ve Sefoksitine (FOX) ek olarak, bu kategoriye ait diğer birçok β-laktamaz, birlikte *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* gibi fermente olmayan türlerde plazmid üzerinde kodlanmıştır (Jacoby 2009).

D sınıfı β-laktamazlar: D sınıfının oksasilinaz enzimi, A sınıfı hariç tüm β-laktamazlar arasında çeşitli şekillerde en çok yayılandır. Keşfedilen en eski enzim penisilin ile sınırlı aktiviteye sahipken, oksasilinaz (OXA) sınıfları, sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı aktif enzimlerin yanı sıra inhibitörlere ve substratlara karşı geniş bir duyarlılığa sahip enzimleri içerecek şekilde gelişmiştir (Evans and Amyes 2014). *P. aeruginosa*'da plazmid kaynaklı sefalosporinazların dağılımı ve daha yakın zamanlarda karbapenem hidrolize edici enzimlerin *Acinetobacter baumannii* ve *Enterobacteraceae*'de (öncelikle *K. pneumoniae*) dağılımı, oksasilinaz sınıfının birçok üyesinin kromozomal olarak kodlanmasına rağmen, bu sınıfın tıbbi önemini arttırmıştır. Bu enzimlerin çevrede ne

kadar yaygın ve çeşitli olduklarının bir başka göstergesi, bir dizi Gram-pozitif bakteride OXA enzimlerinin varlığının bulgusudur (Tooke *et al*. 2019).

Bu enzimler, kromozom, plazmid veya integral üzerinde bulunabilen ve çevresel uyaranlara yanıt olarak eksprese edilebilen bla_{OXA} gen ailesi olarak bilinir. Çoğu durumda, Penisilin, Sefalosporinler ve Karbapenemler gibi antibiyotiklere dirençli oldukları için tedavisi zor olan nozokomiyal enfeksiyonlarda OXA β-laktamaz bulunur (Gupta *et al*. 2020).

Genişlemiş spektrumlu β-laktamazların (GSBL'ler) farklı sınıflarının farklı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretimi artan bir sıklıkta gözlemlenmiştir ve bu da bakterilerin cefotaxime, ceftriaxone ve ceftazidime gibi genişlemiş sefalosporin spektrumlu antibiyotiklere direnç göstermesini sağlamıştır (Shacheraghi *et al.* 2010). OXA tipi GSBL'ler Türkiye ve Fransa'da *P. aeruginosa* izolatlarında yüksek miktarlarda bulunmuştur (Bradford 2001).

Bu enzimler temel olarak, A sınıfı β-laktamazların aksine, hem penisilin hem de oksasiline hidrolize edebilen ve direnç iletebilen penisilinazlardır. Sonuç olarak, oksasilinazlar olarak adlandırılmış ve OXA olarak kısalatılarak yazılmıştır. Erken OXA enzimlerinin substrat profili (Bush and Bradford 2020) yaklaşımı dikkate alınarak keşfedilmiştir ve bu enzimlere özel isimler verilmiştir. *Enterobacteriaceae*'de daha yaygın olan TEM ve SHV'nin aksine, çoğunlukla *P. aeruginosa*'da rapor edilmiştir (Mlynarcik *et al.* 2020).

2.9 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL)

Beta-laktamaz, beta-laktam antibiyotikleri hidrolize eden ve hidroliz sonucunda onları iş göremez hale getiren enzimlerdir. Hidroliz sırasında enzimler, bu antibiyotiği bir arada tutan kimyasal bağlara saldırır ve koparır, bu da bu maddeler için fiziksel ve kimyasal bozulmaya neden olur (Akpaka *et al.* 2021).

Genellikle GSBL'ler olarak bilinen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, birinci, ikinci ve üçüncü nesil sefalosporinlerin yanı sıra penisilinler ve Aztreonam gibi Monobaktamları hidrolize etme ve direnç oluşturma potansiyeline sahip bir tür beta-laktamazdır. Öte yandan GSBL, Sefoksitin ve Sefotetan gibi Sefamisinlere veya Ertapenem, imipenem ve meropenem gibi karbapenemlere karşı direnç oluşturmaz. Ayrıca, GSBL'ler doğal olarak oluşan bir antibiyotik olan klavulanik asit tarafından inhibe edilir (Salahuddin *et al.* 2018).

Gram negatif bakteri enfeksiyonları dünya çapında endişeye neden olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. CDC'ye göre β-laktamaz üretimi, beta-laktam direncinin gelişmesinde hala en önemli unsurdur. GSBL ile beta-laktamaz üretimi giderek yaygınlaşmaktadır (Leylabadlo *et al.* 2017). tarafından yapılan bir araştırmaya göre GSBL üretiminin en yaygın olarak *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia*'da olduğu gösterilmiş ve *Enterobacteriaceae* familyasının didğer üyelerinin benzer enzimler ürettiği bildirilmiştir. İki yüzden fazla GSBL tanımlanmıştır. Bunların isimleri ve özellikleri resmi web sitesinde verilmiştir. GSBL üreten mikroorganizmaların dağılımını ve ürettikleri toksinleri gösteren, 30'dan fazla farklı ülkede çalışmalar yayınlanmıştır (Bush and Jacoby 2010).

GSBL'ler dar spektrumlu beta-laktamazları kodlayan genlerden üretilir. bla_{TEM}, bla_{SHV} ve $bla_{CTX\text{-}M}$ en yaygın GSBL tipidir. bla_{OXA} tipini ve daha da nadir olanları içeren diğer enzimler arasında Belçika (BEL-1), *Pseudomonas* genişlemiş direnç (PER), Brezilya (BES-I), Vietnam GSBL (VEB) ve *Serratia fonticola* I (SFO-1) bulunur. Bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların (GSBL) yaygın olanları SHV veya TEM tiplerindedir. Bu enzimleri üreten bakteriler hastane enfeksiyonlarına neden olabilir (Akpaka *et al.* 2021).

Beta-laktamazları kategorize etmek söz konusu olduğunda, aralarından seçim yapabileceğiniz iki farklı kategorizasyon yöntemi vardır. Bunlar, onları fonksiyonel karşılaştırmalara göre gruplandıran Bush–Jacoby–Medeiros sınıflandırması (Grup 1-4) ve dört sınıfın (A'dan D'ye) moleküler bir sınıflandırması olan amino asit benzerliğine göre gruplandıran Ambler sınıflandırmasıdır. Beta-laktamazlarda bir serin radikali

olsaydı serin beta-laktamazlar olarak sınıflandırılırlardı, ancak enzimin aktif bölgesinde bir çinko iyonu içeriyorlarsa metallo-beta-laktamazlar olarak tanımlanmaktadırlar (Bush and Jacoby 2010).

2.10 β-Laktamaz Gen Tipleri

***bla*$_{SHV}$:** Sülfhidril değişkeni, "SHV" kısaltmasıyla gösterilir. Bu isim, SHV aktivitesinin p-kloromerküribenzoat tarafından baskılanmasının substratla ilgili olduğuna ve deney için kullanılan substrata bağlı olarak değiştiğine inanıldığı için verilmiştir (Paterson and Bonomo 2005). SHV-1, 1974 yılında İsviçre'de bulundu. SHV-1 β-laktamazlar, plazmit aracılı olup, plazmitlerin replikasyonlar için gerekli olduğunu gösterir. *Klebsiella pneumoniae* bu enzimlerin en yaygın kaynağıdır. SHV-1 enzimleri, Ceftriaxone ve seftazidime gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edemezler, ancak sephalothin ve sefazolin gibi dar spektrumlu ilaçları hidrolize edebilirler. Aynı şekilde, penisilinler için bunu yapabilmelerine rağmen, sefamisin ve karbapenemleri hidrolize edemezler (Paterson and Bonomo 2005).

Direnç yöntemi, enzimin aktif bölgelerinde serin kalıntı yan zincirlerinde bulunan serbest hidroksil grupları ile antibiyotik β-laktam halkasına saldırarak gerçekleştirilen hidrolizi içerir. Sonuç olarak, antibiyotikleri etkisiz hale getiren kovalent acyl ester oluşur. GSBL fenotipli SHV tipi, 238 lokasyonunda glisin yerine serin bulunması ile tanımlanır. Bu mutasyon nedeniyle, bu beta-laktamazların genişlemiş spektrum özellikleri vardır (Paterson and Bonomo 2005).

Geniş bir aktivite yelpazesine sahip SHV enzimleri, hareketli, çoklu dirençli ve yüksek oranda bulaşıcı olan plazmit üzerinde kodlanmıştır. Bu durum hemen hemen tüm *Enterobacteraceae* türlerine yayılmalarına izin verir. GSBL oluşumunu sağlayan bu genlerin varlığı nedeniyle, çoklu ilaç direncine ve bunun sonucunda tedavi başarısızlığına yol açtığından uygun tedavinin alınması kritik öneme sahiptir (Akpaka *et al.* 2021).

***bla*$_{TEM}$:** TEM-1 enzimi, 1960'larda Yunanistan'da Temoneira adlı bir hastadan elde edilen bir *Escherichia coli* suşunda tanımlanmıştır. TEM-1, Gram negatif bakteri türleri içerisinde bir bakteriden diğerine aktarabilen plazmit aracılı bir enzimdir. Antimikrobiyal ilaçların β-laktam halkasına saldıran TEM-1, bunları yok eder, bu da ilaçların bakteri üremesini ve yayılmasını engelleme yeteneklerini kaybetmelerine neden olur. Oksasilin ve karbenisilin ile karşılaştırıldığında, ampisilini hidrolize etme kapasitesi daha yüksektir ve klavulanik asit (CA) tarafından bloke edilir (Paterson and Bonomo 2005).

Hem TEM-2 hem de onun öncülü olan TEM-1 birçok biyokimyasal özelliğe sahip olsa da, aralarındaki tek fark izoelektrik noktalarındaki %5,4'ten %5,6'ya bir kaymadır. Bu iki enzim, diğer aktivitelerine ek olarak sefalotin ve sefazolin gibi sınırlı bir aktivite aralığına sahip antibiyotik olan sefalosporinleri hidrolize eder. Oksimino yan zincirlerine sahip olan ve daha yüksek generasyon sefalosporinleri (seftriakson, sefepime, sefotaksim ve seftazidime gibi) içeren üstün nesil sefalosporinlerde de artan direnç görülmektedir (Akpaka *et al.* 2021).

Daha önce CTX-1 olarak bilinen TEM-3 terimi, iki amino asit değişiminin varlığı ile TEM-2'den ayırt edilir. Bu, TEM-3'ün sefotaksim için yüksek bir afiniteye sahip olduğu gerçeğinden kaynaklanmaktadır. TEM-3, GSBL'ler olarak etiketlenen ilk takım türleri olarak kabul edilmiştir (Schneider *et al*. 2007). Aynı zamanda TEM türevleri olan SHV beta-laktamazlar ve OXA dahil olmak üzere 100'den fazla farklı TEM türevinin amino asit dizileri rapor edilmiştir (Cheng *et al*. 2019).

Bu türevlerin çoğu GSBL olarak sınıflandırılır. Bir enzimin β-laktamaz inhibitörüne direncinin sınırlı olması ve geniş spektrumlu sefalosporin antibiyotikleri üzerinde hidrolize edici etkisi olmaması halinde o enzim GSBL olarak kabul edilmez. Aminoasit değişikliklerinin bir sonucu olarak enzimin aktif bölgesi çevresinde bir GSBL fenotip kümesi oluşmuştur. Bu konfigürasyon modifikasyonları, Oksiimino beta-laktam substratlarına erişilebilirliğin artmasına neden olmuş ve bu ikame sonucunda klavulanik asit gibi inhibitörlere duyarlılığı arttırmıştır. Geniş bir aktivite yelpazesine sahip GSBL'ler genellikle tek bir aminoasitten daha fazla değişikliğe sahiptir (Mendoza *et al*. 2018).

***bla*$_{CTX-M}$:** *CTX-M* enzimleri yapısal ve işlevsel olarak TEM ve SHV enzimleriyle ilişkilidir ve kromozomal varyasyonla tanımlanan *Kluyvera* türlerinde bulunan beta-laktamaz ailesinin üyeleridir (Bush and Jacoby 2010). β -laktam antibiyotiklerin β-laktam halkasındaki kimyasal bağları hedef alır ve kırarak bakterilere karşı etkisiz hale getirirler (Paterson and Bonomo 2005).

CTX-M, bir plazmid tarafından kodlanan ve diğer antibiyotiklerin yanı sıra tetrasiklin, aminoglikozitler ve sülfametoksazol / trimetoprim gibi çeşitli antibiyotikler için direnç geni içeren plazmid aracılı bir ilaçtır. Bu enzimler aztreonamın yanı sıra ilave sefalosporinleri (sefotaksim, sefepim ve seftazidim gibi) hidrolize edebilirler, diğer taraftan, klavulanik asit aktivitelerini engellerler. Mikrobiyoloji laboratuvarları, bu enzimlerin neden olduğu enfeksiyonları uygun şekilde tedavi edebilmek için GSBL üreten organizmaları tam olarak tanıyabilmelidir. Bu yapılmazsa, çok ilaca dirençli enfeksiyonların ortaya çıkmasına ve tedavinin başarısız olmasına neden olabilir. CTX-M gibi GSBL'leri tespit etmek için seftazidim direnci kullanılmasına rağmen, bu yaklaşım her zaman doğru değildir, çünkü bazı izolatlar bu antibiyotiğe duyarlı olsalar bile bazen direnç gösterebilirler (Poirel *et al.* 2019).

***bla*$_{OXA}$:** blaOXA'lar, OXA tipi GSBL'lerdir. Birlikte sınıflandırıldıkları TEM ve SHV enzim tiplerinden farklıdır (Mairi *et al.* 2018). Bileşiğe, oksasilini hidrolize etme eğilimi nedeniyle OXA adı verilmiştir. Bu enzimler Sefalotin ve ampisiline karşı etkili değildir. Diğer bir ayırt edici özellik klavulanik asit üzerinde zayıf bir inhibitör etkiye sahip olmasıdır (Bush and Jacoby 2010).

Serin beta-laktamaz olarak sınıflandırılması, D sınıfına ait olması ile ilgilidir. Serin beta-laktamazların aktivitelerini gösterebilmeleri için öncelikle serbest hidroksil grupları ile antibiyotiklerin β-laktam halkasına saldırması ve bunun sonucunda antibiyotiklere zarar veren ve onu etkisiz hale getiren kovalent acyl esterler oluşması gerekir. OXA enzimlerinin çoğu hidrolize etme yeteneğine sahip olmadıkları için GSBL olarak adlandırılmazlar. İlk çalışmalar, izoelektrik noktalarına ve klorür iyonu tarafından inhibisyon kapasitelerine dayalı olarak OXA β-laktamazları tanımlanmıştır. OXA_1 ve OXA_2, hem OXA-1 hem de OXA-2 klorür iyonu tarafından inhibisyon olduğundan, bu

inhibitör özelliğine dayanarak OXA_3'ten ayırt edilmektedir. Ancak GSBL olarak da bilinen OXA-10, diğer antibiyotikler arasından Aztreonam, Seftriakson ve Sefotaksim'i zayıf şekilde hidrolize ederken, OXA-45, -35, -32, -31, -28, -19, -18, -17, -16, -15, -14 ve -11 gibi diğer OXA'lar bu antibiyotiklere daha yüksek direnç seviyeleri sergiler (Neyestanaki *et al.* 2014).

P. aeruginosa'nın bu OXA tipi β-laktamazın en tipik olarak bulunduğu bakteri olduğu keşfedilmiş ve enzim ilk olarak bu bakteriden izole edilmiştir (Hall *et al.* 1993). Seftazidim gibi antibiyotiklere karşı çok dirençli olmasının yanı sıra, serin ile arginin 143 ve glisin ila aspartat 157 lokasyonlarında amino asit ikamesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonun bir sonucu olarak, seftazidime karşı hidrolitik aktivite önemli ölçüde artmıştır (Kazmierczak *et al.* 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman ve aletler

Tezde kullanılan ekipman ve aletler Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Ekipman ve aletler

NO.	Ekipmanlar/Aletler	Firma	Menşei
1	İnkübatör	Memmert	Almanya
2	Santrifüjü	Memmert	Almanya
3	Distile su cihazı	GFL	Almanya
4	Mikropipetler 5-50 µL,100-1000 µL, 0,5-10 µL,	Capp	Almanya
6	Milipor filtre (0,45 mm)	Sartorius membrane	Almanya
7	Ependorf tüpleri	Eppendrof	Almanya
8	Otoklav	Cryste	Kore
9	Düz tüp 10 mL	Afco-Dispo	Japonya
10	Mikrodalga	Panasonic	Japonya
11	Petriler 9 cm	Afco-Dispo	Japonya
12	Işık Mikroskopu	Zeiss	Almanya
14	Vortex	Clever	ABD
15	Jel Elektroforez Sistemi	Clever	
16	UV Transillüminatör	Clever	
17	Hassas Elektirikli Terazi	Denver (USA)	
18	PZR Termal Döngüleyici	Techne	U.A
19	Buzdolabı	Concord	İtalya
20	Güvenlik kabini	Cryste	Kore
21	Dondurucu	Kelon	Çin

3.1.2 Biyolojik ve kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan başlıca biyolojik ve kimyasal maddeler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal maddeler

No.	Kimyasallar	Firma/Menşei
1	95%, Etanol (C_2H_5OH)	**BDH/İngiltere**
2	70% Alkol	**Fluka chemical**
3	Gliserol ($C_3H_8O_3$)	**İsviçre**
4	Nükleik asit boyama solüsyonu	**Bioneer (Kore)**
5	Tris-Borate-EDTA (TBE) tamponu	**Promega/ABD**
6	Tuzlu Su	**Mehico (Hindistan)**

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Kullanılan kitler

No.	Kit türü	Firma/Menşei
1	DNA ekstraksiyon Kiti	Favorgen (Tayvan)
2	DNA markır	Bioner (Kore)
3	PZR karışımı	Promega (ABD)
4	Primerler	Macrogen/Kore

3.1.4 Kültür besi yerleri

Kültür besiyerlerleri bakteri teşhisinde yer alan birçok işlev için kullanılır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Besiyerleri

No.	Besi yeri	Firma/Menşei
1	Kanlı Agar	Oxoid/İngiltere
2	MacConkey agar	Oxoid/İngiltere
3	Setrimid agar	Himedia/Hindistan
4	Beyin kalp infüzyon suyu	Himedia/Hindistan
5	Muller-Hinton agar (MHA)	Himedia/Hindistan
6	Peptonlu sıvı besiyeri	Himedia/Hindistan

3.1.5 Antibiyotik diskleri

Çalışmada kullanılan 6 gruba ait 12 farklı antibiyotik sınıfı Çizelge 3.5'te verilmiştir. Antibiyotik disk difüzyonu Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsüne (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021) göre yapılmıştır.

Çizelge 3.5 Antibiyotik diskler

No	Test/Rapor Grubu	Antimikrobiyal Ajan	Kısaltma	Disk İçeriği (mcg)	Firma
1	Monobaktamlar	Aztreonam	AT	30	Himedia
2	Sefemler	Seftazidim	CAZ	30	Himedia
		Sefepim	CPM	30	Himedia
3	Penisilinler	Tikarsillin	TC	75	Himedia
		Piperasillin	PI	100	Himedia
4	Aminoglikozitler	Gentamisin	GEN	10	Himedia
		Amikasin	AK	30	Himedia
		Netilmisin	NET	30	Himedia
5	Kinolonlar	Siprofloksasin	CIP	5	Himedia
		Levofloksasin	LEV	5	Himedia
6	Karbapenemler	Imipenem	IPM	10	Himedia
		Meropenem	MRP	10	Himedia

3.1.6 Antibiyotik diskler β-laktam kombinasyonu

Antibiyotik diskler β-laktam kombinasyon ajanları Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 β-laktam+β-laktamaz inhibitörünün antibiyotik diskleri

NO	Antimikrobiyal Ajan	Kısaltma	Disk İçeriği (mcg)	Firma
1	Piperasilin-Tazobaktam	PTZ	100/10 µg	Himedia
2	Seftazidim-Tazobaktam	CAT	30/10 µg	Himedia
3	Ticarcilin-Klavulanat	TCC	75/10 µg	Himedia

3.1.7 Primer dizileri

Bu araştırmada *P. aeruginosa*'yı tanımlamak için kullanılan spesifik primer (Spilker *et al*. 2004) çiftleri ve PZR termal döngüleyici koşulları aşağıdaki Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 *P. aeruginosa*'yı tanımlamak için kullanılan spesifik primer çiftleri ve PZR termal döngü koşulları

No	Gen	Primer	Dizin 5'ten 3'e	Ürün	Koşullar
1	*P.aeru*	*P.aeru*-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	956bp	Adım 1: 95ºC, 2 dk. Adım 2: 95ºC, 30 sn. Adım 3: 61ºC, 30 sn. Adım 4: 72ºC, 100 sn. Adım 6: 72ºC, 5 dk. Adım 7: 4ºC, daima
		P.aeru-R	TCCTTAGAGTGCCCACCCG		

β-laktamaz genlerinin tanımlanmasında kullanılan primer çiftleri Çizelge 3.8'de verilmiştir (Bokaeian *et al*. 2015).

Çizelge 3.8 β-laktamaz genini saptamak için kullanılan primer çiftleri ve PZR termal döngü koşulları

No	Gen	primer	Dizin 5'ten 3'e	Ürün	Koşullar
1	***bla*TEM**	F	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC	861	Adım 1: 95ºC, 2 dk. Adım 2: 94 ºC, 30 sn. Adım 3: 57ºC, 1 dk. Adım 4: 72ºC, 1 dk Adım 6: 72ºC, 5 dk. Adım 7: 4ºC, daima
		R	TAATCAGTGAGGCACCTATCTC		
2	***bla*SHV**	F	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	231	Adım 1: 95ºC, 2 dk. Adım 2: 94 ºC, 30 sn. Adım 3: 64ºC, 1 dk. Adım 4: 72ºC, 1 dk Adım 6: 72ºC, 5 dk. Adım 7: 4ºC, daima
		R	ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG		
3	***bla*CTX M1**	F	GACGATGTCACTGGCTGAGC	499	Adım 1: 95ºC, 2 dk. Adım 2: 94 ºC, 30 sn. Adım 3: 56ºC, 1 dk. Adım 4: 72ºC, 1 dk Adım 6: 72ºC, 5 dk. Adım 7: 4ºC, daima
		R	AGCCGCCGACGCTAATACA		

3.2 Metot

3.2.1 Hasta numunelerinin toplanması

Aralık 2021'den Şubat 2022'ye kadar geçen süreçte Babil'deki hem özel hem de devlet hastanelerinden (Al-Mass Laboratuvarı, Al-Hilla Eğitim Hastanesi, Al-Sadiq Hastanesi ve Al-Hashymia Genel Hastanesi) çeşitli klinik örneklerden ve yaş gruplarından Yara, yanık, kulak ve diyabetli ayak yarası olmak üzere toplam 112 sürüntü örneği alındı. Numuneler laboratuvara ulaşır ulaşmaz standart protokollere uygun olarak işlendi.

3.2.2 Kültür ortamının hazırlanması

Pseudomonas'ın tanımlanması için örneklerin tümü, kanlı agar, MacConkey agar ve setrimid agar besiyerlerine ekimi yapıldı. Kültürü agar besiyerinin yüzeyine yaymak için steril bir öze kullanıldı ve kültür 24 saat 37°C'de bir inkübatörde tutuldu (Jawetz *et al*. 2019).

Tüm kültür besiyerleri, üreticilerin talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Beyin kalp infüzyon broth besiyeri, genel araştırmaların yanı sıra bakterilerin aktivasyonu için kullanılmıştır (MacFaddin 2000). Bu besiyeri %15 gliserol içeriği ile ekstrakte edilen ve standart olarak kullanılan bakterilerin uzun süreli saklanması için de kullanılmıştır (Forbes *et al*. 2007).

Kanlı agar bakteri üremesi, izolasyonu, tanımlanması ve hemoliz türünün belirlenmesi için zenginleştirilmiş genel besi yeri olarak kullanıldı (Niederstebruch *et al*. 2017). Nutrient Broth, bakteri izolatlarının kültürü ve aktivasyonu da dâhil olmak üzere çeşitli deneylerde kullanılmıştır. Muller-Hinton agar besiyeri, antimikrobiyal duyarlılık testinde kullanıldı (MacFaddin 2000).

Nalidiksik Asit Setrimid Agar, *Pseudomonas aeruginosa* için seçici bir besiyeri olarak kullanıldı. Setrimid, temas bölgesinde katyonik bir deterjan olarak çalışan, yüzey

gerilimini azaltan ve bakteriyel membran proteinleri üzerinde çökeltici, kompleks oluşturucu ve denatüre edici etkilere sahip olan bir kuaterner amonyum tuzudur. *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki *Pseudomonas* türleri de dahil olmak üzere çok çeşitli bakterileri inhibe eder. *Pseudomonas* pyocyanin üretimi, *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesiyle oluşturulan Medium A (King *et al.* 1954), kullanılarak arttırılabilir. *P. aeruginosa*'nın seçici olarak kullanılabilmesi için % 0,1 setrimid ilavesini içeren Tech Agar'ın (Medium A) bir modifikasyonu olan Setrimid Agar'ı icat etti (Lowbury and Collins 1955). Bir süre sonra, son derece saf setrimidin mevcudiyeti, ortamdaki setrimid konsantrasyonunun azalmasına sebep oldu. İnkübasyonun sıcaklığı 37ºC'de tutuldu ve 18 ila 24 saat sürdü.

P. aeruginosa, mavi, suda çözünür, floresan olmayan bir fenazin pigmenti olan tipik piyosiyanin sentezi ile tanınabilir. Kolonyal formları ve aminoasetofenonun eşsiz üzüm benzeri kokusu ile birleştiğinde, kolay tanımlanabilir (Murray *et al*. 2003). Sadece bir *Pseudomona*s veya gram negatif bacil türünün pyocyanin pigmentini ürettiği bilinmektedir ve bu tür *P. aeruginosa*'dır. Bu nedenle, bu besiyerleri *P. aeruginosa*'nın tanımlanmasında önemli bir rol oynamaktadır.

50 izolatın tümü, *P. aeruginosa* izolasyonu için seçici besiyeri olarak kullanılan ve 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra setrimide agar ile tarandı ve *Pseudomonas* spp ve *P. aeruginosa*'nın 16S rRNA geni için spesifik primer çiftleri kullanılarak PZR ile doğrulandı.

3.2.3 Mikroskobik inceleme

Bakterilerin MacConkey, kan ve setrimid agar üzerinde üremesinden sonra şekilleri, büyüklükleri, dokuları ve koloni düzenlemeleri gözlemlendi. Tek bir koloni alındı, Gram boyama ile boyandı ve sedir yağı kullanılarak ışık mikroskobu (100x) altında incelendi ve pempe renkli, çubuk şekilli bakteriler gözlendi (Jawetz *et al*. 2019).

3.2.4 Oksidaz testi

Tek bir bakteri izolatı kolonisi, ahşap aplikatör çubukları ile bir parça filtre kağıdına aktarıldı ve ardından filtre kağıdına 2-3 damla %1 oksidaz reaktifi eklendi. 10 saniye içinde koyu mor bir rengin ortaya çıkması sonuçların pozitif olduğunu gösterirken, renkte bir değişiklik olmaması ise sonuçların negatif olduğunun kanıtıdır. Bu test, bakterilerin oksidaz enzimini üretme kapasitesine sahip olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır (Forbes *et al.* 2007).

3.2.5 Çözeltilerin hazırlanması

McFarland bulanıklık standardı No. 0,5, 1 mL % 1 sülfürik aside 0,05 mL % 1,175 baryum klorür [$BaCl_2.2H_2O$: H_2O (w/v, 1,175g: 9,95 mL)] eklenerek oluşturuldu [H_2SO_4: H_2O (v/v, 1 mL: 99 mL)]. 1,5 X 108 cfu/mL içeren bakteri süspansiyonunun bulanıklığı, 0,5 McFarland standardının bulanıklığıyla görsel olarak karşılaştırılarak bakteri yoğunluğu saptandı. Standart McFarland tüpleri, herhangi bir buharlaşmayı önlemek için parafilm ile hava geçirmez şekilde kapatıldı ve altı aya kadar oda sıcaklığında karanlıkta tutuldu. 0,5 McFarland standardının kesinliğini doğrulamak için bir spektrofotometre kullanıldı. 0,08 ile 0,1 arasında olması gereken optik yoğunluk 625 nm'de ölçüldü (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021). 1X TBE tamponu hazırlandı Uygun bir kapta 800 mL distile su hazırlandı, ardından 15,759 g Tris-Cl (istenen pH) ve 2,92 g EDTA (pH 8) solüsyona eklendi ve 1 L hacime ulaşana kadar saf su eklendi. Bu çözelti, agarozu çözmek için ve elektroforez işleminde kullanıldı. Her 100 mL 10X TBE, 900 mL steril distal suya ilave edilerek nihai konsantrasyon, 1X TBE elde edildi (Green and Sambrook 2012).

3.2.6 Moleküler metot

P. aeruginosa'dan genomik DNA izolasyonu, Genomik DNA, Favorgen (Tayvan) kiti kullanılarak bakteri izolatlarından ekstrakte edildi. DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce bakteri aktivasyonu yapıldı. Bu amaçla kültür, 10 mL beyin kalp infüzyon broth

ortamına ekildi ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Bakteri kültürü 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp 1 dakika 13,000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Ardından çökelti Eppendorf tüplerine aktarıldı ve santrifüjlendi. Böylece hücre lizatı saflaştırıldı. DNA izolasyonu, Gram negatif bakteri Genomik DNA Mini Kiti protokolüne göre aşağıdaki gibi yapıldı.

- Saflaştırılmış hücre lizatı üzerine 200 µL FTAG tamponu eklendi ve pelet vortekslenerek yeniden süspanse edildi ve ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Numuneye 200 µL FABG tamponu eklendi ve 5 saniye vortekslendi. 70°C'de 10 dakika inkübe edildi, inkübasyon sırasında tüp her 3 dakikada bir ters çevrildi.
- Gerekli elüsyon tamponu 70°C'de önceden ısıtıldı.
- Numuneye 200 µL etanol (%96-100) eklendi ve 10 saniye boyunca vortekslendi.
- Numune karışımı toplama tüpünün içine konularak FABG sütununa aktarıldı, toplama tüpünü attıktan sonra 14,000 rpm hızında santrifüjlendi ve FABG sütunu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- FABG sütununa 400 µL W1 Tamponu eklendi ve 30 saniye boyunca 14,000 rpm hızda santrifüjlendi ve FABG sütunu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- FABG kolonuna 600 µL yıkama tamponu eklendi ve 14,000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi ve FABG sütunu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Kurutmak için sütun 14,000 devir/dak hızında 3 dakika daha santrifüjlendi. Bu adım, sonraki enzimatik reaksiyonların artık sıvı tarafından inhibe edilmesini önlemek için önemlidir.
- Toplama tüpü atıldı ve kuru FABG Sütunu yeni bir 1,5 mL mikrosantrifüje (Eppendorf tüpü) yerleştirildi.
- FABG sütununun membran merkezine 100 µL önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklendi. Etkili elüsyon açısından önemli olan bu adım için elüsyon solüsyonunun membran merkezine dağıldığından ve tamamen emildiğinden emin olunmalıdır. FABG sütunu bir inkübatörde 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- DNA ayrıştırılmak için tam hızda 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- FABG tüpü atıldı ve ayrıştırılmış DNA içeren mikro santrifüj tüpü 4°C'de muhafaza edildi.

Elde edilen DNA izolatlarının konsantrasyonu cinsinden tespit etmek için ekstrakte edilen DNA'nın 1 µL'sinin nanodrop cihazına yerleştirilerek belirlendi. DNA örneklerinin protein ile kontaminasyonunu kontrol etmek için O.D. 260/280 oranının gözlemlenmesiyle DNA'nın saflığı belirlendi; saf DNA için kabul edilebilir 260/280 oranı 1,7 ile 2,0 arasındaydı (Shim *et al.* 2010).

Çizelge 3.7 ve 3.8 de verilen liyofilize ileri ve geri primerler, 100 pM/µL'lik (stok çözeltisi olarak) nihai bir konsantrasyon elde etmek için şirket talimatlarındaki gibi uygun bir steril ddH_2O hacmi ile süspanse edildi. 10 µM konsantrasyon hazırlamak için, çalışma astarı olarak 10 µM'lik bir nihai konsantrasyona ulaşmak için 90 µL ddH_2O içinde 10 pM/µL yeniden süspanse edildi. PZR reaksiyon karışımı, Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi üreticinin talimatına (Promega, ABD) göre hazırlandı.

Çizelge 3.9 Moleküler tanımlama için reaksiyon karışımı

PZR	Hacim (µL)
Master mix	12,5
Nükleaz içermeyen Su	6,5
İleri primer	2
Geri primer	2
Örnek DNA	4
Toplam	25

Spesifik primer çiftleri kullanılarak hedef DNA'yı amplifiye etmek için (Polymerase chain reaction) PZR kullanıldı. PZR tipik olarak PZR ürününü (amplikon) elde etmek için tekrarlanan döngülerin ardışık üç adımından (Denatürasyon, Yapışma ve Uzama) oluşur. PZR termal döngü koşulları ve ürün boyutları Çizelge 3.7'de ve 3.8'de belirtilmiştir. PZR ürünlerinin boyutu (5µL), 10x TBE tamponu kullanılarak elektroforez ile %1,5 (a/h) agaroz jel içinde analiz edildi ve Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (Bioner, Kore) ile boyanarak görselleştirildi. Ürün boyutu, Gene Ruler 100 bp DNA markör (Bioner, Kore) ile karşılaştırılarak belirlendi.

PZR ürünlerini görüntülemek için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Agaroz jel %1,5 hazırlandı (0,2-1 kb), 100 mL 1X TBE tamponu eklendi berrak olana kadar mikrodalgada

ısıtıldı. Agaroz 50–55°C'ye soğutulduktan sonra 200 µL Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (Bioneer, Kore) eklendi. DNA amplifikasyon ürünlerinin görüntüleme aşamaları aşağıda verilmiştir.

- Jel döküm tepsisi plastik tepsiye yerleştirildi, tarağın dişlerinin jel tabanından yaklaşık 0,5 mm yukarıda olduğu kontrol edildi.
- 500 mL deiyonize suya 50 mL TBE (10X) stok solüsyonu eklenerek 500 mL TBE (1X) hazırlandı.
- 100 mL tampon, 500 mL'lik bir şişeye ilave edildi ve 1,5 g agaroz (PZR ürünü için) ilave edildi. Agaroz, çözeltiyi hot plate üzerinde yaklaşık 10 dakika ısıtarak (mikrodalgada) eritildi.
- Agaroz solüsyonu yaklaşık 50°C'ye soğutuldu ve 200 µL Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (Bioneer, Kore) eklendi. Agaroz jel döküm tepsisine yavaşça döküldü. Hava kabarcıkları sarı uçla çıkarıldı.
- Tarak jelin kenarından yaklaşık 1,5 cm uzağa yerleştirildi. Agaroz yaklaşık 20-30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Agaroz katılaştıktan sonra, jeli yırtmamaya dikkat ederek, nazik bir ileri geri hareketle tarak çıkarıldı.
- Jel döküm tepsisi çıkarıldı ve tepsi, jel kutusunun merkezi destek platformuna yerleştirildi.
- Elektroforez tamponu, jel yüzeyinin 0,5–1 cm üzerinde bir seviyeye ulaşıncaya kadar tampon haznesine eklendi.
- Numuneler, bir filtre ucu (10 µL) kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Uç, kuyunun hemen üzerindeki elektroforez tamponunun yüzeyinin altına yerleştirildi. Numune yavaşça koyuldu ki kuyunun dibine batması sağlandı.
- Jelin bir tarafına (numune hattını çevreleyen) 5 µL'lik DNA markör ve diğer tarafına (kuyuya) 5 µL PZR ürün numunesi yüklendi.
- Kapak jel kutusunun üzerine yerleştirildi ve elektrotları bağladı. Güç kaynağı açıldı.
- Elektroforez, izleme boyası jel uzunluğunun en az 10 cm'sini hareket ettirene kadar devam etti. Süre sonunda jel görüntüleme sistemiyle (UV-trans illuminator (Clever) görüntülendi.

3.2.7 Antibakteriyel direnç/duyarlılık testi

Disk difüzyon yöntemi (Muller Hinton agar) kullanılarak antibiyotiklere direncin saptanması için *P. aeruginosa*'nın konvansiyonel duyarlılık testleri yapılmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile Piprasilin (100 µg), Seftazidim (30 µg), Aztreonam (30 µg), İmipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Gentamisin (10 µg), Amikasin (30 µg), Netilmasin (30 µg), Siprofloksasin(5 µg), Levofloksasin (5 µg) gibi 11 farklı antibiyotiğe antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) uygulandı. Klinik laboratuvar Patojenik Bakteri Standartları Enstitüsü 2021'e (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021) göre inokulumun 0,5 McFarland'a ayarlanmasından sonra kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Antibiyotik difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer duyarlılık testi), daha önce tanımlanmış bakteri organizmasının saf bir kültürü kullanıldı. Setrimid agar plakaları üzerindeki koloniden et suyuna ekim yapıldı. Orta bulanıklıkta 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu üretmek için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Regüle edilen kültürden bir inokulum elde etmek için steril bir sürüntü kullanıldı, bu inokulum daha sonra Müeller–Hinton plakasına yerleştirildi ve kurumaya bırakıldı.

Antibiyotik diskler, alevde steril edilmiş forseps veya disk aplikatörü ile eşit aralıklarla besiyerinin yüzeyine yerleştirildi, inkübasyon genellikle bir gece boyunca 37°C'de yapıldı. Antibiyotik inhibisyon bölgeleri cetvel kullanılarak ölçüldü, organizmanın her antibiyotiğe duyarlılığını veya direncini bulmak için bölge büyüklüğü standart bölgelerle (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021) karşılaştırıldı.

3.2.8 β-laktamaz üretiminin fenotipik tespiti

Klasik β-laktamaz inhibitörlerinin (Klavulanik asit, tazobaktam) β-laktam antibakteriyel ile kombinasyon halinde kullanılması, şu anda β-laktamaz aracılı dirençle mücadelede en başarılı stratejidir (Bebrone *et al*. 2010). Bu işlem, (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021) tarafından önerilen prosedüre uyularak 9 cm çapında Muller Hinton agar

plakasında yapılmıştır. Tek başına β-laktam diskleri (Piperasilin, Seftazidim ve Tikarsilin) ve β-laktam+β-laktamaz inhibitör diskleri (Piperasilin-Tazobaktam, Seftazidim-Tazobaktam ve Tikarsilin-Klavulanat) içeren bir diskler 20 mm mesafeyle yerleştirildi. 37°C'de gece inkübasyonundan sonra, tek başına β-laktam diske kıyasla kombinasyon disklerinin inhibisyon bölgesinde 5 mm'lik bir artışın, Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz içerdiği sonucuna varılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İzolasyon

Bu çalışmada, Babil şehrindeki hastanelerden (Al-Mass Laboratuvarı, Al-Hilla Eğitim Hastanesi, Al-Sadiq Hastanesi ve Al-hashymia Genel Hastanesi) çeşitli klinik örneklerden toplam 112 farklı sürüntü rastgele seçilmiş ve incelenmiştir. Bu klinik örneklerin dağılımı yara 35 adet, diyabetik ayak 22 adet, yanık 43 adet ve orta kulak iltihabı 12 adet şeklindedir. Elde edilen örnekler Çizelge 4.1 de verilmiştir.

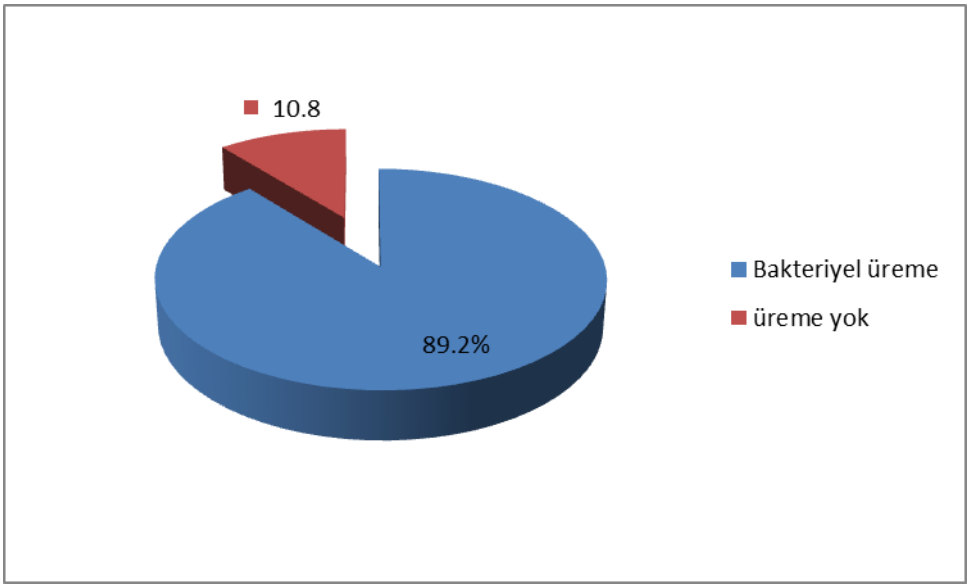
Çizelge 4.1 Farklı klinik örnekler arasında *P. aeruginosa*'nın dağılımı

Hastalık	Örnek Tipi	İzolat sayısı	Pozitif Kültür	Oran
Yanık enfeksiyonu	Yanık sürüntüsü	43	28	%56
Kulak enfeksiyonu	Kulak sürüntüsü	12	3	%6
Diyabetik ayak	Diyabetik ayak sürüntüsü	22	7	%14
Yara enfeksiyonu	Yara enfeksiyonu sürüntüsü	35	12	%24
Total		112	50	%100

Bu tezde, *P. aeruginosa*'nın en yüksek izolasyon yanık örneklerinde %56 oranında olduğunu ortaya koyulmuştur. Saleh vd. (2012), *P. aeruginosa*'nın yanık enfeksiyonlarının %51,21'ini oluşturduğunu, (Fazeli and Momtaz 2014) *P. aeruginosa*'nın yanık örneklerin %50 oranında, Azeez ve Bakr (2019) %32 oranında sorumlu olduğunu bildirmiştir. Diğer raporlarla karşılaştırıldığında, bu çalışmada *P. aeruginosa*'nın yaradan izolasyon oranının %24 olduğu görülmüş, bu sonucun yara örneklerinde *P. aeruginosa* prevalansının %29,54 olduğunu bildiren Dehbashi vd. (2020)'un çalışmasındaki sonuçla paralel olduğu, Karami vd. (2019)'nin çalışmasında da benzer sonuç bulunduğu ve bu sonucun İran, Ahvaz'da *P. aeruginosa* prevalansının %61,33 olduğu yara enfeksiyonlarından kaynaklandığını bildiren Khosravi vd. (2016) çalışmasından daha düşük çıktığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa*'nın kulak enfeksiyonlarından izolasyon %6 oranında saptanmış, bu sonuç, farklı klinik örneklerden

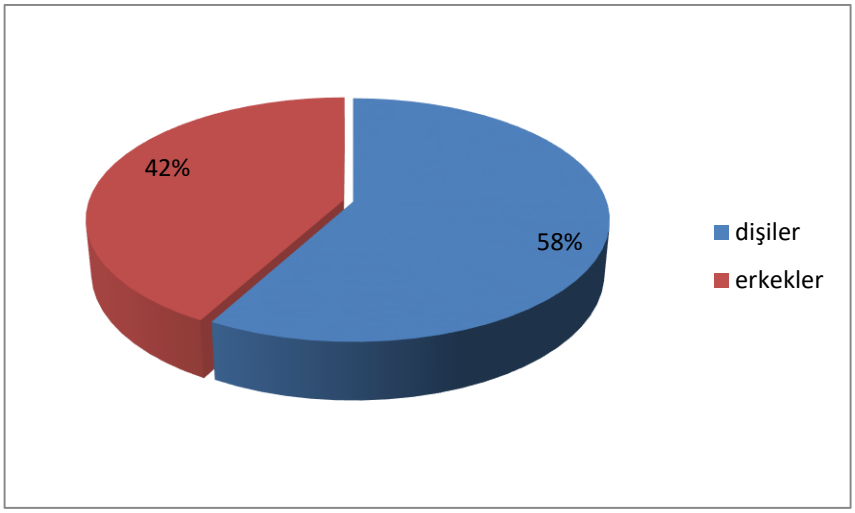
kulak enfeksiyonu örneği oranı %3,70 olan toplam 54 klinik *P. aeruginosa* izolatı elde eden Alhusseini vd. *(*2019) çalışması ile benzerlik göstermiştir.

Örneklerin 100'ünde (%89,2) pozitif bakteri üremesi görülürken, örneklerin 12'sinde (%10,8) bakteri üremesi görülmemiştir. Örnek tiplerine göre izolat sayısı ve *P.aeruginosa* pozitif kültür sayısı Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu sonuç, % 91,3 üreme oranı tespit eden Shehab ve Jassim (2019)'in sonucu ile benzer çıkmıştır.



Şekil 4.1 Bakteri üremesi pozitif ve negatif olan örneklerin yüzdeleri

Bu çalışmada 50 adet *P. aeruginosa* izolatı saptanmıştır. Cinsiyete göre bakıldığında örneklerin dağılımı kadınlarda 29 (%58), erkeklerde 21 (%42) örnek saptanmıştır (Şekil 4.2). Genel olarak, enfeksiyonlar kadınlarda erkeklere kıyasla daha yaygın olarak görülmektedir. Hastaların cinsiyetine göre insidansın yüzde dağılımının sonuçları Shehab ve Jassim (2019) bulguları ile aynı çıkmıştır. Buna karşılık, Zahedani vd. (2018), erkeklerde %43 ve kadınlarda %57'lik bir oran gözlemlemiştir. Bu farklılıktaki olası nedenler, incelenen nüfus türlerine, farklı coğrafi konumlara, hastane türlerine bağlı olabilir Manandhar vd. (2017) (Şekil 4.2).

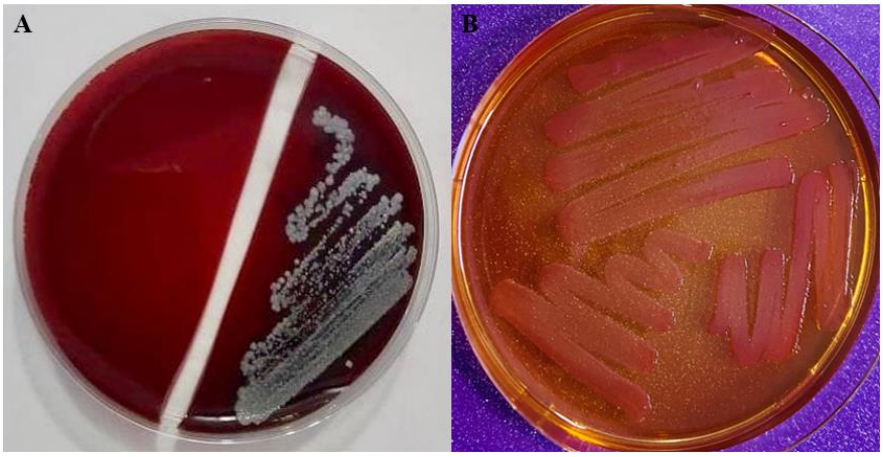


Şekil 4.2 Örneklerin cinsiyete göre dağılımı

4.2 *P. aeruginosa*'nın İdentifikasyonu

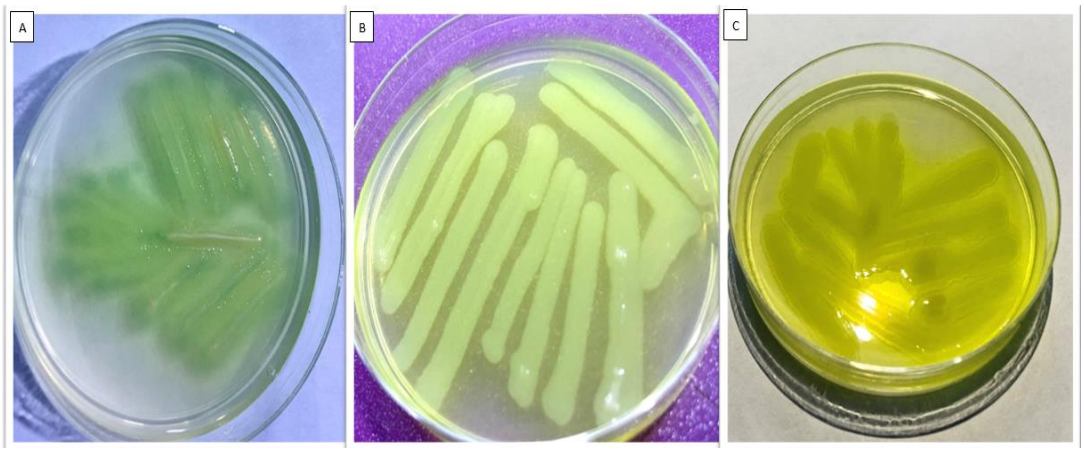
Bu çalışmada kanlı agar, MacConkey agar ve setrimid agarı dahil olmak üzere çeşitli kültür ortamlarında yetişen kolonilerin morfolojik özellikleri incelendi. Kan agarında, koloniler beyazdan griye veya koyu renge kadar bir renk aralığına sahip bakteriler olarak ortaya çıkarken ve 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra yapışkan bir dokuya sahip oldukları gözlemlendi.

Ek olarak, kanlı agarda hemoliz özellikleri belirlendi. MacConkey agarda, organizmalar kültür ortamında bulunan laktoz şekerini fermente edemedikleri için soluk bir görünüm gösterdi. Ayrıca, fermente üzüm kokulu ve soluk bir görünüme sahiplerdi Jawetz vd. (2019). Besiyerleri görüntüler Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3 *P. aeruginosa* kolonilerinin morfolojik özellikleri **(A)** Kanlı agar **(B)** MacConkey agar

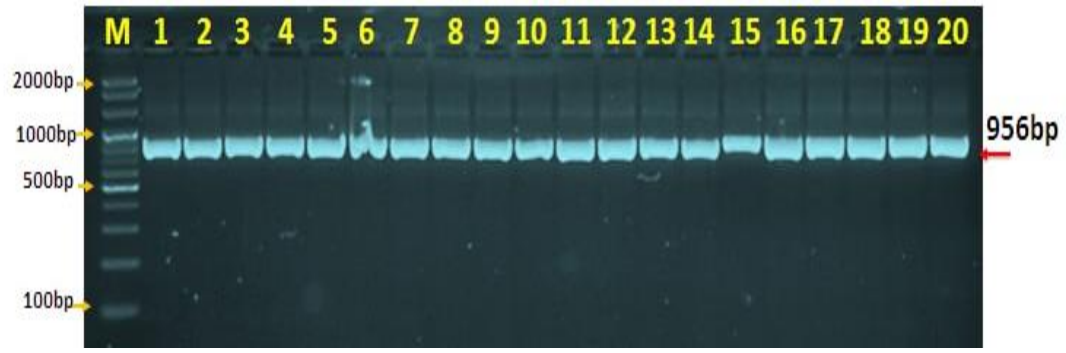
Setrimid agarda mukoid, düz kenarlı, yükseltilmiş bir merkeze sahip pürüzsüz bir şekilde, kremsi bir reng ve meyve kokusu belirlendi. Setrimid agar, *P. aeruginosa*'nın izolasyonu ve tanımlanması için seçici bir ortamdır. Pepton, $MgCl_2$, K_2SO_4, setrimid, agar ve bir şişe nalidiksik asit seçici takviyesinin (FD130) rehidre edilmiş içeriğinden oluşur. Bu ortam diğer mikrobiyal flora türlerini inhibe eder ve *P. aeruginosa*'yı izole etmek için kullanılır. *Pseudomonas spp.* ve *P. aeruginosa*'nın iki metabolitinin bir karışımı olan mavi-yeşil bir pigment üretir: piyosiyanin (mavi) ve piyoverdin (yeşil). Bu pigment, kültürlere karakteristik renklerini vermekten sorumludur. Bu sonuç Irak'taki önceki çalışmalarında *P. aeruginosa'*nın teşhisi için setrimid agar ve diğer ortamlar kullanılan Al-Rubaye vd. (2015) çalışmalarındaki sonuçlara benzerdir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *P. aeruginosa* kolonilerinin setrimid agar üzerindeki morfolojik özellikleri

4.3 *P. aeruginosa*'nın Moleküler Tanımlanması

P. aeruginosa'nın pigment üretimi olan setrimid agarında büyüme temelinde 50 bakteri bakteri izolatından, türe özgü 16S rRNA genini tespit etmek için, Favorgen (Tayvan) DNA kiti kullanılarak DNA, ekstrakte edildi. Daha sonra DNA konsantrasyonunun ve saflığının ölçümü yapıldı. Tüm bu izolatların DNA konsantrasyonu 50-110 ng/µL ve DNA'nın saflığı 1,7-2,1 olarak belirlendi. Daha sonra sonuçları Şekil 4.5'te gösterildiği gibi jel elektroforezi ve görüntüleme yapıldı.



Şekil 4.5 *P. aeruginosa* 16S rRNA amplikonunun (956 bp) %1,5 agaroz jel elektroforezi görüntüsü

PZR çalışması sonucunda, tüm izolatların (%100) *P. aeruginosa* olduğu belirlendi. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5'de verildi. Ayrıca, 5 izolattan oluşan amplikonlarda gen dizisine bakıldı. Sonuçlar tüm izolatların *P. aeruginosa* olduğunu ve kayıt numarası No. (ON808419–ON808423) ile Genbankasına kayıtlı olduğunu ortaya koydu. Böylece setrimide agar ve PZR yöntemleri birleştirilerek, *P. aeruginosa*'nın daha kısa sürede tanımlanmasına ve ölçülmesine izin veren pratik, uygun maliyetli ve güvenilir bir yöntem kullanılmıştır.

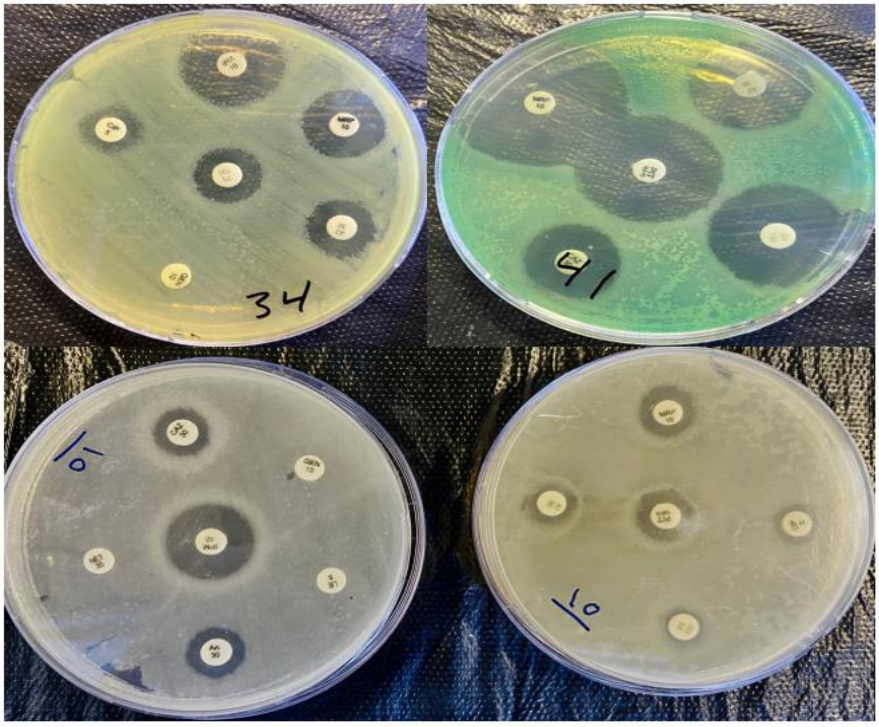
4.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık paternleri, uygun antibiyotiği seçmek için yararlı bir kılavuz görevi görmüştür. *P. aeruginosa*, her türlü yaranın tedavisi için ciddi bir terapötik zorluk teşkil

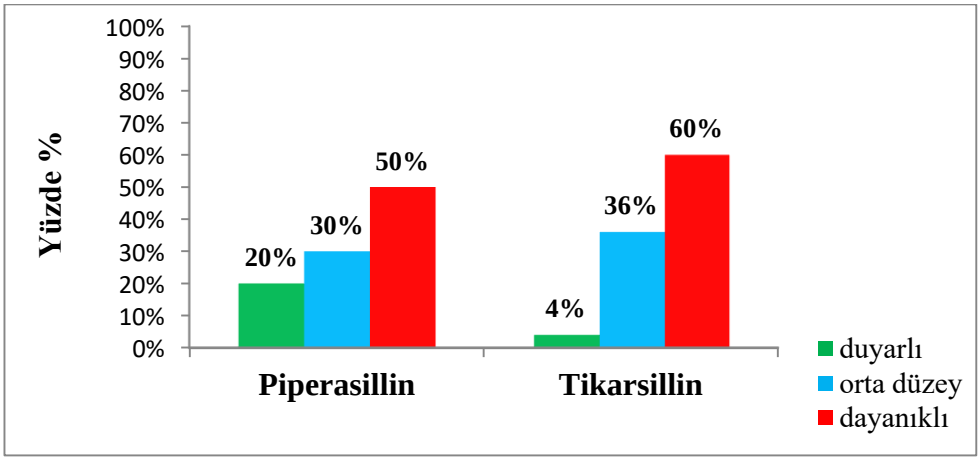
eder ve klinik sonucu optimize etmek ve tedaviyi başlatmak için uygun antibiyotiğin seçimi esastır (Ozer *et al*. 2012).

En uygun antibiyotiğin seçimi, *P. aeruginosa*'nın çeşitli mekanizmalar yoluyla direnç özellikleri kazanma yeteneği ile zorlaşmaktadır. Belgelenen tüm antibiyotik direnç stratejileri, bu patojende (adaptif, edinilmiş ve içsel) birçok kez tek bir izolatta belirlenmiştir (Raziq 2017).

P. aeruginosa'nın 50 örneği, 6 antibiyotik sınıfına ait 12 temel antibiyotiğe karşı test edildi. Antibiyogram testleri (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021)'e göre disk difüzyon testi ile yapıldı. Bu analizde piperasilin 100 µg, seftazidim 30 µg, Sefepim 30 µg, aztreonam 30 µg, İmipenem 10 µg, meropenem 10 µg, gentamisin 10 µg, amikasin 30 µg, netilmisin 30 µg, siprofloksasin 5 µg, levofloksasin 5 µg, tikarsilin 75 µg antibiyotik diskleri kullanıldı. İnhibisyon çapı zonları cetvel ile ölçüldü ve bulgular (Clinical and Laboratory Standards Institute 2021)'e göre değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre piperasilin %50, tikarsilin %60, seftazidim %60, sefepim %34, aztreonam %40, imipenem %22, meropenem %22, gentamisin %52, amikasin %40, netilmisin %36, siprofloksasin %28 ve levofloksasin %36 oranında 50 izolatın dirençli olduğu bildirilmiştir. Elde edilen antibiyogram görüntüleri Şekil 4.6'da ve sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir.



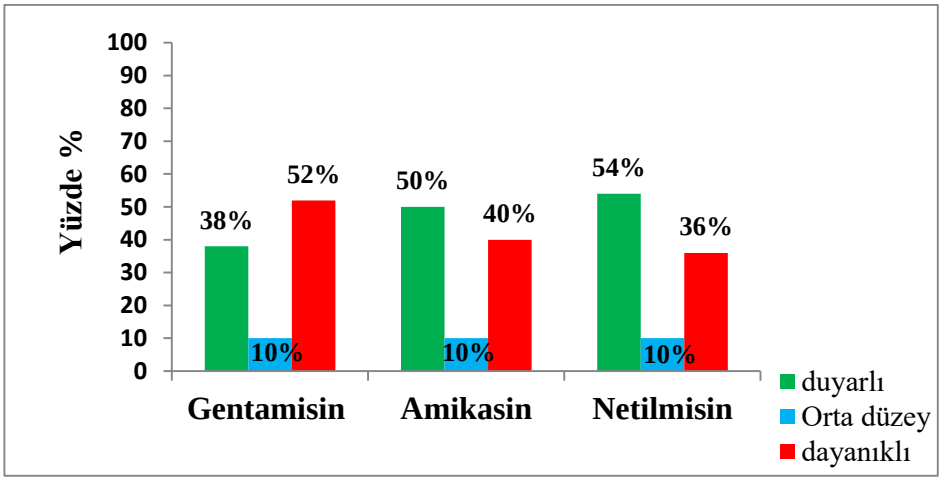
Şekil 4.6 Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.7 *P. aeruginosa* izolatlarının penisilin sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları

Sonuçlar, *P. aeruginosa*'nın Piperacillin'e 25/50 (%50) oranında dirençli olduğunu gösterdi. Bu çalışmanın sonuçları, yerel olarak *P. aeruginosa* izolatlarının piperacillin'e %52,9 direnç gösterdiğini tespit eden Hasan (2019) çalışmasıyla örtüşmektedir. Senthamarai (2014) tarafından yapılan Piperasilin direnç oranı (%59,61) olarak bulunan çalışmaya yakındır, ancak, *P. aeruginosa* suşlarının piperasiline %90,4 oranında ve tikarsiline %60 oranında dirençli olduğunu bulan Bunyan vd. (2018) sonuçlarının aksine

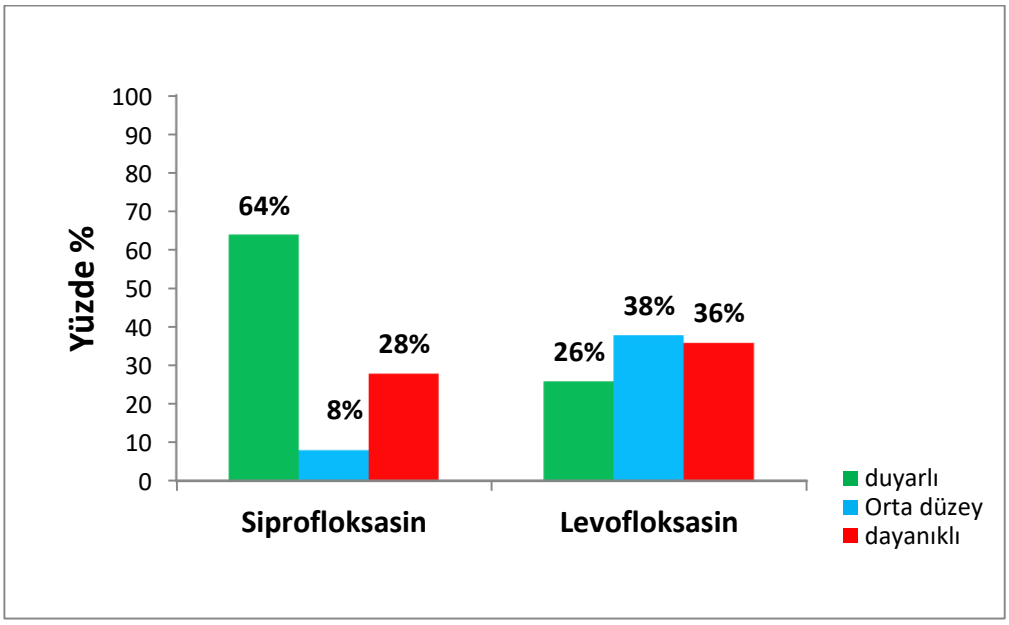
P. aeruginosa izolatlarında Shehab ve Jassim (2019) %59,2 direnç oranı ile ve Khan ve Faiz (2016) 55% oranında direnç belirleyen çalışmaları ile benzer buunmuştur. Al-Agamy vd. (2012) %35 oranında direnç bulan çalışma sonuçlarından ise yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.8 *P. aeruginosa* izolatlarının aminoglikozid sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları

Aminoglikozitler, ribozomun 30S alt birimine bağlanarak bakteri hücrelerinde protein sentezini ve *Pseudomonas* spp.'deki aminoglikozid direncini inhibe eder. Üç tip aminoglikozit modifiye edici enzim vardır: (1) Bir amino grubunun asetil-Coa'ya bağımlı asetilasyonunu katalize eden N-Asetiltransferazlar (AAC); (2) Hidroksil grubunun ATP-bağımlı adenilasyonunu katalize eden O-Adenililtransferazlar (ANT); (3) Bir hidroksil grubunun ATP-bağımlı fosforilasyonunu katalize eden O-Fosfotransferazlar (APH) (Shete *et al.* 2017). Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatları Gentamisine %52, amikasine %40 ve nitlamsine %36 oranında direnç gösterdi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir. Çalışmada belirlediğimiz %52 Gentamisin direnç oranı, Salman vd. (2017) çalışmalarında belirledikleri %60 Gentamisine direnç oranı ile uyumlu iken, Al-Fahdawi ve Allawi (2019) çalışmalarında belirledikleri %34,3 gentamisin direnç oranıyla uyuşmamaktadır. Çalışmada %40 oranında amikasin direnci belirlenirken bu sonuç Juhi vd. (2009) çalışmasında belirledikleri %30 direç oranı ile benzerken, Corehtash vd. (2015)'in belirlediği %82 direnç oranı sonucu ile uyumsuzdur. Bu çalışmada Nitlamisin için direnç oranı %36 olarak bulundu, bu sonuç İran-Tahran'da yapılan Saderi ve Owlia

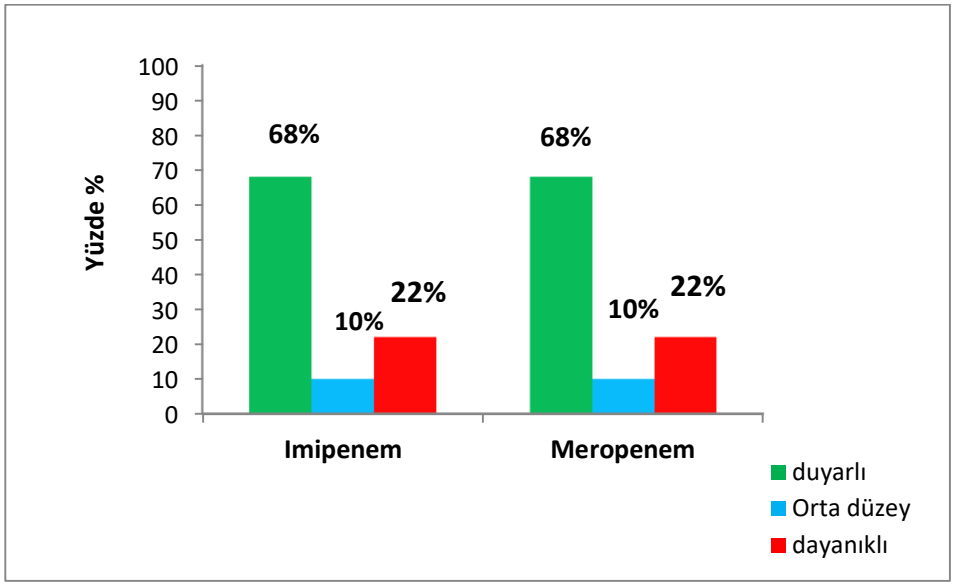
(2015) çalışmasındaki %36,4 direnç oranıyla ve yine %33,6 oranında direnç bulan Holbrook ve Garneau-Tsodikova (2018) çalışmasıyla yakınken Juhi ve. (2009) çalışmasında kaydedilen %60 direnç oranıyla uyumsuzdur (Şekil 4.8).



Şekil 4.9 *P. aeruginosa* izolatlarının florokinolonlar sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılıkları

Çalışmadaki florokinolonlara direnç siprofloksasin için % 28 ve levofloksasin için % 36 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. Bu sonuçlar Shehab ve Jassim (2019) çalışmasındaki %28,6 direnç oranıyla uyumlu fakat Othman vd. (2014) çalışmasında kaydedilmiş %61,3 Siprofloksasin direnci oranıyla uyumsuzdur. Levofloksasin için bulunan %28 direnç oranı, Dash vd. (2014) tarafından kaydedilen %36 oranı ile uyumlu, Yayan vd. (2015) çalışmasında kaydedilen %30,6 direnç oranıyla yakın, Khadim ve Marjani (2019) çalışmasında bulunan %57,14 direnç oranı ve Hussein vd. 2018) çalışmasındaki %60,19 direnç oranıyla uyumsuzdur. Florokinolonların geniş bir aktivite aralığı vardır ve *P. aeruginosa*'ya karşı aktif olduğu bulunmuştur. Bakteriyel DNA girazı veya topoizomeraz II'yi, orada DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engelleyerek inhibe eder. Florokinolonlara karşı direnç, mutasyonun bir yansımasıdır (Nguyen *et al.* 2018).

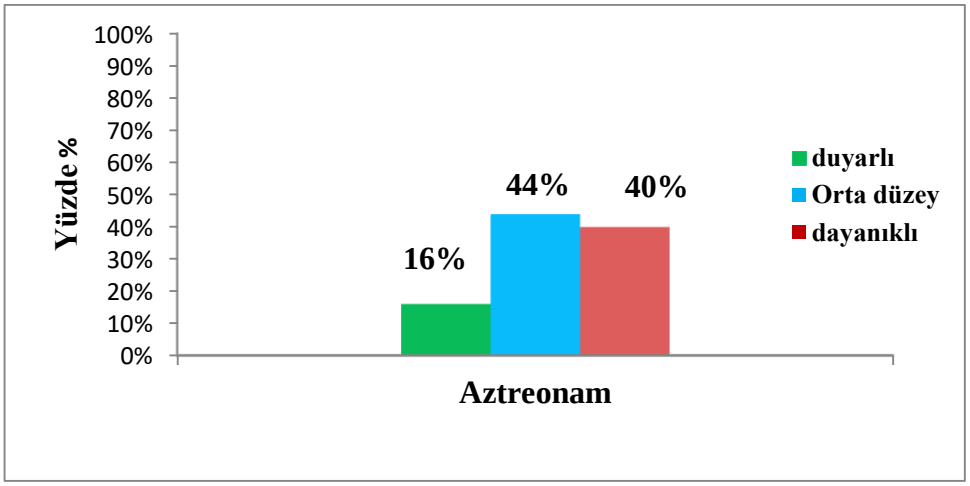
Bu tezde elde edilen sonuçlar karbapenemlere karşı direncin, imipenem ve meropenemlerde %22 oranında olduğunu gösterdi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. *P. aeruginosa*'nın İmipenem'e karşı direnci Savari vd. (2016) çalışmasındaki sonuçla %22 oranında tam örtüşürken Ismail ve Mahmoud (2018)'un Bağdat'ta yaptığı çalışmanın sonucuna %26,1 oranında oldukça yakın çıkmasına rağmen, Shehab ve Jassim (2019) çalışmasında %42,9 oranıyla örtüşmemiştir. Meronepem direnci %22 oranında bulunmuştur. Bu sonuç Hosu vd. (2021) raporladığı %24 direnç oranıyla uyumluyken Bunyan vd. (2018)'in %76 direnç sonucuyla uyumsuzluk gösterdi. Karbapenemler (imipenem, meropenem), esas olarak *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan bir β-laktam ailesinin üyeleridir. *Enterobacteriaceae*'ye benzer şekilde, karbapenemaz enzimleri *P. aeruginosa* suşlarında tanımlanmıştır ve antibiyotik direncinden sorumludur.



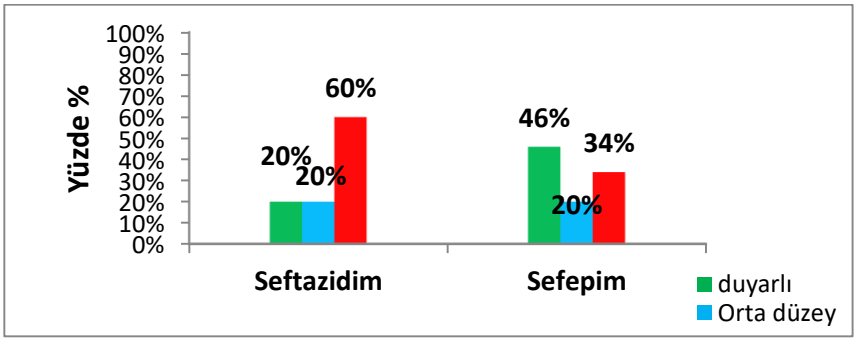
Şekil 4.10 *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenem sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılığı

Şekil 4.11'de gösterildiği gibi aztreonam'a karşı gösterilen direnç %40 oranında belirlenirken, benzer bir sonuç Saderi ve Owlia (2015) tarafından %43 oranında ve Kateete vd. (2017) tarafından %48 oranında direnç bildirilmiştir. Khosravi vd. (2016)'nin İran'ın Ahvaz şehrinde yaptığı çalışmada bu sonuçlarla örtüşmeyen daha yüksek %66,6

oranında bir direnç rapor edilmiştir. *P. aeruginosa* gibi gram-negatif bakteriler, hidrolitik enzim β-laktamazı kodlayan, uyarılabilir bir AmpC genine sahiptir. Bu enzim, bir β-laktam halkasının amid bağını kırarak, β-laktam antibiyotiklerin inaktivasyonuna yol açar ve bu da aztreonam, piperasilin ve seftazidime direncini açıklar (Pang *et al*. 2019).



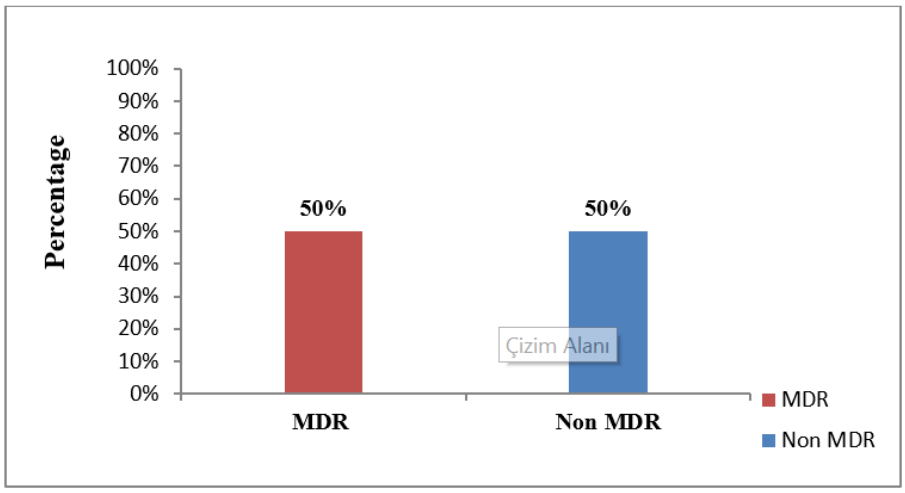
Şekil 4.11 *P. aeruginosa* izolatlarının Aztreonam antibiyotiğine duyarlılıkları



Şekil 4.12 *P. aeruginosa* izolatlarının Sephemler sınıfı bazı antibiyotiklere duyarlılığı

Mevcut çalışma, üçüncü nesil sefalosporin seftazidim için *P. aeruginosa* izolatlarının %60 oranında dirençli olduğunu göstermiştir. Bu direnç oranı Shehab ve Jassim (2019) tarafından yapılan çalışmada buldukları %59,2 oranı ile ve Hosu vd. (2021) belirledikleri 50% direnç oranı ile uyumlu bulunmuştur. Hasan (2019) çalışmasında %94,1 oranında direnç belirlemiş bu sonuç bu tezde bulunandan daha fazladır. Sefepim direncinde ise kaydedilen sonuçlar mevcut çalışmada %34 oranı ile Dehbashi vd. (2020)'un bulduğu %30,68 direnç oranı ile uyumludur(Şekil 4.12).

Çoklu ilaç direnci (MDR), kapsamlı ilaç direnci (XDR) ve pan ilaç direnci (PDR)olmak üzere üçlü direnç paterni vardır. Bu çalışmada, *P. aeruginosa* izolatları arasında çoklu ilaca dirençli olma oranı % 50'dir (25/50) ve nispeten yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen analiz sonuçları Şekil 4.13'de verilmiştir. Çoklu ilaca dirençli MDR, üç veya daha fazla antimikrobiyal kategoride en az bir ajana karşı kazanılmış duyarlılık olarak tanımlanmıştır. Bu sonuç, MDR oranını %51,7 bulan Karami vd. (2019) ve İran'ın Tahran şehrinde çalışma yapan %54,5 oran belirleyen Saderi ve Owlia (2015) çalışmasıyla benzerdir. Elde etideln sonuç Khan ve Faiz (2016)'in Suudi Arabistan'da yaptığı araştırmada bulunan %10,7 oranından yüksek, Batı Yemende %65,2 oran bulunan Nasser vd. (2018) çalışmasından düşüktür. *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı yüksek direnci, iyileşmede yaşanan en büyük sorunlardan biridir ve bunun nedeni, daha önce bahsedilen, çok çeşitli antibiyotiklere karşı bu antibiyotiklerin kötü kullanılması sonucu doğal direnç gelişmesi ve ayrıca hastalarda üçüncü nesil sefalosporine karşı direnci artıran Genişlemiş spektrumlu β-laktamazın olması gibi birçok nedenden kaynaklanır. *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaç direnci, hastanelerde ölüm oranının % 25'ten % 60'a yükselmesine neden olmuştur (Nathwani *et al.* 2014) (Şekil 4.13).



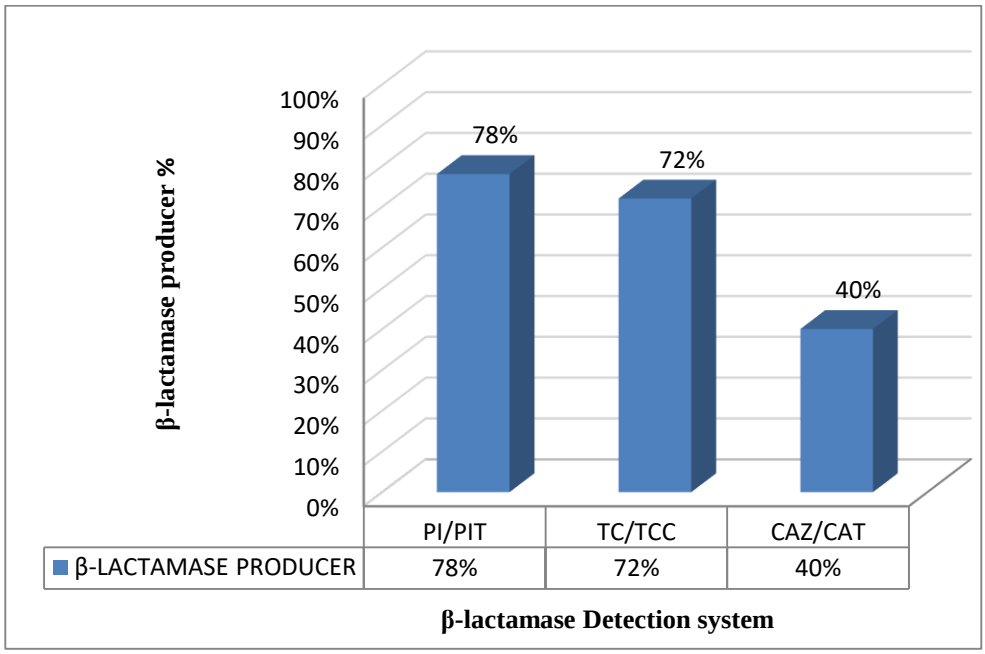
Şekil 4.13 *P. aeruginosa* izolatları arasında MDR dağılımı

4.5 β-Laktamaz Enziminin Fenotipik İncelenmesi

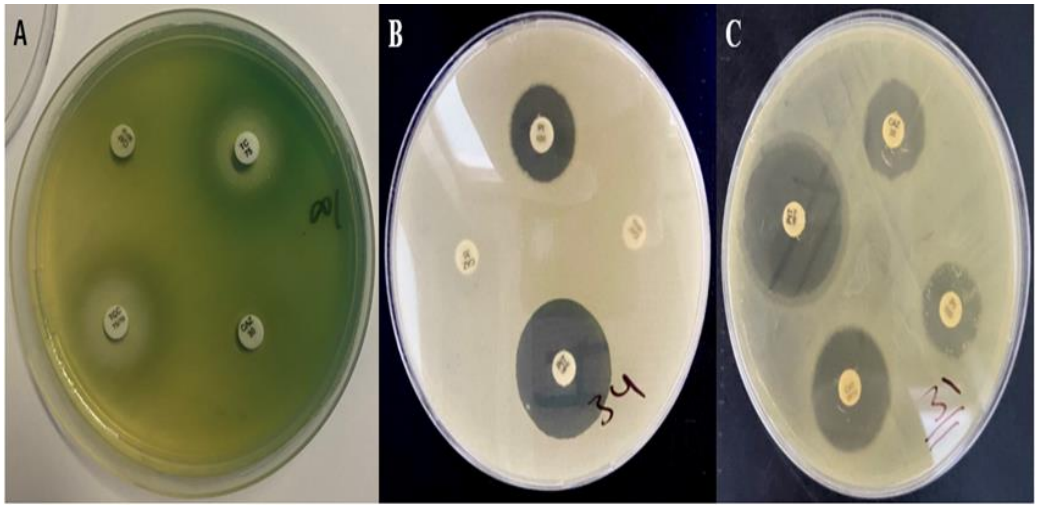
Beta-laktamaz sentezi hala β -laktam antibiyotiklere karşı dirence katkıda bulunan en önemli bileşendir. β -laktamaz aracılı dirençle mücadelede en etkili teknik, β-laktam

antibakteriyelleri ile birlikte geleneksel β-laktamaz inhibitörlerini (Klavulanik asit, Tazobaktam) kullanmaktır (Bebrone *et al.* 2010).

β-laktam+β-laktamaz inhibitörünün zon çapında tek başına β-laktama göre ≥5 mm'lik bir artış, β-laktamaz pozitif olduğunu gösterir, eğer zon çapı ≥5 mm'den az ise negatif β-laktamaz anlamına gelir. Bu tezde kullanılan 3 sistem: (piperasilin/piperasilin tazobaktam (PI+PIT), seftazidim / seftazidim -tazobaktam (CAZ+CAT) ve tikarsilin /tikarsilin-klavulanat (TC+TCC) şeklindedir. Sonuçlar, piperasilin/piperasilin-tazobaktam'ın 39 (%78), seftazidim/seftazidim-tazobaktam'ın 20 (%40)ve tikarsilin/tikarsilin-klavulanat'ın 36 (%72) izolatın β-laktamaza sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14). Tek başına β-laktam ve β-laktam/β-laktamaz inhibitörü zon büyüklüğü arasındaki farklar istatistiki açıdan da önemli bulunmuştur (P değeri 0,0001). Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.14 β-laktamaz fenotipik incelenmesi



Şekil 4.15 β-laktamaz geninin kombinasyon disk testi ile fenotipik incelenmesi

Piperasilin, gram-pozitif ve gram-negatif aerobik ve anaerobik bakterilere karşı in vitro aktiviteye sahip bir penisilin beta-laktam antibiyotiktir, ancak β-laktamaz enzimleri tarafından hidrolize eğilimli olduğu için, bir β-laktamaz inhibitörü olan tazobaktam ile kombinasyonu, piperasilin bakteri hücrelerine in vitro etkinliğini arttırır (Hosu *et al*. 2021). Piperasilin (100 µg)/Piperasilin+Tazobaktam (100/10 µg) ile β-laktamazın fenotipik tespit sonuçları, inhibisyon bölgesinde 5 mm'lik bir artış olduğunu ve oranın % 78 anlamlı olduğunu göstermektedir (P<0,05). Piperasilin / Piperasilin-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Piperasilin/Piperasilin-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit

Duyarlılık	**Piperasilin**		**Piperasilin -Tazobaktam**		**P değeri**
	İzolat n=50	**Ortalama±SD Zone boyutu (mm)**	**İzolat n=50 (≥5mm artış)**	**Ortalama±SD Zone boyutu (mm)**	
Hassasiyet	10 (20%)	24,33±1,211	6 (12%)	31,33±2,16	0,0001*
Orta düzey	15 (30%)	17,14±2,03	14 (28%)	26,78±3,16	0,0001*
Dirençli	25 (50%)	9,78±2,95	19 (38%)	20,89±5,62	0,0001*
Oran	50 (100%)		39 (78%)		

P<0,05 anlamlı

Pseudomonas aeruginosa'da β-laktamazların kombinasyon disk yöntemi ile fenotipik incelenmesinin sonucunda; Seftazidim (30 µg)/Seftazidim+Tazobaktam (30/10µg), β-laktamaz pozitif izolatları için inhibisyon zon boyutları incelendiğinde,

Seftazidim+Tazobaktam zone boyutu tek başına Seftazidime göre 5 mm inhibisyon zonu büyümesi göstermektedir. Veri analizi, tek başına seftazidim sonucu ile seftazidim+tazobaktam arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (P<0,05). Seftazidim / Seftazidim-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Seftazidim/Seftazidim-Tazobaktam ile β-laktamaz için fenotipik tespit

Duyarlılık	Seftazidim		Seftazidim-Tazobaktam		P değeri
	İzolat n=50	Ortalama±SD Zone boyutu (mm)	İzolat n=50 (≥5mm artış)	Ortalama±SD Zone size (mm)	
Hassasiyet	10 (20%)	18±0,00	1 (2%)	27±0,00	0,0001*
Orta düzey	10 (20%)	15,57±0,78	7 (14%)	21,42±1,51	0,0001*
Dirençli	30 (60%)	9,16±2,51	12 (24%)	15,75±2,83	0,0001*
Oran	50 (100%)		20 (40%)		

P<0,05 anlamlı

B-laktamaz geninin Tikarsilin (75 µg)/Tikarsilin+Klavulanat (75/10µg) ile fenotip tespiti inhibisyon bölgesi oranında 5 mm'lik bir artışın (%72) anlamlı olduğunu göstermektedir (P<0,05). Tikarsilin ve Klavulanat kombinasyonu, Tikarsilin'in genişlemiş spektrumunu klavulanik asidin beta-laktamaz inhibitör aktivitesi ile birleştirir, Tikarsilin'in genişlemiş spektrumu, onu *P. aeruginosa* tedavisinde uygun bir ajan haline getirmiştir. Beta-laktamazın tikarsilin/tikarsilin-klavulanat ile fenotipik tespiti sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Beta-laktamazın Tikarsilin/Tikarsilin-Klavulanat ile fenotipik tespiti

Duyarlılık	Tikarsilin		Tikarsilin-Klavulanat		P değeri
	İzolat n=50	Ortalama±SD Zone boyutu (mm)	İzolat n=50 (≥5mm artış)	Ortalama±SD Zone boyutu (mm)	
Hassasiyet	2 (4%)	25±0,00	2 (4%)	30±0,00	0,0001*
Orta düzey	18 (36%)	18,08±1,67	12 (24%)	26,66±2,93	0,0001*
Dirençli	30 (60%)	10,40±3,15	22 (44%)	19,22±3,93	0,0001*
Oran	50 (100%)		36 (72%)		

P<0,05 anlamlı

Çizelge 4.5 Beta-laktamaz enzimleri üreten *P. aeruginosa* izolatlarının fenotip dağılımı

Fenotipik Tespit Sistemi	N	%
PI+PIT/TC+TCC	17	34%
PI+PIT/CAZ+CAT/TC+TCC	16	32%
CAZ+CAT/TC+TCC	3	6%
PI+PIT/CAZ+CAT	1	2%
PI+PIT	6	12%
TC+TCC	1	2%
NA	6	12%

PI: Piperasilin-PIT:Piperasilin-Tazobaktam-TC: Tikarsilin-TCC:Tikarsilin-Klavulanat

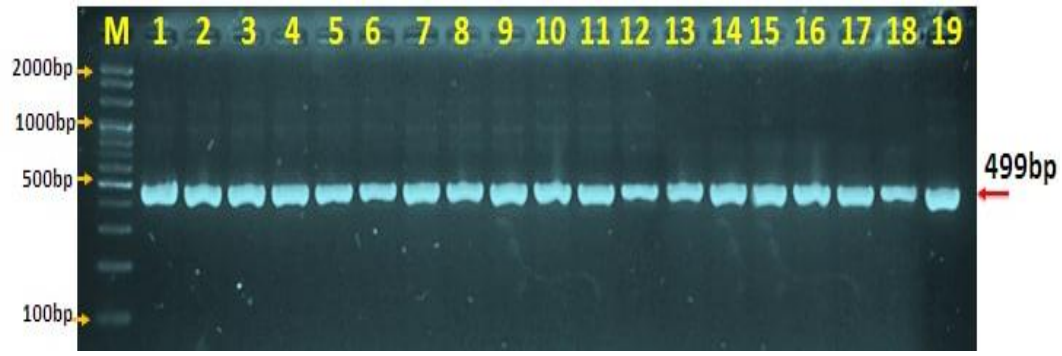
4.6 PZR ile β-Laktamaz Genlerinin Genotipik Tespiti

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu kullanılarak, SHV, TEM ve CTXM-1 dahil olmak üzere antibiyotik direncine sahip bazı genler belirlendi. Çeşitli klinik örneklerden 50 *P. aeruginosa* izolatında bulunan β-laktamaz genlerinin dağılımı Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. PZR verilerine göre *P. aeruginosa* izolatlarından, %98 oranında bla_{TEM} geni, ardından %50 oranında $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ geni ve %38 oranında bla_{SHIV} geni tanımlanmıştır.

Çizelge 4.6 *P. aeruginosa*'nın β-laktamaz geninin dağılımı

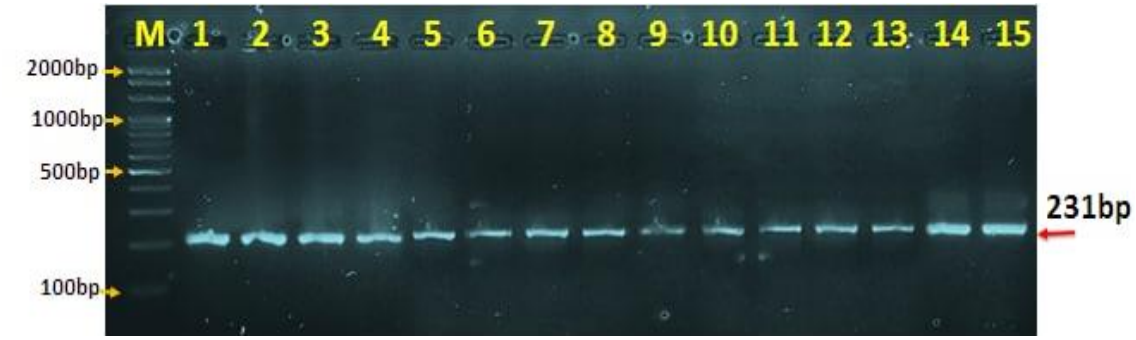
β-laktamaz geni	N	%
$\boldsymbol{bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}}$	25	50%
$\boldsymbol{bla_{SHIV}}$	19	38%
$\boldsymbol{bla_{TEM}}$	49	98%

İzole edilen 50 *P. aeruginosa* izolatından sadece 25'inde (%50) $bla_{CTXm\text{-}1}$ geni belirlendi. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.16'da verilmiştir. Bu sonuçlar Shahbandeh vd. (2020) bildirdiği izolatlarında %52 oranında $bla_{CTXm\text{-}1}$ geni taşıdığını bulan çalışma sonuçları ile uyumlu fakat izolatlarının hiçbirinde $bla_{CTXm\text{-}1}$ geni tespit edemeyen Falodun vd.(2021) sonuçlarıyla uyumlu bulunmamıştır.



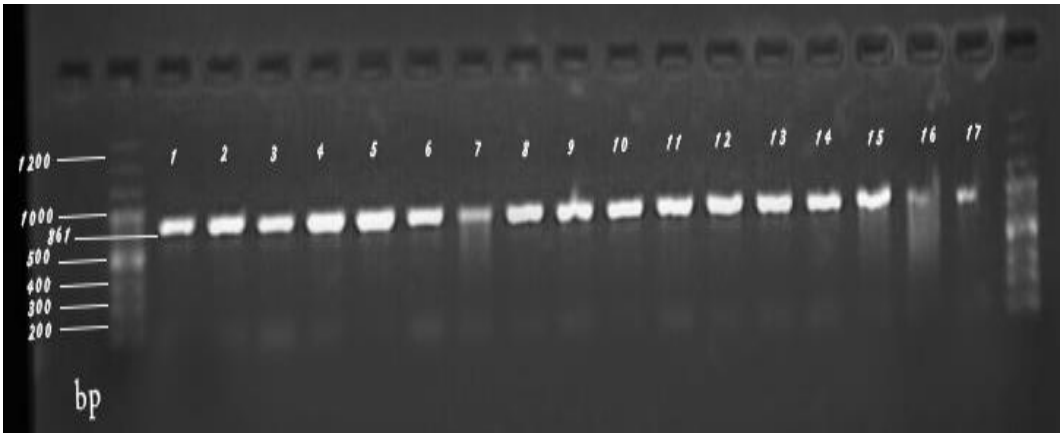
Şekil 4.16 *bla*$_{CTXm-1}$ gen (499bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü

Bu çalışmada izole edilen 50 *P. aeruginosa* izolatından %38 oranında *bla*$_{SHV}$ geni belirlendi. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.17'de verilmiştir. Dehbashi vd. (2020) *P. aeruginosa* izolatlarında %44,31 oranında *bla*$_{SHV}$ tanımladığı çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunurken, Bahmani ve Ramazanzadeh (2013), *P. aeruginosa* izolatlarında %10,57 oranında *bla*$_{SHV}$ geni tespit eden çalışma sonuçları ile uyuşmamıştır.



Şekil 4.17 *bla*$_{SHV}$ gen (231bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü

Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatından elde edilen ve 49 (%98) olan *bla*$_{TEM}$ gen tipi sonucu, Fazeli ve Momtaz (2014)'ın çalışmasında bulunan %94,11 oranı ile ve Lin vd. (2012) çalışmasında bulunan %92,3 oranı ile örtüşürken, örneklerinde %24 oranında *bla*$_{TEM}$ bulan Falodun vd. (2021) sonucundan farklıdır. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18 *bla*$_{TEM}$ gen (861bp) varlığını gösteren jel elektroforez görüntüsü

P. aeruginosa'nın 50 izolatı arasında β-laktamaz genlerinin dağılımı, *bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{SHV}$ ve *bla*$_{TEM}$ 'in üçünün de birlikte bulunduğu 11 (% 22) izolattır. Bu sonuç Hosu vd. (2021)'un bulduğu %18,2 oranı ile benzerlik gösterirken, *bla*$_{CTX-M-1}$ /*bla*$_{TEM}$ için %28 oran ile birebir aynı sonuçlar kaydedilmiştir. Bununla beraber, Hosu vd. (2021) çalışmasında *bla*$_{SHV}$ /*bla*$_{TEM}$ için kaydedilen % 40,5 ve yalnız *bla*$_{TEM}$ için %79,3 olan sonucu ile bu çalışma sonuçları arasında fark vardır.

Çizelge 4.7 Beta-laktamaz enzimleri üreten *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının genotipik dağılımı

Genotip	**N = 50**	**%**
bla$_{CTX-M-1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	11	22
bla$_{CTX-M-1}$/*bla*$_{TEM}$	14	28
bla$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	8	16
bla$_{TEM}$	16	32
NA	1	2

P. aeruginosa'nın 50 izolatı arasında β-laktamaz geni *bla*$_{CTX-M-1}$ ve *bla*$_{TEM}$'in bir arada sahip olunmasının, farklı antibiyotiklere (6 Sınıf) dirençten yüksek oranda sorumlu olduğu belirlendi. Bu sonuçlarla ilgili veriler Çizelge 4.8'de verildi.

Çizelge 4.8 *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$ ve *bla*$_{TEM}$ gen varlığında farklı antibiyotiklere direnç

Antibiyotik	β-laktamaz Geni	N=50	%
PI/MRP/NET/CAZ/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
MRP/CIP/LE/NET/CAZ/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/IMP/CIP/AK/GEN/LE/CAZ	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/IMP/MRP/AK/GEN/NET/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/IMP/MRP/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	2	4%
PI/IMP/MRP/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	2	4%
PI/IMP/MRP/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{TEM}$	3	6%
PI/AK/GEN/CAZ	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/IMP/GEN/CAZ/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/IMP/MRP/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/AK/GEN/LE/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
AK/CAZ/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
AK/LE/NET/CAZ	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
Pi/AK/GEN/LE/NET/AT/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/GEN/LE/NET/CAZ/AT	*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT/CPM	negatif	2	4 %
PI/CIP/AK/GEN/LE/NET/CAZ/AT/CPM	*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$		
Pi/AK/LE/CPM	*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/GEN/CAZ/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/GEN/CAZ	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
CIP/GEN/LE/NET/AT	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
CIP/AK/GEN/CAZ	*bla*$_{TEM}$	1	2 %
AK/CAZ	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2 %
PI/GEN	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{TEM}$	2	4%
GEN/CPM	*bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}1}$/*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2%
GEN/CPM	*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2%
GEN/CAZ	*bla*$_{TEM}$	1	2%
PI/CAZ	*bla*$_{SHV}$/*bla*$_{TEM}$	1	2%

Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarında β-laktamaz için fenotipik ve genotipik sonuçlar karşılaştırıldığında, 50 adet *P. aeruginosa* izolatından 43 tanesi (%86) fenotipik ve genotipik olarak pozitif bulunurken, fenotipik pozitif genotipik negatif ise izolat sayısı 1 (%2) adet bulunmuştur. Bu sonuçlardaki fark, çalışmamızda tüm β-laktamaz genlerinin teşhis edilmemiş olmasından kaynaklanabilir. Fenotipik negatif Genotipik pozitif izolat sayısı 6 (%12) adettir. β-laktamazın fenotipik ve genotipik sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Bu durum beta laktamaz geninin eksprese edilmemesinden kaynaklanabilir.

P. aeruginosa'da β-laktamaz ilişkili direnç ilaç penetrasyonunun etkinliğine bağlıdır. Bu patojenin periplazmik boşlukta ilaç birikimini en aza indirme yeteneği (porin aracılı direnç ve/veya akış pompaları tarafından ekstrüzyon yoluyla) ve aynı hücre içindeki farklı

β-laktamazların ortak etkileri gibi etkilerin hepsi dikkate alınması gereken faktörlerdir. Bu, *P. aeruginosa*'nın bir suşundaki bir β-laktamaz ile ilişkili direnç özelliklerinin, başka bir *P. aeruginosa* suşundaki aynı β-laktamaz ile ilişkili direnç özelliklerinden farklı olabileceği anlamına gelir ve bu da beklenebilir bir durumdur (Wolter and Lister 2013). Bu nedenle, bazen bir hekim bile petri kabında bakterilerin duyarlı olduğu antibiyotiği reçete eder, ancak hastalar iyileşmez. Aslında *P. aeruginosa* β-laktamlara direnç ifade ettiğinde ve β-laktamaz fenotipik tarama testleri için pozitif sonuçlar verdiğinde, bu β-laktamazların varlığını vurgulayacak ve ilgili β-laktamaz genlerinin varlığını gösterecektir. Tersine, bazı bakteriler β-laktamlara duyarlılık gösterir fakat β-laktamazlar fenotipik tarama testleri için negatif sonuçlar göstermesine rağmen direnç genine sahip olabilir ve bu durum antibiyotik direncinin önlenebilmesi için zor bir durumdur.

Çizelge 4.9 β-laktamazın fenotipik ve genotipik sonuçları

Patern	**N**	**%**
Fenotipik Pozitif/Genotipik Negatif	1	2
Fenotipik Pozitif/Genotipik Pozitif	43	86
Fenotipik Negatif/Genotipik Pozitif	6	12

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez sonucunda, yara, kulak enfeksiyonu, diyabetik ayak hastaları ve yanık örnekleri gibi farklı hastalıkları olan hastalardan izolatlar toplandığında, yanık hastalarının daha fazla *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi taşıyıcısı olduğu tespit edildi. *Pseudomonas aeruginosa karşı* 12 tip antibiyotik ile antibiyotik duyarlılığı test edildiğinde, bakterinin seftazidime ve tikarsilin'e %60 oranında, imipenem ve meropenem'e ise %22 oranında direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Antibiyotik Duyarlılığına göre, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin direnç paternleri, hem MDR hem de MDR olmayan *P. aeruginosa* yanık izolatları için aynı oranda (%50) tespit edilmiştir.

Bu tezde β-laktamaz varlığı fenotipik ve genotipik olarak belirlenmiştir. fenotipik olarak laktmaz varlığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının tamamında $bla_{\text{CTX-M-1}}$ ve bla_{TEM} direnç genleri, farklı antibiyotiklere karşı oluşan dirençten yüksek oranda sorumludur. Fenotipik ve genetipik β-laktamaz sonuçlarına baktığımızda farklılığın tüm β-laktamazgenlerine bakılamamsından kaynaklandığı fakat *P. aeruginosa* β-laktamlara direnç ifade ettiğinde ve β-laktamaz fenotipik tarama testleri için pozitif sonuçlar verdiğinde, bu β-laktamazlara sahip olduğunu ve ilgili β-laktamaz genlerinin varlığını gösterir. Tersine, bazı bakteriler β-laktamlara duyarlılık gösterir ama β-laktamazlar fenotipik tarama testleri için negatif sonuçlar vermesine rağmen direnç genine sahip olabilir dolayısıyla bu durum antibiyotik direnç tespiti için zorluk oluşturacaktır. Duyarlılık testinin sonuçları sayesinde, *P. aeruginosa* izolatlarının aminoglikozid antibiyotiklere karşı yüksek duyarlı olduğunu belirlendi.

Elde etmiş olduğumuz çalışma sonuçları doğtultusunda; β-laktamaz geni ve aminoglikozit direnç genlerinin birlikteliğinin araştırılmasını, β-laktam direnci ile ilgili diğer genlerin incelenmesini, *P. aeruginosa*'nın genotip pozitif/fenotip pozitif izolatlarında hedef genlerin gen ekspresyonunun değerlendirilmesini, Aminoglikozid / β-laktamaz inhibitörü kombinasyonunun etkisinin değerlendirilmesini ve antibiyotik direnci tespiti için rutin test olarak direnç geni tespit politikalarının oluşturulmasını / geliştirilmesini öneriyoruz.

KAYNAKLAR

Abbas, H. A., El-Ganiny, A. M. and Kamel, H. A. 2018. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from urinary tract infections. African health Sciences, 18(1): 11-21.

Akpaka, P. E., Vaillant, A., Wilson, C. and Jayaratne, P. 2021. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by gram-negative bacteria in trinidad and tobago. International Journal of Microbiology, 2021. 24(4),2-5.

Al-Agamy, M. H., Shibl, A. M., Tawfik, A. F., Elkhizzi, N. A. and Livermore, D. M. 2012. Extended-spectrum and metallo-beta-lactamases among ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa in Riyadh, Saudi Arabia. Journal of Chemotherapy, 24(2): 97-100.

Al-Fahdawi, A. J. J. and Allawi, M. M. 2019. Impact of biofertilizers and nano potassium on growth and yield of eggplant (Solanum melongena L.). Plant Archives, 19(2): 1809-1815.

Alhusseini, L. B., Maleki, A., Kouhsari, E., Ghafourian, S., Mahmoudi, M. and Al Marjani, M. F. 2019. Evaluation of type II toxin-antitoxin systems, antibiotic resistance, and biofilm production in clinical MDR Pseudomonas aeruginosa isolates in Iraq. Gene Reports, 17: 100546.

Al-Rubaye, D. S., Albassam, W. W., Al-habobi, H. M. and AL-Rubaye, I. A. 2015. Frequency of blaOxa10 Beta-lactamase gene in Pseudomonas aeruginosa isolated from different clinical swabs. Iraqi Journal of Science, 56(4C): 3405-3412.

Amsalu, A., Sapula, S. A., De Barros Lopes, M., Hart, B. J., Nguyen, A. H., Drigo, B. and Venter, H. 2020. Efflux pump-driven antibiotic and biocide cross-resistance in Pseudomonas aeruginosa isolated from different ecological niches: a case study in the development of multidrug resistance in environmental hotspots. Microorganisms, 8(11): 1647.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(4): 1563-1589.

Arzanlou, M., Chai, W. C. and Venter, H. 2017. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. Essays in Biochemistry, 61(1): 49-59.

Azam, M. W. and Khan, A. U. 2019. Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. Drug Discovery Today, 24(1): 350-359.

Azeez, B. S. and Bakr, K. I. 2019. Phenotypic and molecular detection of metallo-β–lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolates from different clinical infections in Erbil. Zanco Journal of Pure and Applied Sciences, 31(1): 46-56.

Bahmani, N. and Ramazanzadeh, R. 2013. Detection of SHV type extended-spectrum B-lactamase and risk factors in pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Pakistan Journal of Medical Sciences, 29(3): 788.

Baier, F. and Tokuriki, N. 2014. Connectivity between catalytic landscapes of the metallo-β-lactamase superfamily. Journal of Molecular Biology, 426(13): 2442-2456.

Battle, S. E., Rello, J. and Hauser, A. R. 2009. Genomic islands of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiology Letters, 290(1): 70-78.

Bebrone, C., Lassaux, P., Vercheval, L., Sohier, J. S., Jehaes, A., Sauvage, E. and Galleni, M. 2010. Current challenges in antimicrobial chemotherapy. Drugs, 70(6): 651-679.

Beiki, F., Busquets, A., Gomila, M., Rahimian, H., Lalucat, J. and García-Valdés, E. 2016. New Pseudomonas spp. are pathogenic to citrus. PLoS One, 11(2): e0148796.

Belba, M. K., Petrela, E. Y. and Belba, A. G. 2013. Epidemiology of infections in a burn unit, Albania. Burns, 39(7): 1456-1467.

Bokaeian, M., Zahedani, S. S., Bajgiran, M. S. and Moghaddam, A. A. 2015. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M genes in resistant strains of Pseudomonas aeruginosa producing extended spectrum β-lactamases. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(1).

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

Breidenstein, E. B., De La Fuente-Núñez, C. and Hancock, R. E. 2011. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends in Microbiology, 19(8): 419-426.

Buhl, M., Kästle, C., Geyer, A., Autenrieth, I. B., Peter, S. and Willmann, M. 2019. Molecular evolution of extensively drug-resistant (XDR) Pseudomonas aeruginosa strains from patients and hospital environment in a prolonged outbreak. Frontiers in Microbiology, 10: 1742.

Bunyan, I. A., Hadi, O. M. and Al-Mansoori, H. A. 2018. Molecular detection of Metallo-beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from different sites of infection. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 10(5): 1072-1078.

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

Bush, K. and Bradford, P. A. 2020. Epidemiology of β-lactamase-producing pathogens. Clinical Microbiology Reviews, 33(2): e00047-19.

Bush, K. and Jacoby, G. A. 2010. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(3): 969-976.

Carruthers, T. J., Carr, P. D., Loh, C. T., Jackson, C. J. and Otting, G. 2014. Iron (III) Located in the Dinuclear Metallo-β-Lactamase IMP-1 by Pseudocontact Shifts. Angewandte Chemie International Edition, 53(51): 14269-14272.

Cheng, Q., Xu, C., Chai, J., Zhang, R., Wai chi Chan, E. and Chen, S. 2019. Structural insight into the mechanism of inhibitor resistance in CTX-M-199, a CTX-M-64 variant carrying the S130T substitution. ACS Infectious Diseases, 6(4): 577-587.

Chong, Y., Shimoda, S. and Shimono, N. 2018. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Infection, Genetics and Evolution, 61: 185-188.

Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews, 17(4): 840-862.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2021. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021

Corehtash, Z. G., Ahmad Khorshidi, F. F., Akbari, H. and Aznaveh, A. M. 2015. Biofilm formation and virulence factors among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(10).

Dash, M., Padhi, S., Narasimham, M. V. and Pattnaik, S. 2014. Antimicrobial resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical samples in a tertiary care hospital, South Odisha, India. Saudi Journal for Health Sciences, 3(1): 15.

Dehbashi, S., Tahmasebi, H., Alikhani, M. Y., Keramat, F. and Arabestani, M. R. 2020. Distribution of Class B and Class A β-lactamases in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa: comparison of phenotypic methods and high-resolution melting analysis (HRMA) assay. Infection and Drug Resistance, 13: 2037.

Diggle, S. P. and Whiteley, M. 2020. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology, 166(1): 30.

Elsahn, A. 2016. Interactions between Pseudomonas aeruginosa bacteria and corneal fibroblasts in human microbial keratitis. PhD. Thesis, University of Southampton, 189 page, Southampton.

Evans, B. A. and Amyes, S. G. 2014. OXA β-lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 27(2): 241-263.

Falodun, O. I., Musa, I. B. and Oyelade, A. A. 2021. Prevalence of extended beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa isolated from human immunodeficiency virus patients in Ibadan, Nigeria. Gene Reports, 23: 101159.

Fazeli, N. and Momtaz, H. 2014. Virulence gene profiles of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian hospital infections. Iranian Red Crescent Medical Journal, 16 (10).

Fernández, L., Breidenstein, E. B. and Hancock, R. E. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. Drug Resistance Updates, 14(1): 1-21.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Diagnostic microbiology (pp. 288-302). St Louis: Mosby.

Fredens, J., Wang, K., De La Torre, D., Funke, L. F., Robertson, W. E., Christova, Y. and Chin, J. W. 2019. Total synthesis of Escherichia coli with a recoded genome. Nature, 569(7757): 514-518.

Green, M. R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344 page, London.

Gupta, D., Singh, A., Somvanshi, P., Singh, A. and Khan, A. U. 2020. Structure-Based Screening of Non-β-Lactam Inhibitors against Class D β-Lactamases: An Approach of Docking and Molecular Dynamics. ACS omega, 5(16): 9356-9365.

Hall, C. W., Hinz, A. J., Gagnon, L. B. P., Zhang, L., Nadeau, J. P., Copeland, S. and 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.

Hall, L. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M. and Akalin, H. E. 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37(8): 1637-1644.

Hasan, A. S. 2019. Antibiogram of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Burnand Wound Infections Among Inpatients and Outpatients Attending to Ramadi Teaching Hospital in Ramadi, Iraq. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology, 11(1): 13-22.

Høiby, N., Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. 2010. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiology, 5(11): 1663-1674.

Holbrook, S. Y. and Garneau-Tsodikova, S. 2018. Evaluation of aminoglycoside and carbapenem resistance in a collection of drug-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Microbial Drug Resistance, 24(7): 1020-1030.

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

Hosu, M. C., Vasaikar, S. D., Okuthe, G. E. and Apalata, T. 2021. Detection of extended spectrum beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in rural Eastern Cape Province, South Africa. Scientific Reports, 11(1): 1-8.

Hussein, Z. K., Kadhim, H. S. and Hassan, J. S. 2018. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (blaNDM-1) in carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa isolated from clinical samples in Wasit hospitals. Iraqi JMS. 2018; 16 (3): 239-246. doi: 10.22578. IJMS, 16(3).

Idowu, T., Zhanel, G. G. and Schweizer, F. 2020. A Dimer, but not monomer, of tobramycin potentiates ceftolozane against MDR/XDR Pseudomonas aeruginosa and delays resistance development. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 64(3):1-11.

Ismail, S. J. and Mahmoud, S. S. 2018. First detection of New Delhi metallo-β-lactamases variants (NDM-1, NDM-2) among Pseudomonas aeruginosa isolated from Iraqi hospitals. Iranian Journal of Microbiology, 10(2): 98.

Jacoby, G. A. 2009. AmpC β-lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 22(1): 161-182.

Jawetz, E., Melnik, J. L., Adelberg, E. A., Brook, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. 2019. Medical Microbiology 16th ed. Appleton and Lang New York. Connecticut. PP.254-260.

Juhi, T., Bibhabati, M., Archana, T., Poonam, L. and Vinita, D. 2009. Pseudomonas aeruginosa meningitis in post neurosurgical patients. Neurology Asia, 14(2): 95-100.

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

Kateete, D. P., Nakanjako, R., Okee, M., Joloba, M. L. and Najjuka, C. F. 2017. Genotypic diversity among multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species at Mulago Hospital in Kampala, Uganda. BMC Research Notes, 10(1): 1-10.

Kazmierczak, K. M., De Jonge, B. L., Stone, G. G. and Sahm, D. F. 2020. Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance programme, 2013–17. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 75(5): 1165-1173.

Khadim, M. and Marjani, M. 2019. Pyocyanin and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn infections in Baghdad, Iraq. Biological, 12(1): 131.

Khan, M. A. and Faiz, A. 2016. Antimicrobial resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in tertiary care hospitals of Makkah and Jeddah. Annals of Saudi Medicine, 36(1): 23-28.

Khosravi, A. D., Hoveizavi, H., Mohammadian, A., Farahani, A. and Jenabi, A. 2016. Genotyping of multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. Acta Cirúrgica Brasileira, 31: 206-211.

King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44(2): 301-307.

Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M. and García-Valdés, E. 2020. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus Pseudomonas. Genes, 11(2): 139.

Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J. R. and de la Fuente Aguado, J. 2017. Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. PloS One, 12(5): e0178178.

Leonard, D. A., Bonomo, R. A. and Powers, R. A. 2013. Class D β-lactamases: a reappraisal after five decades. Accounts of Chemical Research, 46(11): 2407-2415.

Leylabadlo, H. E., Pourlak, T., Aghazadeh, M., Asgharzadeh, M. and Kafil, H. S. 2017. Extended-spectrum beta-lactamase producing gram negative bacteria In Iran: A review. African Journal of Infectious Diseases, 11(2): 39-53.

Liao, Y. C., Cheng, H. W., Wu, H. C., Kuo, S. C., Lauderdale, T. L. Y. and Chen, F. J. 2019. Completing circular bacterial genomes with assembly complexity by using a sampling strategy from a single MinION run with barcoding. Frontiers in Microbiology, 10: 2068.

Lin, S. P., Liu, M. F., Lin, C. F. and Shi, Z. Y. 2012. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β-lactamases produced by Pseudomonas aeruginosa isolates. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 45(3): 200-207.

Lohans, C. T., Brem, J. and Schofield, C. J. 2017. New Delhi metallo-β-lactamase 1 catalyzes avibactam and aztreonam hydrolysis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(12): e01224-17.

Lowbury, E. J. L. and Collins, A. G. 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for Pseudomonas pyocyanea. Journal of Clinical Pathology, 8(1): 47.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams and Wilkins, 113 page, Philadelphia.

Mack, A. R., Barnes, M. D., Taracila, M. A., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Cabot, G. and Bonomo, R. A. 2020. A standard numbering scheme for class C β-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(3): e01841-19.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. and Clark, D. P. 2008. Brock biology of microorganisms 12th edn. Int. Microbiology, 11: 65-73.

Magalhães, B., Valot, B., Abdelbary, M. M., Prod'Hom, G., Greub, G., Senn, L. and Blanc, D. S. 2020. Combining standard molecular typing and whole genome sequencing to investigate Pseudomonas aeruginosa epidemiology in intensive care units. Frontiers in Public Health, 8: 3.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G. and Monnet, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection, 18(3): 268-281.

Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J. P. and Touati, A. 2018. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 37(4): 587-604.

Manandhar, S., Adhikari, S. and Rajbhandari, S. 2017. Phenotypic assays for detection of AmpC and MBL producers among the clinical isolates of multi drug resistant Pseudomonas aeruginosa. Tribhuvan University Journal of Microbiology, 4: 23-31.

Manjula, M., Priya, D. and Varsha, G. 2007. Bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms: A eight-year study. Indian Journal of Plastic Surgery, 40(01): 91-93.

Martijn, J., Lind, A. E., Schön, M. E., Spiertz, I., Juzokaite, L., Bunikis, I. and Ettema, T. J. 2019. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon. Environmental Microbiology, 21(7): 2485-2498.

Mendoza, L., Deutsch, E. W., Sun, Z., Campbell, D. S., Shteynberg, D. D. and Moritz, R. L. 2018. Flexible and fast mapping of peptides to a proteome with ProteoMapper. Journal of Proteome Research, 17(12): 4337-4344.

Mlynarcik, P., Chalachanova, A., Vagnerovă, I., Holy, O., Zatloukalova, S. and Kolar, M. 2020. PCR detection of oxacillinases in bacteria. Microbial Drug Resistance, 26(9): 1023-1037.

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

Munita, J. M. and Arias, C. A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology Spectrum, 4(2): 4-2.

Murray, P. R., Baron J. H., Pfaller, M. A., Jorgensen, J. H. and Yolken, R. H. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C

Nasser, M. and Kharat, A. S. 2019. Phenotypic Demonstration of ß-lactamase (ESßLs, MßLs, and Amp-C) among MDR Pseudomonas aeruginosa isolates obtained From Burn wound infected in Yemen. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 7(6): 3-4.

Nasser, M., Ogali, M. and Kharat, A. S. 2018. Prevalence of MDR Pseudomonas aeruginosa of war-related wound and burn ward infections from some conflict areas of Western Yemen. Wound Medicine, 20: 58-61.

Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M. and Menon, V. 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 3(1): 1-16.

Neyestanaki, D. K., Mirsalehian, A., Rezagholizadeh, F., Jabalameli, F., Taherikalani, M. and Emaneini, M. 2014. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns, 40(8): 1556-1561.

Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Nguyen, H. T. T. and Le, D. V. 2018. Mutations in the gyrA, parC, and mexR genes provide functional insights into the fluoroquinolone-

resistant Pseudomonas aeruginosa isolated in Vietnam. Infection and Drug Resistance, 11: 275-282.

Niederstebruch, N., Sixt, D., Benda, B. I. and Banboye, N. 2017. A suitable blood agar containing human blood especially for the use in laboratories of developing countries. The Journal of Infection in Developing Countries, 11(05): 399-406.

Nouri, R., Ahangarzadeh Rezaee, M., Hasani, A., Aghazadeh, M. and Asgharzadeh, M. 2016. The role of gyrA and parC mutations in fluoroquinolones-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from Iran. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 925-930.

Othman, N., Babakir-Mina, M., Noori, C. K. and Rashid, P. Y. 2014. Pseudomonas aeruginosa infection in burn patients in Sulaimaniyah, Iraq: risk factors and antibiotic resistance rates. The Journal of Infection in Developing Countries, 8(11): 1498-1502.

Ozer, B., Duran, N., Onlen, Y. and Savas, L. 2012. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. The Journal of Antibiotics, 65(1): 9-13.

Palleroni, N. J. 1983. The taxonomy of bacteria. BioScience, 33(6): 370-377.

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

Palzkill, T. 2013. Metallo-β-lactamase structure and function. Annals of the New York Academy of Sciences, 1277(1): 91-104.

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.

Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews, 18(4): 657-686.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H. and Velázquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas. Infection, Genetics and Evolution, 9(6): 1132-1147.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H. and Velázquez, E. 2018. The current status on the taxonomy of Pseudomonas revisited: an update. Infection, Genetics and Evolution, 57: 106-116.

Pettinati, I., Brem, J., Lee, S. Y., McHugh, P. J. and Schofield, C. J. 2016. The chemical biology of human metallo-β-lactamase fold proteins. Trends in Biochemical Sciences, 41(4): 338-355.

Poirel, L., De La Rosa, J. M. O., Richard, A., Aires-de-Sousa, M. and Nordmann, P. 2019. CTX-M-33 is a CTX-M-15 derivative conferring reduced susceptibility to carbapenems. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 63(12): e01515-19.

Poole, K. 2011. Pseudomonas aeruginosa: resistance to the max. Frontiers in Microbiology, 2: 65.

Raziq, A. H. 2017. Molecular study of two virulence genes of Pseudomonas aeruginosa, the Oxa 10 and Tox a with the comparisons of the relevant sequences. Medical Journal of Babylon, 14: 28-38.

Saderi, H. and Owlia, P. 2015. Detection of multidrug resistant (MDR) and extremely drug resistant (XDR) P. aeruginosa isolated from patients in Tehran, Iran. Iranian Journal of Pathology, 10(4): 265.

Salahuddin, P., Kumar, A. and Khan, A. U. 2018. Structure, function of serine and metallo-β-lactamases and their inhibitors. Current Protein and Peptide Science, 19(2): 130-144.

Saleh, B. H., Al-Jumaily, E. F. and Hussain, S. M. 2012. Production and purification of exotoxin a extracted from social strains of Pseudomonas aeruginosa in Iraq. DAMA International, 1(1): 15-23.

Salman, A. D., Amer, Z. and Abud_Rahman, E. S. 2017. Bacteriological study of Pseudomonas aeruginosa isolated from different infections and sudy antimicrobial Activities of plant extract solanum nigrum against it. Iraqi journal of Science, 58(4C): 2278-2284.

Savari, M., Rostami, S., Ekrami, A. and Bahador, A. 2016. Characterization of toxin-antitoxin (TA) systems in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 9(1).

Sawa, T., Kooguchi, K. and Moriyama, K. 2020. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. Journal of Intensive Care, 8(1): 1-13.

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

Schneider, I., Markovska, R., Keuleyan, E., Sredkova, M., Rachkova, K., Mitov, I. and Bauernfeind, A. 2007. Dissemination and persistence of a plasmid-mediated TEM-3-like β-lactamase, TEM-139, among Enterobacteriaceae in Bulgaria. International Journal of Antimicrobial Agents, 29(6): 710-714.

Senthamarai, S. 2014. Resistance pattern of Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital of Kanchipuram, Tamilnadu, India. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 8(5): DC30.

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

Shacheraghi, F., Shakibaie, M. R. and Noveiri, H. 2010. Molecular identification of ESBL Genes blaGES-blaVEB-blaCTX-M blaOXA-blaOXA-4, blaOXA-10 andblaPER-in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 3(6): 138-42.

Shahbandeh, M., Moghadam, M. T., Mirnejad, R., Mirkalantari, S. and Mirzaei, M. 2020. The efficacy of AgNO3 nanoparticles alone and conjugated with imipenem for combating extensively drug-resistant pseudomonas aeruginosa. International journal of Nanomedicine, 15: 6905.

Shehab, S. K. and Jassim, E. H. 2019. Impact of Mint oil and Colistin antibiotic on pilB gene of clinical Pseudomonas aeruginosa Isolates from Baghdad, Iraq. Iraqi Journal of Biotechnology, 18(3).

Shen, M., Zhang, H., Shen, W., Zou, Z., Lu, S., Li, G. and Le, S. 2018. Pseudomonas aeruginosa MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous

end joining to prevent bacteriophage predation. Nucleic Acids Research, 46(9): 4505-4514.

Shete, V., Grover, N. and Kumar, M. 2017. Analysis of aminoglycoside modifying enzyme genes responsible for high-level aminoglycoside resistance among enterococcal isolates. Journal of Pathogens, 2017.

Shim, S. M., Kim, J. H., Jung, S. E., Kim, D. J., Oh, J. H., Han, B. G. and Jeon, J. P. 2010. Multilaboratory assessment of variations in spectrophotometry-based DNA quantity and purity indexes. Biopreservation and Biobanking, 8(4): 187-192.

Sousa, A. M. and Pereira, M. O. 2014. Pseudomonas aeruginosa diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—a review. Pathogens, 3(3): 680-703.

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. and LiPuma, J. J. 2004. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. Journal of Clinical Microbiology, 42(5): 2074-2079.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J. and Olson, M. V. 2000. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406(6799): 959-964.

Streeter, K. and Katouli, M. 2016. Pseudomonas aeruginosa: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment.

Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H., Takebayashi, Y. and Spencer, J. 2019. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. Journal of Molecular Biology, 431(18): 3472-3500.

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.

Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J. Y., Mazouzi, K., Bertrand, X. and Hocquet, D. 2015. What it takes to be a Pseudomonas aeruginosa? The core genome of the opportunistic pathogen updated. PloS One, 10(5): e0126468.

Wang, Y., Wrennall, J. A., Cai, Z., Li, H. and Sheppard, D. N. 2014. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: from single molecules to animal models. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 52: 47-57.

Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K. and Stahl, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. Nature, 254(5495), 83-86.

Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q. and Lory, S. 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(14): 8484-8489.

Wolter, D. and D Lister, P. 2013. Mechanisms of β-lactam resistance among Pseudomonas aeruginosa. Current Pharmaceutical Design, 19(2): 209-222.

World Health Organization. 2017. Global diffusion of eHealth: making universal health coverage achievable: report of the third global survey on eHealth. 2017.

Xu, L. Q., Zeng, J. W., Jiang, C. H., Wang, H., Li, Y. Z., Wen, W. H. and Huang, C. Y. 2017. Isolation and determination of four potential antimicrobial components from Pseudomonas aeruginosa extracts. International Journal of Medical Sciences, 14(13): 1368.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Rosselló-Móra, R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nature Reviews Microbiology, 12(9): 635-645.

Yayan, J., Ghebremedhin, B. and Rasche, K. 2015. Antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. Plos One, 10(10): e0139836.

Zahedani, S. S., Jahantigh, M. and Amini, Y. 2018. Determining a pattern for antibiotic resistance in clinical isolations of pseudomonas aeruginosa. Tehran University Medical Journal, 76(8): 517-522.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Dhulfiqar Hamid Hamzah AL-JANABI

Eğitim

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

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2018-2019	İbn-i Sina Laboratuvarı	Laboratuvar yöneticisi